

EDITORIALE

A partire da questo numero il Notiziario dei Metodi Analitici verrà immesso in rete e sarà consultabile (e scaricabile) all'indirizzo www.irsa.rm.cnr.it/Notiziario.

Per facilitare la transizione a questo nuovo canale di comunicazione, contestualmente all'immissione in rete, il Notiziario in oggetto verrà anche inviato per l'ultima volta, a mezzo posta, ai laboratori inseriti nella nostra mailing list.

L'immissione in rete si propone di favorire una diffusione più capillare di questa pubblicazione, ad oggi limitata ad un gruppo di circa 500 laboratori nazionali, al fine di pervenire ad un collegamento sempre più stretto tra comunità scientifica e operatori del settore.

In questi anni, infatti, il Notiziario ha consentito non soltanto il trasferimento dei risultati di studi relativi alla messa a punto di metodi analitici, ma anche la diffusione di lavori originali, reviews, informazioni e proposte di metodo. Rinnoviamo pertanto l'invito a collaborare sottopondo al Comitato di redazione proposte e suggerimenti migliorativi riguardanti i metodi ufficiali o da ufficializzare, articoli scientifici, note e quant'altro ritenuto meritevole di segnalazione.

Desideriamo altresì ricordare che il 2 marzo 2004, nell'ambito della Giornata di studio "Metodologie analitiche per il controllo della qualità delle acque", organizzata presso la sede del CNR di Roma, è stata presentata la nuova edizione del Manuale dei metodi analitici per le acque.

Tale manuale, frutto della collaborazione tra Istituto di Ricerca sulle Acque e Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, rappresenta uno strumento fondamentale ai fini della tutela e della salvaguardia delle risorse idriche, in quanto fornisce le metodologie analitiche di riferimento cui i diversi organi di controllo dovranno attenersi per verificare il superamento dei limiti fissati dalla normativa in vigore (D.Lgs. 152/99).

Al fine di facilitare la diffusione del manuale tra gli addetti ai lavori e rendere più celeri gli aggiornamenti futuri, il manuale è stato immesso in rete all'indirizzo www.apat.it, oppure www.irsa.rm.cnr.it/Metodi.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, maggio 2004

DETERMINAZIONE DI NONILFENOLO E NONILFENOLO MONO- E DIETOSSILATI IN ACQUE SUPERFICIALI

a cura di Capri S.*, De Angelis S.*, Patrolecco L.*, Polesello S.** e Valsecchi S.**

* IRSA - CNR, Roma

** IRSA - CNR, Brugherio

RIASSUNTO

Viene presentata la messa a punto di un metodo in cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) e rivelazione in fluorescenza per la separazione, identificazione e determinazione del nonilfenolo (NP) e nonilfenolo mono-(NP1EO) e dietossilati (NP2EO) nell'ambiente acquatico.

SUMMARY

An analytical procedure is described for the determination of nonylphenol and nonylphenol mono and diethoxylate in natural waters. The analysis was performed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and fluorescence detection.

INDICE

DETERMINAZIONE DI NONILFENOLO E NONILFENOLO MONO- E DIETOSSILATI IN ACQUE SUPERFICIALI	1
DETERMINAZIONE DI NONILFENOLO E NONILFENOLO MONO- E DIETOSSILATI IN SEDIMENTI	8
DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO E TOTALE IN MATRICI SOLIDE AMBIENTALI	14
DETERMINAZIONE DI AMMONIACA ED AZOTO ORGANICO: CONFRONTO TRA IL METODO KJELDHAL E LA DETERMINAZIONE STRUMENTALE CON L'ANALIZZATORE TOTAL NITROGEN (TN)	20

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni la ricerca ha dimostrato che alcune classi di composti sintetici e naturali, presenti nell'ambiente idrico, sono potenzialmente in grado di alterare le funzioni del sistema endocrino, quali la sintesi, la secrezione, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo vivente, che sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi riproduttivi e di crescita, e causare conseguentemente effetti dannosi alla salute di organismi sani o della loro progenie. (Vos *et al.*, 2000). L'attività estrogenica è stata provata per molte sostanze definite "alteratori endocrini" (EDC), mentre per altre è attualmente solo sospettata.

Le fonti degli alteratori endocrini sono molteplici e non sempre chiaramente individuabili. Per quelli xenobiotici, l'immissione nell'ambiente è costituita principalmente dagli scarichi diretti e dagli effluenti degli impianti di trattamento di reflui urbani, industriali e zootecnici. Non sempre, infatti, gli impianti di trattamento sono in grado di rimuovere completamente questi microinquinanti che si ritrovano quindi nei corpi idrici recettori potenzialmente attivi anche se a concentrazioni estremamente basse ($\leq 1 \mu\text{g/L}$).

Tra le diverse classi di EDC, i composti fenolici alchilfenoli (AP) e alchilfenoli etossilati (APEO) risultano di rilevante interesse a causa della loro elevata produzione e diffusione nell'ambiente.

Gli alchilfenoli etossilati, ed in particolare i nonilfenoli etossilati (NPEO), sono tensioattivi nonionici largamente utilizzati nei detergenti impiegati in attività industriali e domestiche, nelle vernici, nella formulazione di pesticidi, nel settore tessile e metallurgico (Giger *et al.*, 1984). La produzione mondiale annuale di APEO ammonta a circa 700.000 tonnellate (Ahel *et al.*, 1993). A seguito della degradazione di tali composti, che ha luogo principalmente negli impianti di depurazione, si ha la formazione di prodotti metabolici ad elevata persistenza, che vengono rilasciati nell'ambiente a concentrazioni estrogenicamente attive. Proprio in conseguenza degli effetti ambientali di queste sostanze, molti paesi hanno drasticamente limitato l'uso dei composti dai quali derivano (Svezia, Belgio, Inghilterra, Germania, Olanda, ecc.). La Svizzera ha del tutto bandito l'uso degli alchilfenoli etossilati, mentre in Italia, dal 1995 questi prodotti non possono essere impiegati nella formulazione di detergenti per uso domestico.

L'attività estrogenica di questi composti è di qualche ordine di grandezza inferiore a quella degli ormoni steroidei; ha tuttavia rilevanza ambientale in considerazione delle ingenti quantità di tensioattivi non ionici immesse nei corpi idrici e delle loro caratteristiche lipofile e di persistenza. La European Chemicals Bureau (2002) ha stimato per il nonilfenolo nelle acque superficiali un tempo di dimezzamento per biodegradazione di 150 anni, che, unitamente al valore di K_{ow} (4,85), lo rende altamente bioaccumulabile.

Alcuni alchilfenoli (nonilfenoli, 4-(para)-nonilfenolo,

ottilfenoli e para-terz-ottilfenolo) sono stati inseriti dal Parlamento europeo (Decisione n. 2455/2001/CE) nell'elenco delle sostanze prioritarie per l'ambiente acquatico. Di questi, nonilfenolo e ottilfenolo sono state classificate sostanze pericolose prioritarie, per le quali dovranno essere definiti, entro due anni, standard di qualità e valori limite di emissione, che costituiranno riferimenti normativi per gli stati membri della Comunità Europea.

Metodi analitici standardizzati per la determinazione di questi composti nelle acque non risultano al momento disponibili; è in corso di discussione un metodo di analisi di nonilfenolo nelle acque da parte di ISO (ISO CD 18857-1), basato sull'estrazione liquido-liquido e analisi GC-MS. Si sente quindi l'esigenza di una messa a punto di protocolli analitici, che uniscano caratteristiche di sensibilità e accuratezza adeguate a doti di robustezza analitica e speditezza operativa che ne rendano facile una diffusione sull'intero territorio nazionale.

Nel seguito viene riportata una proposta di metodo per la determinazione di nonilfenolo e nonilfenoli mono- e di-etossilati basata sull'impiego della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelazione in fluorescenza, previo arricchimento degli analiti mediante estrazione in fase solida (SPE). La proposta di metodo è preceduta dalla discussione su alcuni aspetti della procedura che sono stati particolarmente approfonditi in fase di ottimizzazione della stessa.

Scelta della fase stazionaria

La concentrazione di nonilfenolo (NP) e nonilfenoli(1,2)etossilati (NP1EO, NP2EO) nelle acque è stato determinata utilizzando una tecnica di estrazione in fase solida (SPE) su un volume elevato di campione (0,5-2 L), con un fattore di concentrazione da 1000 a 4000. La scelta della fase stazionaria si è basata su informazioni reperite in letteratura, che suggerivano l'uso di fasi apolari come C_{18} o resine a base polistirene-divinilbenzene nel caso di estrazione di composti con elevata lipofilia come il nonilfenolo ($\log K_{ow} = 4,48$).

Tra le fasi apolari disponibili commercialmente è stato effettuato un confronto tra cartucce contenenti 500 mg di fase C_{18} a base silicea e cartucce riempite con 200 mg resina polistirene-divinilbenzene (Lichrolut EN), adatte entrambe al passaggio di elevati volumi di acqua con flussi sufficientemente elevati (circa 10 mL/min).

Il confronto è stato condotto preconcentrando, con entrambe le cartucce, 1 L ciascuno di 6 campioni acquosi diversi prelevati dal fiume Lambro. Le concentrazioni ottenute, analizzando in parallelo gli estratti, sono riportate in Tab. 1.

Il confronto statistico è stato effettuato mediante il t-test accoppiato, che permette di confrontare due serie di prove singole. Per $p < 0,05$ le due medie non sono risultate significativamente diverse tra loro, avendo ottenuto un valore di $p = 0,20$ per NP ($n = 6$) e $0,87$ per NPE_{tot} ($n = 6$).

Il t-test accoppiato, quindi, ha permesso di affermare che le medie delle concentrazioni ottenute con i due tipi di fasi stazionarie non sono significativamente diverse, in quanto il valore p è in entrambi i casi molto maggiore di 0,05. Si è deciso di scegliere, tuttavia, la C_{18} , che è apparsa più selettiva nei confronti degli analiti in esame, presentando un minore rumore di fondo rispetto alle Lichrolut-EN.

Tab. 1 - Tabella riassuntiva delle concentrazioni (in $\mu\text{g/L}$) determinate utilizzando in parallelo C_{18} e Lichrolut-EN; NPEO_{tot} è la somma di NPE1EO , NPE2EO , NPE3EO

	1		2		3	
	NP	NPEO_{tot}	NP	NPEO_{tot}	NP	NPEO_{tot}
C_{18}	2,19	10,32	1,04	4,24	1,13	2,63
Lichrolut-EN	2,31	9,79	1,09	5,97	0,96	2,52

	4		5		6	
	NP	NPEO_{tot}	NP	NPEO_{tot}	NP	NPEO_{tot}
C_{18}	0,17	0,59	0,80	2,15	1,57	9,08
Lichrolut-EN	0,07	0,39	0,39	1,69	1,41	9,00

Effetto del volume sulle C_{18}

Per la messa a punto del protocollo d'analisi sono stati concentrati volumi crescenti (0,5, 1,0 e 2,0 L) del medesimo campione acquoso, prelevato dal fiume Lambro, allo scopo di individuare il fattore di concentrazione ottimale.

I volumi di campioni acquosi sono stati analizzati con la stessa procedura, in modo da ottenere delle concentrazioni nell'estratto finale (Tab. 2) che verifichino la linearità del recupero in funzione del volume.

Tab. 2 - Concentrazioni di NP e NPEO nell'estratto finale (0,5 mL) in funzione del volume di acqua passato sulle cartucce

Volume (L)	NP (mg/L)	NP1EO (mg/L)	NP2EO (mg/L)
0,5	1,10	1,85	2,14
1	2,41	3,89	4,39
2	4,25	7,53	8,47

Si osserva linearità tra 0,5 e 2 L di campione trattati. Per la procedura si è deciso di utilizzare un volume pari a 1 L di campione, in modo da garantire la sensibilità sufficiente senza rischiare di superare la massima capacità di carico della fase e senza richiedere un tempo eccessivo di concentrazione.

Effetto del pH

Si è voluto verificare l'effetto del pH sul recupero di NP e NPEO_{tot} , in quanto il nonilfenolo è una specie debolmente ionizzabile, anche se con $\text{pKa} > 9$.

La procedura di acidificazione è stata applicata ad entrambe le tipologie di materiale adsorbente ed in tutte e due i casi si è verificata una diminuzione della loro capacità.

Tab. 3 - Effetto del pH con il passaggio di 1 L di campione acquoso sulla cartuccia

SPE	pH	NP ($\mu\text{g/L}$)	NPEO_{tot} ($\mu\text{g/L}$)
Lichrolut-EN	3	3,17	11,88
	7,76	3,50	13,31
SPE	pH	NP ($\mu\text{g/L}$)	NPE_{tot} ($\mu\text{g/L}$)
C_{18}	3	0,84	3,18
	7,78	$0,95 \pm 0,06$	$4,78 \pm 0,19$

Dai risultati ottenuti (Tab. 3) si è, infatti, osservato una diminuzione delle percentuali di recupero acidificando i campioni acquosi, con una perdita di circa il 10% per il NP e leggermente superiore per i NPEO ($\text{NP1EO} + \text{NP2EO}$), durante la fase di preconcentrazione.

Questo risultato è spiegabile se si pensa che al pH naturale, vicino alla neutralità (nel fiume Lambro il pH è intorno a 7,5), parte della sostanza organica, tra cui gli acidi fulvici e umici, è sotto forma dissociata e quindi solubile; in condizioni acide invece la sostanza organica si trova in forma neutra e quindi maggiormente lipofila e può essere adsorbita dalla cartuccia saturando i siti attivi.

In base a questi risultati è stato deciso di preconcentrare i campioni acquosi ai pH naturali vicini alla neutralità.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa su una preliminare procedura di preconcentrazione del campione acquoso tramite estrazione liquido-solido su cartucce SPE "solid phase extraction" e successiva determinazione degli analiti nell'estratto concentrato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad un rivelatore a fluorescenza.

Il riconoscimento dei picchi nei cromatogrammi degli estratti si effettua confrontando il loro tempo di ritenzione con quello dei picchi di una soluzione di riferimento multicomponente costituita da nonilfenolo (NP), nonilfenoloetossilati 1 e 2 (NP1EO e NP2EO). L'analisi quantitativa viene effettuata sulla base di

opportune curve di taratura area-concentrazione, ottenute riportando in ascissa la concentrazione della soluzione di riferimento e in ordinata la media delle aree dei picchi delle soluzioni di riferimento.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate e agli scarichi domestici ed industriali. Considerando il fattore di concentrazione ($F_c=2000$), il limite di rilevabilità è pari a $0,2 \mu\text{g/L}$ per il NP, $0,3 \mu\text{g/L}$ per NP1EO e $0,2 \mu\text{g/L}$ per NP2EO.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei composti in esame.

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico. Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate, è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua ultrapura. Nel caso di evidenza di interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi e dei solventi.

Tutta la vetreria utilizzata va pulita tenendola a bagno in HCl al 10% per almeno un'ora e quindi sciacquata con acqua ultrapura. Evitare l'uso di detergenti per il lavaggio della vetreria. Prima dell'utilizzo effettuare una pulizia finale con acetone.

Per campioni contenenti particolato sospeso si consiglia la filtrazione secondo le modalità descritte al punto 7.1.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, conservati al buio ad una temperatura di 4°C dopo essere stati addizionati con l'1% di formaldeide al 37% per prevenire la degradazione batterica. La preconcentrazione deve essere effettuata entro 24 ore dal momento del prelievo affinché non si alteri la composizione chimica.

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Vetreria di laboratorio

5.2 - HPLC

HPLC con una pompa a gradiente equipaggiato con un rivelatore di fluorescenza a lunghezza d'onda variabile fissata a 230 nm come lunghezza d'onda di eccitazione e 302 nm come emissione.

5.3 - Colonna a fase inversa a base fenolica

È in grado di separare nonilfenolo (come unico picco formato dalla miscela di isomeri) e i singoli etossilati. Si consiglia l'uso della colonna Synergi 4μ polar-RP (150 x 4,6 mm, 4μ , Phenomenex, USA), caratterizzata dalla presenza di gruppi eteri legati al radicale fenolico, o equivalente.

5.4 - Sistema di registrazione e di calcolo delle aree dei picchi.

5.5 - Cartucce per estrazione in fase solida C_{18} (50 μm), quantità di fase: 500 mg.

Per l'estrazione liquido-solido sono utilizzate colonnine monouso costituite da un "housing" esterno, generalmente in propilene, contenente il materiale adsorbente e da setti per il contenimento del materiale adsorbente in vetro sinterizzato.

La C_{18} è una fase adsorbente apolare costituita da catene idrocarburiche con il gruppo octadecilico legato al gel di silice, che è in grado di trattenere soprattutto composti apolari o debolmente polari.

5.6 - Sistema di filtrazione per cartucce SPE

5.7 - Pompa da aspirazione per vuoto

5.8 - Filtri in fibra di vetro 0,7 m, Whatman GF/F o equivalenti.

5.9 - Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

5.10 - Dispositivo per l'erogazione di azoto gassoso, purezza 5.0.

6 - REATTIVI

6.1 - Acqua ultrapura

6.2 - Acetone per residui di pesticidi.

6.3 - Metanolo per HPLC grado gradiente.

6.4 - Formaldeide al 37%

6.5 - 4-Nonilfenolo (NP) di grado standard per cromatografia.

6.6 - 4-Nonilfenolo mono-etossilato (NP1EO) di grado standard per cromatografia.

6.7 - 4-Nonilfenolo di-etossilato (NP2EO) di grado standard per cromatografia.

6.8 - Soluzioni di riferimento

Preparare soluzioni di riferimento concentrate (1 g/L) in metanolo di nonilfenolo, nonilfenolo mono- e di-etossilati. Le soluzioni multicomponente aventi concentrazioni comprese nell'intervallo 0,5-5 mg/L sono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate impiegando come solvente la fase mobile adoperata nell'analisi HPLC (miscela metanolo/acqua, 60/40). Le soluzioni vanno conservate a 4°C.

7 - PROCEDIMENTO

7.1 - Trattamento preliminare

La filtrazione dei campioni d'acqua è condotta per rimuovere i solidi sospesi utilizzando filtri in fibra di vetro con una porosità media di 0,7 µm.

7.2 - Preconcentrazione ed eluizione

I campioni acquosi filtrati sono messi in matracci da 1 L e fatti passare mediante aspirazione attraverso colonnine (SPE) a perdere, precedentemente attivate con:

- 5 mL di acetone
- 10 mL di metanolo
- 20 mL di acqua ultrapura

L'apposito sistema di filtrazione sotto vuoto è collegato ad una pompa ad aspirazione, in grado di fornire un flusso costante di circa 10 mL/minuto.

Terminata la filtrazione del campione, la colonnina è fatta asciugare in aspirazione per almeno 30 minuti e poi eluita con 10 mL di acetone. Il volume dell'eluato è ridotto a 0,5 mL tramite flusso di azoto. Il campione è raccolto in "vial" di vetro scuro e iniettato nel minor tempo possibile in HPLC.

7.3 - Analisi cromatografica

L'analisi cromatografica viene eseguita utilizzando le seguenti condizioni:

miscela eluente: miscela binaria MeOH/H₂O
velocità di flusso: 1 mL/min
volume di iniezione: 20 µL
modalità di eluizione: gradiente

	Tempo (minuti)		H ₂ O (%)
I step	0	60	40
II step	25	80	20
III step	35	80	20
IV step	55	100	0
V step	60	100	0

Il gradiente sopra riportato è puramente indicativo e può essere modificato in funzione delle diverse caratteristiche del sistema cromatografico utilizzato, in modo comunque da mantenere una sufficiente risoluzione (si può tollerare una sovrapposizione tra i picchi che non superi il 10 % dell'altezza misurata dalla base del picco)¹ tra i picchi del nonilfenolo, nonilfenol-1-etossilato e nonilfenol-2-etossilato.

La Fig. 1 mostra il cromatogramma di un estratto di un campione del fiume Lambro.

8 - CALCOLI

Si può utilizzare il metodo del riferimento esterno iniettando volumi uguali di campione e di riferimento.

Si preparano opportune soluzioni di riferimento degli analiti (vedi par. 6.8), di composizione tale da non provocare sovrapposizione di picchi.

Si ricavano quindi le curve di taratura per i singoli analiti calcolando i fattori di risposta e accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento.

9 - QUALITÀ DEL DATO

La precisione e l'accuratezza del metodo sono state valutate utilizzando due diverse matrici.

È stata preparata una soluzione, in acqua ultrapura, con concentrazione pari a 10 µg/L, partendo da soluzioni concentrate di riferimento in metanolo di NP, NP1EO e NP2EO. Tale soluzione è divisa in diverse aliquote da 0,5 e 1 L e preconcentrata con SPE.

I risultati riportati in Tab. 4 sono espressi in percentuale di recupero, ottenuta dividendo le concentrazioni dei composti concentrati con le cartucce per le concentrazioni corrispondenti di nonilfenolo e nonilfenoloetossilati delle soluzioni di riferimento:

$$\% \text{ di recupero} = (C_{\text{OTTENUTA CON SPE}} / C_{\text{ATTESA}}) \times 100$$

¹ È difficile stabilire un valore di R (Risoluzione) in quanto ciascun picco è a sua volta costituito da un insieme di isomeri più o meno risolti. Per questo motivo non si può ottenere un picco cromatografico di forma gaussiana del quale calcolare l'ampiezza alla base o a mezza altezza. Per questo motivo abbiamo scelto un approccio molto empirico sulla sovrapposizione dei picchi.

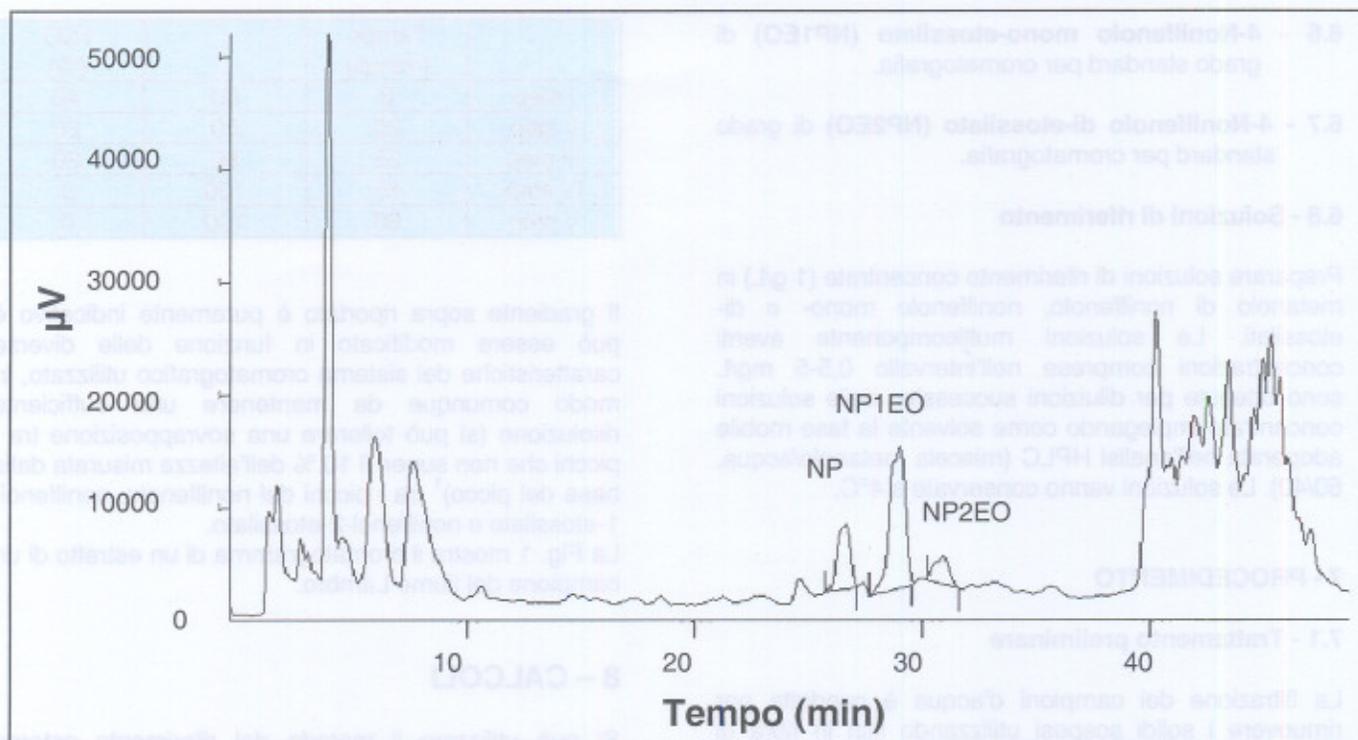


Fig. 1 – Cromatogramma di un campione di acqua superficiale estratto con cartucce Si-C₁₈ da 500 mg utilizzando le condizioni d'estrazione e di analisi riportate nel testo.

Tab.4 - Percentuali di recupero ottenute concentrando una soluzione 10 µg/L in acqua ultrapura per singolo analita

Volume (L)	NP % rec	NP1EO % rec	NP2EO % rec
0,5	95,0	108,8	105,8
1	92,8	102,0	109,9

I recuperi ottenuti con la soluzione sintetica risultano, per entrambi i volumi concentrati, pressoché quantitativi.

Per la seconda prova invece, è stato prelevato un campione di acqua del fiume Lambro da un sito mediamente inquinato, risultato privo di NP e NPE ad un'analisi preliminare. A questa matrice è stata aggiunta un'aliquota di soluzione di riferimento in modo tale da ottenere una soluzione di 10 µg/L di NP, NP1EO, NP2EO (Tab. 5).

Dai risultati ottenuti si osserva che i recuperi medi sono sempre superiori a 80%, confermando l'accettabilità del recupero ottenibile con questa tecnica anche nel caso di matrici molto complesse come un ambiente fluviale mediamente inquinato.

La ripetibilità del metodo di concentrazione su C₁₈ è stata valutata effettuando 3-4 repliche di 3 campioni diversi, da 1 L ciascuno, di acqua del fiume Lambro. Per ogni campione è stata calcolata la media, la deviazione standard (SD) e la deviazione standard relativa (RSD %) delle repliche (Tab. 6).

La deviazione standard relativa (RSD), a seconda dei campioni, è variata per il NP dal 5% all'11%, per il NP1EO dal 4% al 24%, per il NP2EO dall'1% al 19%. Dai valori di ripetibilità, ottenuti in analisi ripetute di soluzioni con aggiunta degli analiti di interesse a basse concentrazioni, è possibile stimare i limiti di rilevabilità (LOD) per l'analisi di NP e NPE come 3 volte la deviazione standard.

Considerando il fattore di concentrazione utilizzato nel corso della ricerca (2000X) si ricava il limite di rilevabilità nell'acqua di partenza pari a 0,2 µg/L per il NP, 0,3 µg/L per NP1EO e 0,2 µg/L per NP2EO.

Tab.5 - Percentuali di recupero ottenute concentrando una soluzione 10 µg/L in acqua di fiume per singolo analita

Volume (L)	NP % rec	NP1EO % rec	NP2EO % rec
0,5	84,6	92,1	90,7
0,5	67,7	78,8	84,1
1	92,3	99,9	96,9
1	87,7	77,2	89,1
1	79,7	91,1	118,9
MEDIA	82,4	87,8	95,9
SD	9,4	9,6	13,6
RSD%	11,4	10,9	14,2

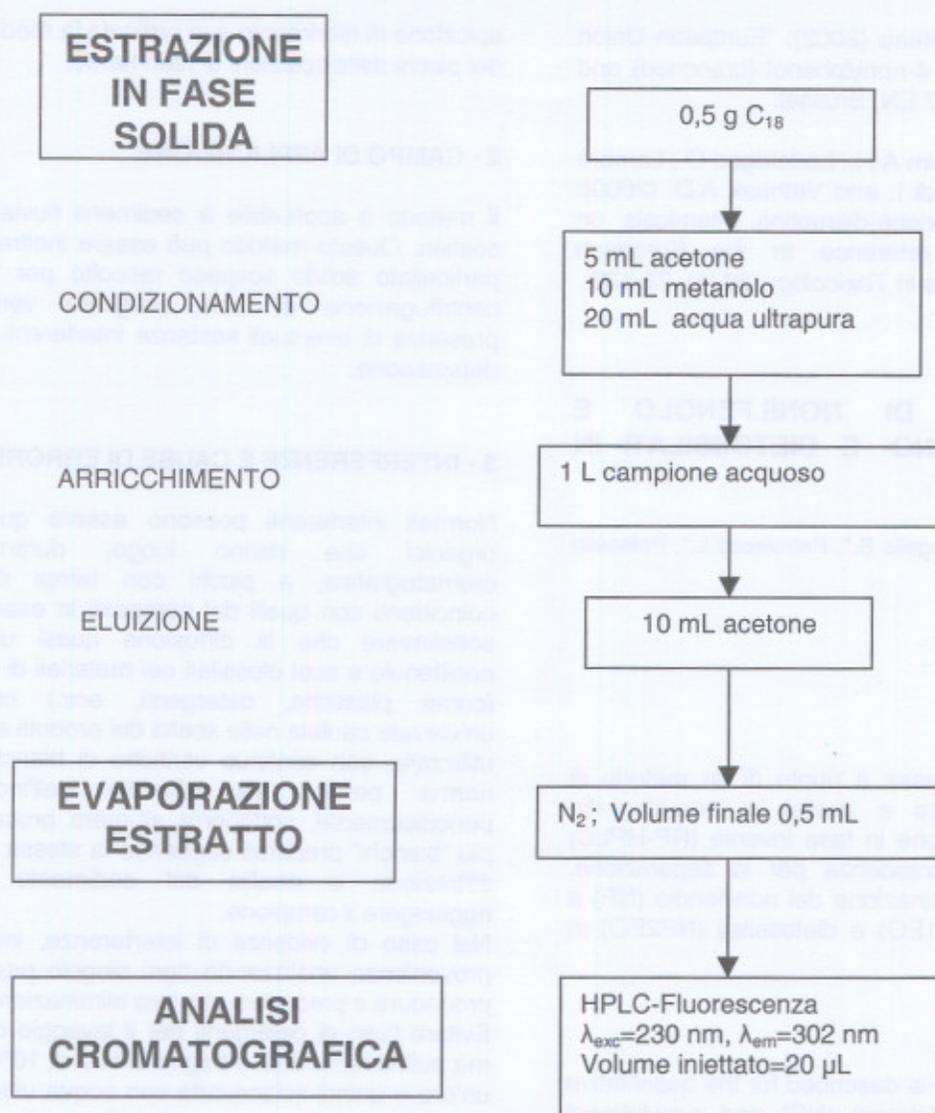


Fig. 2 - Schema del protocollo analitico per l'analisi di NP, NP1EO, NP2EO in campioni acquosi.

Tab. 6 - Ripetibilità valutata su tre campioni analizzati con 3-4 repliche ciascuno (<LOD = inferiore al limite di rilevabilità)

n=3	NP ($\mu\text{g/L}$)	NP1EO ($\mu\text{g/L}$)	NP2EO ($\mu\text{g/L}$)
MEDIA	2,27	3,87	4,44
SD	0,12	0,15	0,2
RSD %	5,38	3,9	4,49

n=3	NP ($\mu\text{g/L}$)	NP1EO ($\mu\text{g/L}$)	NP2EO ($\mu\text{g/L}$)
MEDIA	0,95	1,29	2,78
SD	0,06	0,09	0,04
RSD %	6,37	7,02	1,32

n=4	NP ($\mu\text{g/L}$)	NP1EO ($\mu\text{g/L}$)	NP2EO ($\mu\text{g/L}$)
MEDIA	1,07	2,24	2,81
SD	0,12	0,54	0,54
RSD %	11	23,97	19,09

BIBLIOGRAFIA

Ahel M. and Giger W. (1993): "Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents", *Chemosphere*, **26** (8), 1471-1478.

Giger W., Brunner P.H. and Schaffner C. (1984): "4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants", *Science*, **225**, 623-625.

European Chemicals Bureau (2002): "European Union risk assessment report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol", EUR 20387 EN, Brussel.

Vos G.J., Dybing E., Greim A.H., Ladefoged O., Lambré C., Tarazona V.J., Brandt I. and Vethaak A.D. (2000): "Health effect of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation", *Critical reviews in Toxicology*, **30** (1), 71-133.

DETERMINAZIONE DI NONILFENOLO E NONILFENOLO MONO- E DIETOSSILATI IN SEDIMENTI

a cura di Capri S.*, De Angelis S.*, Patrolecco L.*, Polesello S.** e Valsecchi S.**

* IRSA - CNR, Roma

** IRSA - CNR, Brughiero

RIASSUNTO

Viene presentata la messa a punto di un metodo di estrazione con solvente e analisi in cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) con rivelazione in fluorescenza per la separazione, identificazione e determinazione del nonilfenolo (NP) e nonilfenolo mono- (NP1EO) e dietossilati (NP2EO) in sedimenti.

SUMMARY

An analytical procedure is described for the quantitative determination of nonylphenol (NP) and nonylphenol mono- (NP1EO) and diethoxylate (NP2EO) in sediments. A solvent extraction procedure was employed to enrich the analytes from solid samples. Quantitative determination were performed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and fluorescence detection.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sull'estrazione del campione di sedimento liofilizzato e successiva determinazione degli analiti nell'estratto purificato e concentrato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad un rivelatore a fluorescenza.

Il riconoscimento dei picchi nei cromatogrammi degli estratti è effettuato confrontando il loro tempo di ritenzione con quello dei picchi di una soluzione di riferimento multicomponente costituita da nonilfenolo (NP), nonilfenoloetossilati 1 e 2 (NP1EO e NP2EO). L'analisi quantitativa viene effettuata sulla base di opportune curve di taratura area-concentrazione, ottenute riportando in ascissa la concentrazione della

soluzione di riferimento e in ordinata la media delle aree dei picchi delle soluzioni di riferimento.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile a sedimenti fluviali, lacustri e costieri. Questo metodo può essere inoltre applicato a particellato solido sospeso raccolto per filtrazione o centrifugazione e, con adeguate verifiche sulla presenza di eventuali sostanze interferenti, a fanghi di depurazione.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. Bisogna sottolineare che la diffusione quasi ubiquitaria di nonilfenolo e suoi etossilati nei materiali di uso comune (come plastiche, detersivi, ecc.) costringe ad un'elevata cautela nella scelta dei prodotti e materiali da utilizzare, con continue verifiche di bianchi. E' buona norma perciò, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" preparati seguendo la stessa procedura di estrazione e analisi del sedimento ma senza aggiungere il campione.

Nel caso di evidenza di interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione.

Evitare l'uso di detersivi per il lavaggio della vetreria, ma pulirla tenendola a bagno in HCl al 10% per almeno un'ora e quindi sciacquarla con acqua ultrapura. Prima dell'utilizzo effettuare una pulizia finale con acetone.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il sedimento viene raccolto e conservato secondo le linee guida indicate nella sezione "Campionamento e conservazione del campione", predisposte nell'ambito del Progetto "Ecosistemi e Sedimenti" oggetto di convenzione tra IRSA-ISS e ARPA-ER (2004).

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Vetreria di laboratorio

5.2 - Sistema per estrazione Soxhlet

5.3 - Ditali per estrazione Soxhlet in borosilicato

5.4 - Sistema per estrazione accelerata con solvente (ASE) dotato di cella in acciaio per estrazione in pressione.

5.5 - Sistema per estrazione con solvente assistita da microonde (MASE)

Forno per estrazione chimica a microonde diffuse da laboratorio, dotato di sistemi di sicurezza per prevenire fughe o incendi di solvente e di contenitori in Teflon per estrazione con solventi in pressione.

5.6 - Sistema di filtrazione per cartucce SPE

5.7 - Pompa da aspirazione per vuoto

5.8 - Agitatore magnetico

5.9 - Centrifuga da laboratorio in grado di fornire almeno 10.000 giri/min.

5.10 - Cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC), con una pompa a gradiente, equipaggiato con un rivelatore di fluorescenza a lunghezza d'onda variabile fissata a 230 nm come lunghezza d'onda di eccitazione e 302 nm come emissione.

5.11 - Evaporatore rotante dotato di bagno termostatico, predisposto per il vuoto e con sistema di regolazione del vuoto.

5.12 - Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g.

5.13 - Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

5.14 - Sistema di registrazione e di calcolo delle aree dei picchi.

5.15 - Colonna a fase inversa a base fenolica in grado di separare nonilfenolo (come unico picco formato dalla miscela di isomeri) e i singoli etossilati. Si consiglia l'uso della colonna Synergi 4 μ polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ , Phenomenex, USA), caratterizzata dalla presenza di gruppi eterei legati al radicale fenolico, o equivalente.

5.16 - Dispositivo per l'erogazione di azoto gassoso, purezza 5.0.

6 - REATTIVI

6.1 - Acqua ultrapura esente da sostanze organiche che possano interferire nell'analisi (esempio: acqua deionizzata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia in carbone attivo).

6.2 - Acetone per residui di pesticidi.

6.3 - Metanolo per HPLC grado gradiente.

6.4 - 4-Nonilfenolo (NP) di grado standard per cromatografia.

6.5 - 4-Nonilfenolo mono-etossilato (NP1EO) di grado standard per cromatografia, oppure miscela dei due isomeri 4-nonilfenolo mono e di-etossilati di grado standard per cromatografia.

6.6 - 4-nonilfenolo di-etossilato (NP2EO) di grado standard per cromatografia oppure miscela dei due isomeri 4-nonilfenolo mono e di-etossilati di grado standard per cromatografia.

6.7 - Poliossietilen(20)SorbitanMonooleato (Tween 80) di grado analitico.

6.8 - Allumina neutra (0,05-0,15mm, pH 7,0 \pm 0,5) attivata a 130°C per 2 ore, dopo raffreddamento disattivata con acqua ultrapura al 15% (p/p). La disattivazione è effettuata pipettando 3 mL di acqua ultrapura in una beuta da 125 mL con tappo a smeriglio e distribuendo l'acqua sulle pareti, ruotando la beuta. Aggiungere immediatamente 20 g di allumina ed agitare la beuta per almeno 20 minuti. Conservare in essiccatore.

6.9 - Cartucce per estrazione in fase solida C₁₈ (50 μ m), quantità di fase: 500 mg.

6.10 - Filtri per siringa compatibili con solventi organici (0,45 μ m).

6.11 - Soluzioni di riferimento

Preparare soluzioni di riferimento concentrate (1 g/L) in metanolo di nonilfenolo, nonilfenolo mono- e di-etossilati. Le soluzioni multicomponente aventi concentrazioni comprese nell'intervallo 0,5-5 mg/L sono preparate per diluizioni successive delle soluzioni concentrate, impiegando come solvente la fase mobile adoperata nell'analisi HPLC (miscela metanolo/acqua, 60/40). Le soluzioni vanno conservate a 4°C.

7 - PROCEDIMENTO

7.1 - Trattamento del sedimento

Subito dopo la consegna del campione al laboratorio, omogeneizzare tutto il campione raccolto e sottoporre a liofilizzazione l'aliquota destinata all'estrazione degli analiti.

Il liofilizzato deve essere conservato in bottiglie scure (per un tempo non superiore a 6 mesi) in un essiccatore a temperatura ambiente fino all'estrazione.

7.2 - Estrazione del sedimento liofilizzato

Il sedimento liofilizzato può essere estratto utilizzando diverse tecniche di estrazione secondo le modalità descritte nei paragrafi seguenti.

7.2.1 - Estrazione mediante Soxhlet o Randall automatizzato

Estrarre in Soxhlet per 10 ore (9 cicli all'ora) con 400 mL di metanolo 5 grammi di sedimento liofilizzato. In alternativa è possibile utilizzare estrattori automatici di tipo Randall secondo la seguente procedura: estrarre 5 grammi di sedimento liofilizzato con 120 mL di metanolo in immersione a 260°C per 2 ore e con solvente a riflusso per 3 ore.

La soluzione in metanolo, risultante dall'estrazione, viene sottoposta alla purificazione descritta al par. 7.3.

7.2.2 - Estrazione con l'ASE (Accelerated Solvent Extraction)

Riempire completamente una cella da 11 mL con il sedimento liofilizzato (circa 5 grammi); effettuare 2 cicli di estrazione (5 minuti ogni ciclo) con metanolo (circa 15 mL) a 100°C e 100 atm in modalità statica (flush 60%, purge 90 s). La soluzione in metanolo, risultante dall'estrazione, viene sottoposta alla purificazione descritta al par. 7.3.

7.2.3 - Estrazione mediante microonde (Microwave Assisted Solvent Extraction, MASE)

Estrarre 5 grammi di sedimento liofilizzato con 40 mL di metanolo a 120°C per 20 minuti con agitazione magnetica in contenitori chiusi di PTFE. Lasciare raffreddare l'estratto, decantarlo e trasferirlo nei contenitori per centrifuga. Lavare il solido rimasto con 5 mL di metanolo, lasciare decantare e aggiungere il surnatante nello stesso contenitore. Centrifugare a 6000 giri/minuto per 20 minuti.

Raccogliere il surnatante e processarlo come descritto al par. 7.3.

7.2.4 - Estrazione con tensioattivo (Tween 80)

Estrarre per 3 ore a temperatura ambiente mediante agitazione magnetica (circa 300 giri/minuto) 5 grammi di sedimento liofilizzato con 100 mL di una soluzione 10 g/L di Tween 80. Centrifugare l'estratto a 10.000 giri/minuto per 15 minuti. Il surnatante deve essere preconcentrato mediante estrazione in fase solida con cartucce C₁₈ attivate. L'attivazione viene effettuata facendo eluire in successione, senza lasciare mai andare a secco la fase solida, 5 mL di acetone, 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua ultrapura mantenendo un flusso di circa 3 mL/min. Dopo il passaggio della soluzione surnatante (a circa 5 mL/min) e il risciacquo con 10 mL di acqua ultrapura, si asciuga la cartuccia in aspirazione per circa 45 minuti.

Eluire la cartuccia con 3 aliquote da 10 mL di acetone, attendendo 3-5 minuti tra un'aliquote e la successiva per consentire una più efficace diffusione del solvente attraverso la fase solida; portare a secco l'eluato sotto flusso d'azoto e ricostituire con 0,5 mL di metanolo/acqua 60:40 (v/v). Filtrare con filtri per siringa in Teflon (0,45 µm) prima dell'iniezione in HPLC. La procedura d'estrazione è schematizzata in Fig. 1.

7.3 - Purificazione degli estratti con solvente

Concentrare gli estratti di metanolo a 1-2 mL con evaporatore rotante e trasferirli in una colonnina di allumina neutra disattivata con il 15% (p/p) d'acqua (1,5 cm i.d., 4,5 cm h) e lavata con metanolo.

Eluire la colonnina con 15 mL di metanolo con acido acetico al 10% (v/v); portare a secco l'eluato sotto flusso d'azoto e ricostituire con 0,5 mL di metanolo/acqua 60:40 (v/v). Filtrare con filtri per siringa compatibili con solventi organici (0,45 µm) prima dell'iniezione in HPLC.

7.4 - Analisi cromatografica

L'analisi cromatografia viene eseguita utilizzando le seguenti condizioni:

miscela eluente: miscela binaria MeOH/H₂O

velocità di flusso: 1 mL/min

volume di iniezione: 20 µL

modalità di eluizione: gradiente

	Tempo (minuti)	MeOH(%)	H ₂ O(%)
I step	0	60	40
II step	25	80	20
III step	35	80	20
IV step	55	100	0
V step	60	100	0
VI step	70	60	40

Il gradiente riportato in precedenza è puramente indicativo e può essere modificato in funzione delle diverse caratteristiche del sistema cromatografico utilizzato, in modo comunque da mantenere una sufficiente risoluzione (si può tollerare una sovrapposizione tra i picchi che non superi il 10% dell'altezza misurata dalla base del picco¹ tra i picchi di nonilfenolo, nonilfenol-1-etossilato e nonilfenol-2-etossilato (Fig. 2).

8 - CALCOLI

Si può utilizzare il metodo del riferimento esterno iniettando volumi uguali di campione e di riferimento.

Si preparano opportune soluzioni di riferimento degli analiti (vedi par. 6.11), di composizione tale da non provocare sovrapposizione di picchi.

Si ricavano quindi le curve di taratura per i singoli analiti calcolando i fattori di risposta e accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento.

¹ È difficile stabilire un valore di R (Risoluzione) in quanto ciascun picco è a sua volta costituito da un insieme di isomeri più o meno risolti. Per questo motivo non si può ottenere un picco cromatografico di forma gaussiana del quale calcolare l'ampiezza alla base o a mezza altezza. Per questo motivo abbiamo scelto un approccio molto empirico sulla sovrapposizione dei picchi.

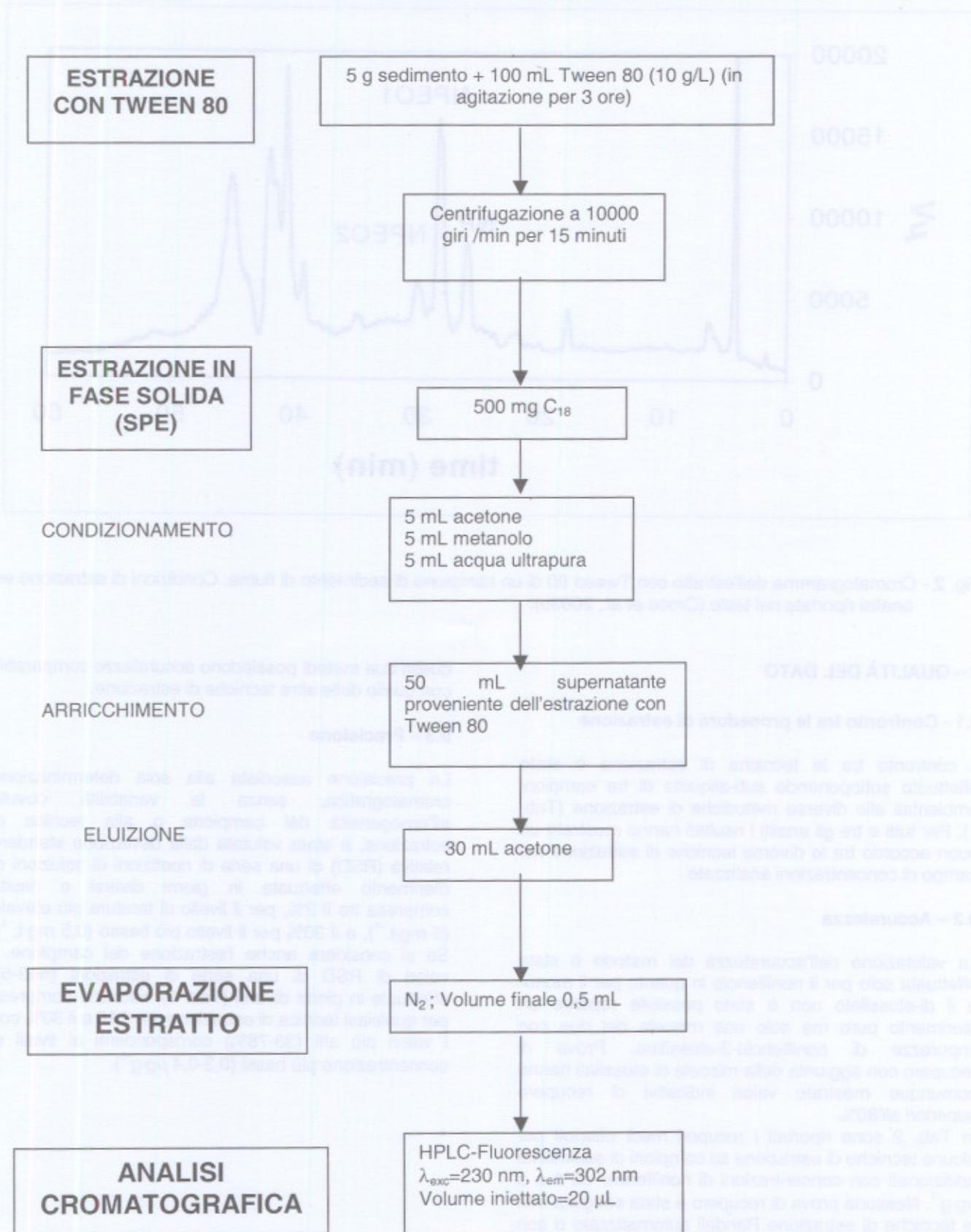


Fig. 1 – Schema di protocollo per l'estrazione con tensioattivo (Twen 80) e l'analisi in HPLC di NP, NP1EO, NP2EO nei sedimenti.

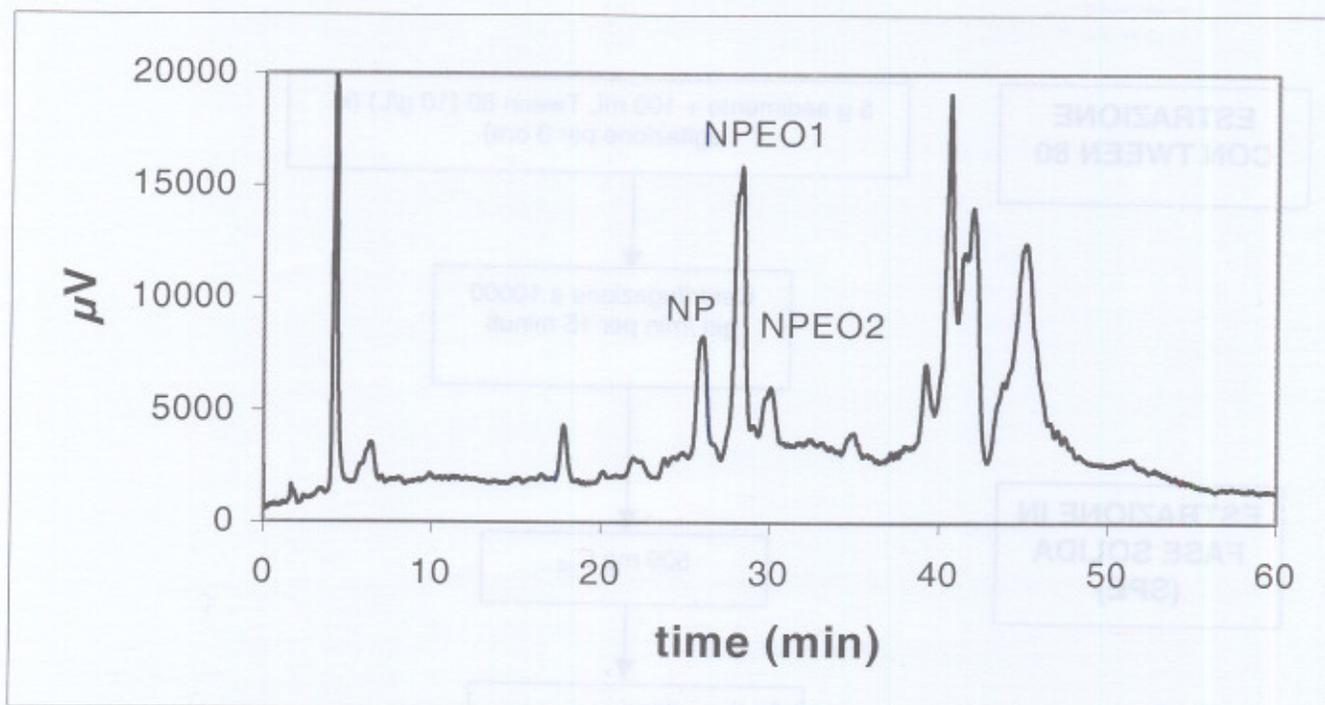


Fig. 2 - Cromatogramma dell'estratto con Tween 80 di un campione di sedimento di fiume. Condizioni di estrazione ed analisi riportate nel testo (Croce *et al.*, 2003b).

9 – QUALITÀ DEL DATO

9.1 - Confronto tra le procedure di estrazione

Il confronto tra le tecniche di estrazione è stato effettuato sottoponendo sub-aliquote di tre campioni ambientali alle diverse metodiche di estrazione (Tab. 1). Per tutti e tre gli analiti i risultati hanno mostrato un buon accordo tra le diverse tecniche di estrazione nel campo di concentrazioni analizzato.

9.2 – Accuratezza

La valutazione dell'accuratezza del metodo è stata effettuata solo per il nonilfenolo in quanto per il mono- e il di-etossilato non è stato possibile reperire un riferimento puro ma solo una miscela dei due con impurezze di nonilfenolo-3-etossilato. Prove di recupero con aggiunta della miscela di etossilati hanno comunque mostrato valori indicativi di recupero superiori all'80%.

In Tab. 2 sono riportati i recuperi medi ottenuti per alcune tecniche di estrazione su campioni di sedimento addizionati con concentrazioni di nonilfenolo da 1 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nessuna prova di recupero è stata eseguita con le tecniche di estrazione Randall automatizzato o con le microonde, ma i risultati di Tab. 1 dimostrano che

questi due metodi possiedono accuratèzze comparabili con quelle delle altre tecniche di estrazione.

9.3 – Precisione

La precisione associata alla sola determinazione cromatografica, senza la variabilità dovuta all'omogeneità del campione o alla tecnica di estrazione, è stata valutata dalla deviazione standard relativa (RSD) di una serie di ripetizioni di soluzioni di riferimento effettuate in giorni diversi e risulta compresa tra il 2%, per il livello di taratura più elevato (5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e il 30% per il livello più basso (0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se si considera anche l'estrazione del campione, i valori di RSD di una serie di estrazioni ($n=3-5$), effettuate in giorni diversi (Tab. 1), risultano compresi, per qualsiasi tecnica di estrazione, tra il 10 e il 30% con i valori più alti (33-78%) corrispondenti ai livelli di concentrazione più bassi (0,3-0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tab. 1 - Concentrazioni di nonilfenolo (NP) e di nonilfenoli etossilati (NPEO) misurate mediante diverse tecniche di estrazione. n= numero di repliche. I risultati sono espressi come media \pm SD nel caso di n>2.

Tecnica di estrazione	NP $\mu\text{g g}^{-1}$	NP1EO $\mu\text{g g}^{-1}$	NP2EO $\mu\text{g g}^{-1}$	n	Riferimento bibliografico
Sedimento Lambro					
Soxhlet	4,7 \pm 0,3				Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
	2,1	1,1	0,6	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
Randall automatizzato	2,6	1,5	0,5	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
ASE	2,9 \pm 0,6			5	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
Tween-80	2,2 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	6	Croce <i>et al.</i> , 2003b; Patrolecco <i>et al.</i> , 2004
Sedimento Po1 (Monte Lambro)					
Soxhlet	0,4 \pm 0,3			6	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
	0,3	0,5	0,2	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
Randall automatizzato	0,3	1,0	0,2	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
MASE	0,34 \pm 0,04			3	Croce <i>et al.</i> , 2003a
ASE	0,3 \pm 0,1			5	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
Tween-80	0,3	0,5	0,2	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b; Patrolecco <i>et al.</i> , 2004
Sedimento Po2 (Valle Lambro)					
Soxhlet	2,8 \pm 0,8			4	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
	2,6	4,0	1,2	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
Randall automatizzato	2,4	3,4	1,4	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
MASE	2,2 \pm 0,4			3	Croce <i>et al.</i> , 2003a
ASE	2,9 \pm 0,6			5	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
	2,6	3,0	1,3	2	Croce <i>et al.</i> , 2003b
Tween-80	2,4 \pm 0,3	3,6 \pm 0,2	0,92 \pm 0,04	5	Croce <i>et al.</i> , 2003b; Patrolecco <i>et al.</i> , 2004

Tab. 2 -Media delle percentuali di recupero di 4-nonilfenolo misurate mediante diverse tecniche di estrazione. n=numero di repliche. I risultati sono espressi come media \pm SD.

Tecnica di estrazione	NP	n	Riferimento bibliografico
Soxhlet	79 \pm 24%	4	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
ASE	85 \pm 22%	15	Valsecchi <i>et al.</i> , 2001
Tween-80	89 \pm 12%	5	Patrolecco <i>et al.</i> , 2004

9.4 – Limite di rilevabilità

Il limite di determinazione cromatografico, calcolato come tre volte la deviazione standard di analisi ripetute (n=10) di soluzioni con aggiunta degli analiti di interesse a concentrazioni prossime al limite di rilevabilità, è risultato pari a 0,1 mg·L⁻¹. Considerando

l'estrazione di 5 g di sedimento ed un volume finale d'estratto pari a 0,5 mL, il limite di determinazione (LOD) del metodo risulta 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ per i tre analiti.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Per il nonilfenolo e suoi derivati è disponibile un materiale di riferimento costituito da fango di depurazione urbano (Endocrine Disrupter in Municipal Sludge, 4-NP certificato 78 mg/kg, VKI, Danimarca). Inoltre è possibile ricorrere a materiali di riferimento secondari prodotti nei laboratori da validare mediante circuiti di interconfronto.

BIBLIOGRAFIA

Croce V., Paggio S., Pagnoni A., Polesello S. and Valsecchi S. (2003a): "Determination of 4-nonyphenol and 4-nonylphenolethoxylates in river sediments by microwave assisted solvent extraction", *Annali di*

Croce V., Patrolecco L., Polesello S., and Valsecchi S. (2003b): "Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from river sediment: comparison of different extraction techniques", *Chromatographia*, **58**, 145-149.

de Voogt P., de Beer K. and van der Wielen F. (1997): "Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples", *Trends Anal. Chem.* **16**, 584-595.

European Chemicals Bureau (2002): "European Union risk assessment report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol". EUR 20387 EN, Brussel.

ISO 5667-1 (1980): "Water Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes, Geneva.

ISO 5667-12: (1995): "Water Quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediment, Geneva.

ISO 5667-15 (1999): "Water Quality – Sampling – Part 15: Guidance on preservation and handling of sediment samples, Geneva.

Patrolecco L., Capri S., De Angelis S., Polesello S. and Valsecchi S. (2004): "Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by extraction with a non-ionic surfactant (Tween 80)", *Journal of Chromatography A*, **1022**, 1-7.

Petrovic M., Eljarrat E., de Alda M. J. L. and Barcelò D. (2001): "Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments", *Trends Anal. Chem.*, **20**, 637-648.

Valsecchi S., Polesello S. and Cavalli S. (2001): "Recovery of 4-nonylphenol ethoxylates from river sediments by accelerated solvent extraction", *Journal of Chromatography A* **925**, 297-301.

DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO E TOTALE IN MATRICI SOLIDE AMBIENTALI

a cura di Capri S., Patrolecco L. e Pettine M., *IRSA-CNR, Roma*

INTRODUZIONE

Il carbonio organico totale (TOC) rappresenta la somma della frazione organica di carbonio disciolto (DOC) e di quella particolata (POC). La separazione tra queste due frazioni si può effettuare attraverso processi di filtrazione o centrifugazione. Come membrane filtranti si fa in genere ricorso a filtri in fibra

di vetro precombusti aventi una porosità di circa 1 µm. Sebbene il TOC possa essere misurato direttamente mediante l'impiego di analizzatori di carbonio, l'informazione ricavata risulta poco utile dal punto di vista ambientale in quanto non discrimina la natura e il peso delle due differenti frazioni che lo compongono. Il DOC risulta costituito da un insieme eterogeneo di composti organici che include molecole caratterizzate da differenti biodegradabilità. Alcune di esse quali acidi umici e acidi fulvici sono persistenti, mentre altre come gli acidi grassi, i peptidi, i carboidrati, gli amminoacidi sono labili e più o meno facilmente biodegradabili. Il POC è costituito da materiale grossolano di origine animale o vegetale o da composti organici adsorbiti su matrici solide di origine biogenica o minerale.

I livelli di concentrazione di POC e DOC possono essere molto diversi in relazione agli ambienti considerati. In bacini lacustri, piccoli corsi d'acqua e in mare aperto le concentrazioni di POC risultano inferiori al 10% del valore del TOC, mentre in fiumi caratterizzati da elevati tenori di solidi sospesi le concentrazioni di POC possono anche superare quelle del DOC (Thurman, 1985).

Le variazioni nella distribuzione della sostanza organica tra fase disciolta e particolata sono il risultato, oltre che delle caratteristiche originarie dei composti organici che raggiungono il sistema, di una serie di processi fisici, chimici e biologici. Ad esempio, l'incremento della salinità che si osserva in ambienti estuarini determina spesso la flocculazione di materiale organico particolato e colloidale con conseguente rimozione del POC dalla colonna d'acqua e trasferimento al sedimento. Il POC può aumentare, invece, in presenza di elevata produttività algale, passando dal 2-8% del TOC nel periodo autunno-inverno al 10-60% nel periodo primavera-estate (Laane, 1982).

I processi di trasformazione biologica del POC in DOC dipendono dalla sua composizione chimica. Polisaccaridi e polipeptidi, prodotti di escrezione del fitoplancton e/o di lisi cellulare, vengono degradati velocemente, mentre materiale alloctono di origine vegetale o proveniente dal dilavamento dei suoli è caratterizzato da degradazione più difficile e lenta.

I livelli di concentrazione della sostanza organica nello strato fotico di acque marino-costiere si attestano intorno a 1 mg/L come DOC, con valori compresi tra 0,3 e 2 mg/L, mentre al di sotto dello strato fotico il DOC scende a 0,5 mg/L con un intervallo di valori compreso tra 0,2-0,8 mg/L. Il POC, invece, in questi stessi ambienti varia tra 0,01 e 0,1 mg/L (Thurman, 1985).

Nei fiumi maggiori le concentrazioni di POC e DOC sono confrontabili; per il Rio delle Amazzoni, ad esempio, sono stati pubblicati (Degens, 1982) valori medi di 5 mg/L sia per il DOC che per il POC. In fiumi europei (Reno, Loira, Garonna) sono state riscontrate concentrazioni medie simili comprese tra 3,2 e 5,5 per il DOC e 2,0-3,0 mg/L per il POC (Meybeck, 1981). Determinazioni effettuate con frequenza mensile nel corso di una campagna annuale di misure alla foce del

Po, hanno fornito valori medi di DOC e POC pari a 2,1 e 2,4 mg/L, rispettivamente (Pettine et al., 1998).

Le concentrazioni di carbonio organico nei sedimenti fluviali possono variare tra 0,5 e 40%, con i valori più bassi appartenenti a fiumi con elevati tenori di solidi sospesi (>1000 mg/L). In due campagne stagionali (estate 1996-inverno 1997) effettuate lungo l'asta del fiume Po, in corrispondenza della confluenza dei maggiori affluenti, il contenuto di carbonio organico nel sedimento è risultato compreso tra 0,5 e 1,9% con un valor medio intorno a 1% (Patrolecco et al., 2000a).

In una nota precedente (Patrolecco et al., 2000b) è stato descritto un protocollo ottimizzato per la determinazione del carbonio organico disciolto in acque naturali e di scarico. In questo lavoro l'interesse è rivolto alla determinazione del carbonio organico e totale (organico+inorganico) in campioni solidi (particolato, fanghi, sedimenti, suolo).

1 – PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è basato sulla completa e istantanea ossidazione del campione solido per combustione in ambiente arricchito di O₂. Il campione, contenuto in capsule di stagno o argento per la determinazione del carbonio totale o organico, rispettivamente, viene immerso tramite autocampionatore nel reattore di combustione mantenuto a circa 1000°C. I gas derivanti dal processo di combustione (CO₂, NO_x, N₂, H₂O) sono trasportati mediante una corrente di elio (gas di trasporto) attraverso un catalizzatore, costituito da ossidi di alluminio e tungsteno (Al₂O₃-WO₃), che ha la funzione di inibire la formazione di ossidi di azoto (NO_x). La miscela di combustione insieme all'eccesso di ossigeno passa attraverso una colonna di riduzione, costituita da granuli di rame ridotto puro, mantenuta a circa 650°C, dove l'ossigeno in eccesso viene adsorbito e gli ossidi di azoto eventualmente presenti vengono trasformati in azoto elementare. I gas risultanti (CO₂, N₂, H₂O) passano, quindi, attraverso un filtro assorbente (perclorato di magnesio) che trattiene l'acqua, ad una colonna gascromatografica che separa l'N₂ dalla CO₂. La colonna è collegata ad un rivelatore a termoconduttività (TCD), che fornisce un segnale in uscita proporzionale alla quantità dei singoli componenti la miscela.

Dalla misura dell'area del picco cromatografico, corretta del contributo del bianco, si ricava la quantità di carbonio mediante confronto con una curva di taratura ottenuta pesando aliquote di un riferimento tali da avere una risposta lineare nel campo di indagine analitico. In Tab. 1 sono riportati i riferimenti normalmente utilizzati in questo tipo di determinazione, caratterizzati da un diverso contenuto percentuale di carbonio. Questi riferimenti contengono anche altri elementi quali N, H, O e S che possono essere determinati insieme al carbonio con alcuni strumenti. Il riferimento da utilizzare dovrà avere una composizione elementare quanto più possibile simile a quella del campione da analizzare.

Il metodo consente di impiegare piccole quantità di campione (5-20 mg) e di eseguire il dosaggio con rapidità in modo automatizzato.

Tab. 1 - Composizione elementare dei riferimenti utilizzabili

Riferimento	C %	N %	H %	O %	S %
Sulfanilammide	41,84	16,27	4,68	18,58	18,62
Isotiourea	31,35	8,13	4,09	27,85	9,3
Atropina	70,56	4,84	8,01	0	0,2
Acetanilide	71,09	10,36	6,71	11,84	0
Cistina	29,99	11,66	5,03	26,63	26,69
Tiouracile	37,49	21,86	3,15	12,48	25,02
Acido Benzoico	68,85	0	4,95	26,2	0

2 – CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è in grado di determinare le concentrazioni di carbonio organico e totale (organico+inorganico) comunemente riscontrate in diverse matrici solide (particolato, fanghi, sedimenti, suolo). L'intervallo di concentrazione misurabile è variabile in funzione delle condizioni sperimentali (tipo di apparecchiatura impiegata, aliquota di campione dosata) per cui non si ritiene opportuno specificare un campo di applicazione. Il limite di rivelabilità, espresso come tre volte la deviazione standard del bianco (valore medio del bianco = 2,5±0,8 µg di C per n=5 repliche) è di circa 2 µg, corrispondente allo 0,02% di C per un campione solido di 10 mg di peso.

3 – INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Per l'analisi del solo carbonio organico, il carbonio inorganico viene rimosso preliminarmente tramite acidificazione del campione con HCl ultrapuro concentrato direttamente nella capsula di argento, seguita da una fase di riscaldamento a circa 40-50°C della durata di 30 minuti. In questa fase i carbonati trasformati in CO₂ vengono allontanati per volatilizzazione.

Particolare attenzione deve essere posta nell'assicurare la completa saturazione del campione con HCl e nell'evitare perdite di campione dovute allo sviluppo di effervescenza all'interno della capsula.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Per la determinazione del carbonio organico particolato (POC) nel caso di campioni liquidi si deve procedere preliminarmente alla sua separazione dal carbonio organico disciolto (DOC) mediante filtrazione del campione acquoso su filtri in fibra di vetro (porosità circa 1 µm) prepesati, trattati in muffola a 480°C per 4 ore e raffreddati in essiccatore. La filtrazione deve essere effettuata immediatamente dopo il prelievo

utilizzando, generalmente, 1-2 litri di campione. I filtri vengono lavati per tre volte con 20 mL di acqua ultrapura (6.1) per allontanare i sali dal particolato e conservati a -20°C . Al momento dell'analisi determinare il peso secco del materiale solido dopo disidratazione effettuata mediante riscaldamento a circa 50°C per un tempo sufficiente (1-3 ore) al raggiungimento della costanza di peso.

Per campioni solidi (fanghi, sedimenti, suoli) è preferibile utilizzare contenitori di polietilene ad alta densità che presentano, rispetto ai recipienti di vetro, il vantaggio di un più agevole trasporto. I contenitori di polietilene impiegati per il campionamento vanno preliminarmente trattati con HNO_3 1,5 M ultrapuro (6.5) in stufa a 50°C per un'ora per l'eliminazione di eventuali impurezze organiche, quindi sciacquati più volte con acqua ultrapura (6.1).

Qualora non fosse possibile effettuare l'analisi immediatamente, conservare il materiale solido mediante congelamento a -20°C . Al momento dell'analisi determinare il peso secco del materiale solido dopo disidratazione per riscaldamento, adottando modalità analoghe a quelle descritte in precedenza per i filtri.

In alternativa alla disidratazione per riscaldamento si può procedere alla liofilizzazione del campione.

5 – APPARECCHIATURE

5.1 – Normale attrezzatura di laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori di materiale plastico dovranno essere preventivamente trattati secondo le modalità indicate al punto 4 "Campionamento e conservazione del campione".

5.2 – Analizzatore elementare C/N/S

Utilizza la tecnica della combustione catalitica ad alta temperatura ed è costituito da un reattore di combustione, un reattore di riduzione, un filtro e una colonna gascromatografica collegata ad un rivelatore a conducibilità termica (Fig. 1).

5.3 – Dispositivo per l'erogazione di ossigeno ultrapuro

Serve a far avvenire una combustione violenta e completa del campione nel reattore di combustione.

5.4 – Dispositivo per l'erogazione di elio ultrapuro

Serve come gas di trasporto nell'analisi dei prodotti di combustione. Il controllo della linea di base strumentale consente di verificare la purezza dei gas utilizzati per la combustione e il trasporto.

5.5 – Dispositivo per l'erogazione di aria compressa (eventuale)

Serve per l'azionamento automatico dell'autocampionatore.

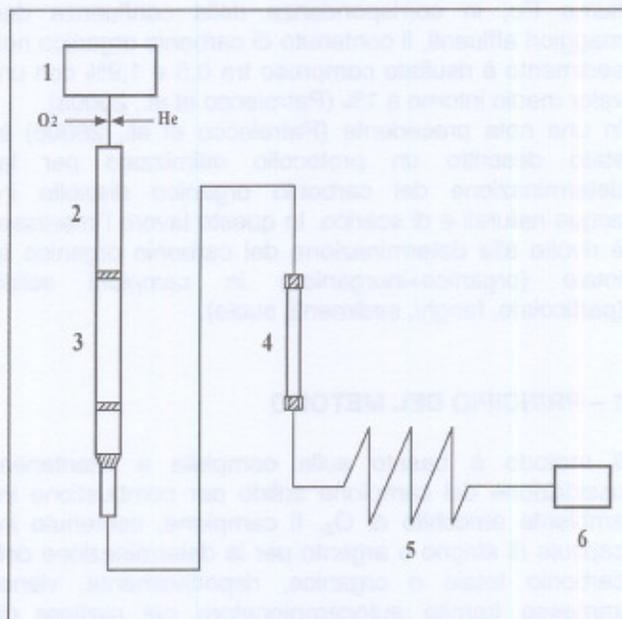


Fig. 1 – Schema di analizzatore elementare.

1: Autocampionatore; 2: reattore di combustione; 3: reattore di riduzione; 4: filtro; 5: colonna gascromatografica; 6: rivelatore a termoconduttività.

6 – REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro per analisi in tracce.

6.1 – Acqua ultrapura

Utilizzare acqua esente da CO_2 per la preparazione delle soluzioni acide, per il lavaggio dei filtri e per il risciacquo finale della vetreria, avendo cura di evitare al massimo il contatto con l'aria.

6.2 – Acido cloridrico concentrato HCl ($d=1,19$)

6.3 – Acido cloridrico 6 M

Viene preparato per diluizione con acqua ultrapura (6.1) del reattivo di cui al punto 6.2.

6.4 – Acido nitrico concentrato HNO_3

6.5 - Acido nitrico 1,5 M

Viene preparato per diluizione con acqua ultrapura (6.1) del reattivo di cui al punto 6.5.

6.6 – Riferimento (vedi Tab.1)

Deve essere conservato in essiccatore fino al momento dell'analisi.

6.7 – Materiale per il riempimento dei reattori di combustione e di riduzione (ossidi di alluminio e tungsteno, lana di quarzo, rame ridotto puro in granuli).

I reattori sono costituiti da tubi di quarzo impaccati. Il catalizzatore (ossidi di alluminio e tungsteno) può essere riutilizzato per più cicli di analisi (per un totale di circa 100-150 campioni), mentre il rame ridotto deve essere sostituito più frequentemente (circa ogni 40-50 campioni, in dipendenza della tipologia di campione analizzato).

Le modalità di riempimento devono essere quelle consigliate dalla ditta costruttrice dell'apparecchio analizzatore.

6.8 – Perclorato di magnesio

Deve essere conservato in essiccatore fino al momento dell'analisi.

7 – PROCEDIMENTO

Le differenze tra le varie apparecchiature (5.2) disponibili sul mercato non consentono una codifica dettagliata di istruzioni adatte ad ogni tipo di strumento. Quindi per l'attivazione e l'ottimizzazione dei parametri strumentali attenersi alle indicazioni riportate nel manuale dello strumento che indica, di norma, anche le condizioni più appropriate per l'esecuzione delle analisi.

Dopo aver portato l'analizzatore a regime per ciò che riguarda il flusso di ossigeno e di elio, la temperatura dei reattori, la parte elettronica, ecc., introdurre il campione nell'apparecchiatura. I reattori di combustione e riduzione contenenti il catalizzatore e il rame puro ridotto sono disponibili in commercio, oppure possono essere preparati manualmente in laboratorio per impaccamento di tubi di quarzo, attenendosi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7.1 – Taratura

Costruire la curva di taratura all'inizio di ogni ciclo analitico riportando le aree integrate, ottenute utilizzando quantità diverse del riferimento, scelto in base alle indicazioni fornite al punto 1, in funzione della quantità di carbonio. Le quantità del riferimento da pesare vengono scelte all'interno del campo di linearità dello strumento nell'intervallo di valori attesi per le quantità di carbonio nei campioni, in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione dei dati.

Verificare ad intervalli regolari la validità della curva di taratura, inserendo, in una serie di campioni, l'analisi di

un bianco (capsula pulita vuota o, nel caso del materiale particolato, capsula contenente un filtro pulito e polverizzato) e di un riferimento (6.6).

7.2 – Analisi

7.2.1 – Carbonio totale

I campioni disidratati secondo le modalità descritte al punto 4 e ripuliti da eventuali residui grossolani (nel caso di sedimenti eliminare frammenti di alghe, gusci di conchiglie, ecc.) vengono, quando necessario, omogeneizzati in un mortaio d'agata fino ad ottenere una polvere finissima. 10-20 mg della polvere vengono pesati accuratamente ($\pm 0,01$ mg), utilizzando una microbilancia analitica, in capsule di stagno (9x5 mm). Procedere quindi alla chiusura delle capsule secondo quanto previsto nel manuale d'uso dello strumento ed introdurle nel reattore di combustione.

Effettuare l'analisi strumentale adottando le stesse condizioni operative utilizzate per la curva di taratura.

7.2.2 – Carbonio organico

La determinazione del carbonio organico viene effettuata eliminando preliminarmente il carbonio inorganico mediante acidificazione del campione. In questo caso pesare il campione in capsule di argento seguendo le modalità riportate al paragrafo precedente, aggiungere quindi 20 μ L di HCl 6 M ultrapuro (6.3) e riscaldare a circa 40-50°C per 30 minuti per facilitare l'eliminazione dei carbonati sotto forma di CO₂. Ripetere il trattamento acido fino a scomparsa dell'effervescenza. Generalmente è sufficiente ripetere tre volte detta operazione per avere una rimozione completa del carbonio inorganico.

Le capsule di argento sono più resistenti all'acido cloridrico rispetto sia alle capsule di stagno, che subiscono una parziale dissoluzione, sia a quelle di alluminio, che diventano fragili se esposte all'azione dell'acido cloridrico concentrato. La concentrazione di acido scelta (6 M) si è rivelata ottimale ai fini di una rimozione completa di tutto il carbonio inorganico da campioni ricchi in carbonati, assicurando una migliore riproducibilità delle misure. La temperatura utilizzata (40-50°C) consente di minimizzare eventuali perdite di sostanze organiche volatili e risulta particolarmente indicata per l'analisi di biota e materiale sospeso.

Dopo aver chiuso le capsule e averle inserite nell'autocampionatore, procedere all'analisi strumentale adottando le stesse condizioni operative utilizzate per la curva di taratura.

8 – CALCOLI

L'area del picco, corretta del valore del bianco consente di ricavare dalla curva di taratura la quantità di carbonio totale o organico, a seconda che si sia seguita la procedura 7.2.1 o 7.2.2., presente nel materiale solido. Lo strumento può essere dotato di un "software" gestionale che, rapportando la quantità di

carbonio determinata al peso di solido analizzato, consente di avere direttamente le risposte in termini di concentrazione.

Nell'analisi del POC, il bianco è costituito da un filtro in fibra di vetro del tipo impiegato per la separazione del materiale particolato dalla matrice acquosa, pretrattato e sottoposto ad una procedura di analisi identica a quella utilizzata per i campioni.

Nell'analisi di altre matrici solide (fanghi, sedimenti, suolo) il bianco è rappresentato da una capsula di stagno o di argento vuota, a seconda che si stia determinando il carbonio totale o organico, rispettivamente.

I risultati vengono espressi come percentuale di carbonio riferito al peso secco; nel caso di analisi di materiale particolato possono essere espressi anche come concentrazione (mg/L) nel campione di acqua filtrato.

Il carbonio inorganico (IC) viene determinato facendo la differenza tra il valore del carbonio totale (TC) e quello del carbonio organico (OC):

$$IC = TC - OC$$

9 - QUALITÀ DEL DATO

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

Prove effettuate (n=5) nel nostro laboratorio su particolato fluviale con contenuto di carbonio compreso tra 1,0 e 18% hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 2,3% per il carbonio totale e l'1,8% per il carbonio organico.

APPLICAZIONI DEL PROTOCOLLO ANALITICO A MATRICI REALI

Il protocollo analitico precedentemente descritto è stato applicato, nel corso di alcune indagini ambientali

condotte dall'IRSA negli ultimi anni, all'analisi elementare di matrici solide di diversa origine e composizione. Ne vengono, di seguito, riportati alcuni esempi:

a) materiale particolato fluviale, raccolto nel tratto terminale del fiume Po e della zona di foce nel corso di un'indagine svolta nell'ambito di un progetto multidisciplinare di ricerca e sperimentazione per la salvaguardia del mare Adriatico (PRISMA); in questo studio le informazioni ottenute attraverso l'applicazione dell'analisi elementare hanno consentito di stimare l'apporto di carbonio organico ed inorganico convogliato a mare dal fiume Po;

b) sedimento fluviale, prelevato, nell'ambito di uno studio di caratterizzazione chimica e tossicologica condotto sui sedimenti del fiume Po, in sezioni localizzate a valle della confluenza dei principi immissari; in questo caso l'analisi degli elementi ha consentito, tramite l'utilizzo del rapporto C_{org}/N_{org} come tracciante, di formulare alcune ipotesi sull'origine e sulla qualità del materiale organico sedimentario;

c) materiale particolato lacustre, prelevato nell'ambito di un progetto di monitoraggio condotto per un anno in due laghi subalpini italiani, il Mezzola, situato tra le province di Como e Sondrio e il Pusiano, situato tra i due rami del lago di Como; in questo studio è stata esaminata sia la composizione delle particelle sedimentanti, e quindi il ruolo contributivo delle componenti organiche e inorganiche, sia i flussi di sedimentazione degli elementi principali, con l'intento di migliorare le conoscenze sui processi biochimici che avvengono durante il trasporto di materia attraverso la colonna d'acqua fino al sedimento;

d) sedimento marino proveniente dalle acque costiere del Mar Adriatico, prelevato nell'ambito del progetto multidisciplinare di ricerca PRISMA.

e) fanghi essiccati, provenienti da un impianto di trattamento di reflui urbani (Bari Ovest) e destinati all'inceneritore. In questo studio la caratterizzazione chimica del fango, che comprendeva l'analisi elementare dei solidi volatili (C,N,H,S,O) ha costituito la base per l'impostazione dei bilanci di materia e di energia e ha permesso di predire la composizione dei gas effluenti oltre che la valutazione del potere calorifico del fango alimentante.

f) suolo, proveniente dallo strato superficiale (0-15 cm) di un sito sperimentale localizzato a Monza (MI) utilizzato per esperimenti di degradazione di pesticidi.

In Tab. 2 sono riportati il contenuto percentuale medio, lo scarto tipo e l'intervallo di variabilità di carbonio totale, organico, inorganico (ottenuto per differenza dei primi due) e di azoto nelle diverse matrici ambientali analizzate.

Tab. 2 – Carbonio totale, organico, inorganico e azoto in diverse matrici ambientali

MATRICE	CAMPIONI ANALIZZATI	CARBONIO TOTALE (%)	CARBONIO ORGANICO (%)	CARBONIO INORGANICO (%)	AZOTO (%)	Riferimento Bibliografico
PARTICOLATO FLUVIALE	n=50	8,3±4,5 3,4 - 21	6,4±4,4 0,9 - 18	1,9±0,7 0,5 - 4,0	0,94±0,72 0,12 - 3,31	Pettine M. et al., 1998
SEDIMENTO FLUVIALE frazione <63 µm	n=20		1,71±0,47 1,4-2,73		0,21±0,06 0,13 - 0,37	Patrolecco L. et al., 2000a
PARTICOLATO LACUSTRE	n=36 n=36	16,2±3,0 11,3 - 22,7	11,1±4,0 2,7 - 15,8 1,9±0,9 0,5 - 4,3	5,0±2,8 1,3 - 11	1,49±0,47 0,51 - 2,12 0,23±0,11 0,05 - 0,47	Pettine M. et al., 2000
SEDIMENTO MARINO	n=10	2,8±0,06 2,5 - 2,9	1,33±0,08 1,0 - 1,4		0,15±0,02 0,02 - 0,16	Patrolecco L., dati non pubblicati
FANGHI URBANI	n=24	36,4±1,3 32,3 - 39,2	35,4±2,5 31,4 - 38,5	0,9±0,2 0,57 - 1,21	4,5±0,3 3,48 - 4,77	Braguglia C.M. et al., 2002
SUOLO	n=44	2,5±0,05 2,4-2,5	2,4±0,11 2,0-2,6		0,34±0,078 0,54-0,21	Barra Caracciolo A. e Grenni P., dati non pubbl.

BIBLIOGRAFIA

Braguglia C.M., Marani D. and Mininni G. (2002): "Comportamento e destino dei metalli pesanti nel processo d'incenerimento", *RS Rifiuti Solidi*, **XVI**, 8.

Degens E.T. (1982): "Transport of carbon and minerals in major world rivers", Part 1, Proceedings of a Workshop arranged by Scientific Committee on problems of the Environment (SCOPE) and the United Nations Environment Programme (UNEP) a Hamburg University, March 1982, 8-12.

Laane R.W.P.M (1982): "Chemical characteristics of the organic matter in the water phase of the Eems-Dollant Estuary", *Biologisch Onderzoek Eems-Dollart Estuarium*, Publicaties en Verslagen 6, Institute of Sea Research, Netherlands.

Meybeck M. (1981): "River transport of organic carbon to the ocean" in: Flux of organic carbon by rivers to the oceans, Lykens G.E. ed., 219-269, Y.S. Department of Energy, NTIS Report, Conf-8009140, Springfield, Virginia.

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio (2002): "Metodologie analitiche di riferimento", in collaborazione con ICRAM e ANPA, scheda 4 "Analisi di carbonio totale e organico (Metodo analizzatore elementare)".

Patrolecco L., Viganò L., Valsecchi S. and Tartari G. (2000a) "Caratterizzazione dei sedimenti e qualità ecologica nel fiume Po", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **113**, 19-49.

Patrolecco L., Pettine M. and Capri S. (2000b): "Determinazione del carbonio organico disciolto in acque naturali e di scarico", *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, febbraio, 14-20.

Pettine M., Patrolecco L., Camusso M. and Crescenzo S. (1998): "Transport of carbon and nitrogen to the Northern Adriatic sea by the Po river", *Est. Coast. Shelf Sci.*, **46**, 127-142.

Pettine M., Patrolecco L., Prina M., Quattrin B. and Tartari G. (2000): "Particle composition and sedimentation rates in two Italian subalpine lakes", *Annali di Chimica*, **90**, 307-322.

Thurman E.M. (1985) "Organic geochemistry of natural waters", M. Nishoff/W. Junk Publishers.

DETERMINAZIONE DI AMMONIACA ED AZOTO ORGANICO: CONFRONTO TRA IL METODO KJELDHAL E LA DETERMINAZIONE STRUMENTALE CON L'ANALIZZATORE TOTAL NITROGEN (TN)

a cura di Mascolo G., Bagnuolo G., Ciannarella R., Rapanà N. e Cammarota M., *IRSA-CNR, Bari*

RIASSUNTO

In questa nota vengono riportati i risultati di una sperimentazione avente l'obiettivo di confrontare la determinazione dell'azoto totale (ammoniaca e azoto organico), effettuata con il tradizionale metodo Kjeldhal, con un metodo strumentale, molto più veloce e pratico, che utilizza un analizzatore di azoto totale (TN). In particolare, sono state eseguite determinazioni in parallelo con le due procedure su diverse soluzioni sintetiche e su un refluo urbano. I risultati hanno mostrato che le determinazioni con entrambe le procedure danno, nell'ambito dell'errore sperimentale, risultati equivalenti e, pertanto, la determinazione dell'azoto totale può essere più velocemente effettuata utilizzando l'analizzatore TN. In tal caso l'azoto organico può essere determinato come differenza tra l'azoto totale e le forme inorganiche dell'azoto (ammoniaca, nitriti e nitrati) che possono essere determinate mediante i metodi tradizionali (spettrofotometria, cromatografia ionica).

SUMMARY

In the present article are reported the results of an experimental investigation carried out with the aim of comparing the determination of ammonia and organic nitrogen with two methods. The first method is the traditional Kjeldhal and the second one is that employing a total nitrogen analyzer. In particular, determinations with both protocols have been performed using several synthetic solutions and a municipal wastewater. The results have showed that the determinations with both protocols are equivalent and, therefore, the measurement of total nitrogen can be performed by using the TN analyzer whose procedure is known to be much faster than the Kjeldhal one. In such a circumstance, the organic nitrogen can be obtained by the difference between the total nitrogen and the inorganic forms of nitrogen (ammonia, nitrite, nitrate) that can be measured by traditional methods using spectrophotometry and/or ion chromatography.

INTRODUZIONE

Le forme più importanti di azoto nelle acque superficiali e di scarico sono, in ordine decrescente di

stato di ossidazione, il nitrato, il nitrito, l'azoto organico e l'ammoniaca. L'azoto organico include sostanze naturali quali proteine, acidi nucleici, urea e numerose sostanze organiche sintetiche. In quantità eccessiva il nitrato contribuisce ad una malattia nei bambini nota come metemoglobinemia. Infatti, negli USA l'agenzia per la protezione ambientale (EPA) ha imposto un valore di concentrazione massima per il nitrato di 10 mg/L. Il nitrito, che è uno stato di ossidazione intermedio dell'azoto durante l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrato, può entrare nell'ambiente attraverso il suo uso come inibitore della corrosione in acque per processi industriali ed è anche un precursore nella formazione delle nitrosoammine, noti agenti cancerogeni. L'ammoniaca è naturalmente presente nelle acque superficiali e di scarico ed in alcuni impianti di trattamento di liquami è usato come additivo per mantenere il cloro residuo entro certi livelli di concentrazione.

Analiticamente, l'ammoniaca e l'azoto organico sono normalmente determinati, sia singolarmente che insieme, mediante una tecnica denominata Azoto Totale Kjeldhal (TKN) (metodiche 4030 e 5030 riportate nel volume "Metodi Analitici per le Acque" APAT-IRSA, 2003). Tale metodo è anche noto essere piuttosto dispendioso in termini di tempo in quanto prevede una digestione a caldo ed una successiva titolazione.

Recentemente sono stati immessi sul mercato delle strumentazioni che consentono di ottenere la misura dell'azoto totale molto più velocemente e senza manipolazioni del campione. In tali strumentazioni avviene una combustione catalitica del campione acquoso ad alta temperatura e successiva rivelazione del biossido di azoto formato mediante chemiluminescenza. Inoltre, in alcune strumentazioni vi è la possibilità di misurare contemporaneamente sia il carbonio organico che l'azoto totale.

In questa nota sono state confrontate, per diversi campioni sintetici ed un refluo urbano, le misure dell'azoto totale effettuate con un tale analizzatore strumentale con quelle ottenute secondo le metodiche ufficiali APAT-IRSA 4030C e 5030 che utilizzano il metodo Kjeldhal. In particolare le prove effettuate in parallelo sono state le seguenti:

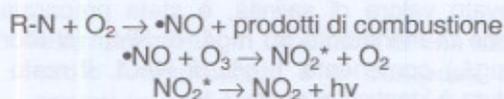
- determinazione, in triplicato, di una soluzione di riferimento di azoto ammoniacale;
- determinazione, in triplicato, di una soluzione di riferimento di azoto ammoniacale in presenza di una notevole quantità di NaCl (al fine di verificare l'influenza della forza ionica della soluzione sulla misura dell'azoto ammoniacale);
- determinazione, in triplicato, di una miscela di azoto ammoniacale e di composti organici azotati;
- determinazione, in triplicato, di una miscela di azoto ammoniacale e di composti organici azotati in presenza di una notevole quantità di NaCl (al fine di verificare l'influenza della forza ionica della soluzione sulla misura delle due forme di azoto);

- determinazione, in triplicato, dell'azoto ammoniacale ed organico di un refluo urbano.

1 – PRINCIPIO DELLE METODICHE

Le determinazioni di ammoniaca ed azoto organico con il metodo Kjeldhal si riferiscono alle metodiche 4030C e 5030 riportate nel volume "Metodi Analitici per le Acque" (APAT-IRSA, 2003).

La determinazione mediante analizzatore TN consiste in una combustione catalitica del campione acquoso ad alta temperatura (720°C) e successiva rivelazione mediante chemiluminescenza. In breve, durante la combustione l'azoto contenuto nelle sostanze, organiche ed inorganiche, viene trasformato in ossido di azoto (NO). L'NO viene fatto reagire con ozono (O₃) formando biossido di azoto (NO₂^{*}) in uno stato eccitato. L'NO₂^{*} successivamente decade allo stato fondamentale emettendo luce nell'intervallo 590-2500 nm. Le reazioni chimiche in gioco sono le seguenti:



2 – CAMPO DI APPLICAZIONE

Entrambe le procedure consentono di determinare le concentrazioni comunemente riscontrate in diverse matrici acquose (acque di scarico, superficiali e di mare). In particolare per la procedura con il metodo Kjeldhal vale quanto riportato nel paragrafo 2 (campo di applicazione) dei metodi 4030C e 5030. Per quanto concerne la determinazione strumentale con l'analizzatore TN è possibile determinare concentrazioni di azoto superiori a 0,1 mg/L.

3 – INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Per la procedura con il metodo Kjeldhal vale quanto riportato nel paragrafo 3 (interferenze e cause di errore) dei metodi 4030C e 5030. Per quanto riguarda la determinazione strumentale con l'analizzatore TN è necessario tenere presente che la filtrazione del campione, operazione necessaria per eliminare il materiale in sospensione, può comportare un'alterazione del valore misurato di azoto totale in funzione delle proprietà chimico-fisiche dei composti azotati presenti nel campione che possono adsorbirsi al filtro utilizzato. Inoltre, è possibile che sostanze azotate presenti nel filtro possano essere desorbite durante la procedura di filtrazione. Pertanto, è opportuno valutare il contributo dovuto al filtro analizzando degli opportuni bianchi di filtrazione. Infine, contaminazioni possono derivare dai reagenti, dalla vetreria e dai materiali utilizzati. Tutto il materiale deve essere opportunamente testato prima dell'uso.

4 – CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Per la procedura con il metodo Kjeldhal vale quanto riportato nel paragrafo 4 (campionamento e conservazione del campione) dei metodi 4030C e 5030. Per quanto riguarda la determinazione strumentale con l'analizzatore TN vale quanto riportato nel paragrafo 4 (campionamento e conservazione del campione) del metodo 5040 (carbonio organico) e nel medesimo paragrafo del metodo "Determinazione del carbonio organico disciolto in acque naturali e di scarico" riportato nel Notiziario dei metodi analitici del febbraio 2000.

5 – APPARECCHIATURE

Per la procedura con il metodo Kjeldhal vale quanto riportato nel paragrafo 5 (apparecchiature) dei metodi 4030C e 5030.

5.1 - Analizzatore di azoto totale

La strumentazione utilizza la tecnica della combustione catalitica ad alta temperatura (720°C) e successiva rivelazione mediante chemiluminescenza.

5.2 - Dispositivo per l'erogazione di aria purissima, esente da CO₂ e idrocarburi.

Utilizzare aria 4.0 (purezza 99,99) ed una trappola per la CO₂. Il controllo della linea di base strumentale consente di verificare se l'aria utilizzata è di purezza sufficiente.

6 – REATTIVI

Per la procedura con il metodo Kjeldhal vale quanto riportato nel paragrafo 6 (reattivi) dei metodi 4030C e 5030.

I reattivi utilizzati per la determinazione strumentale con l'analizzatore TN sono di seguito riportati.

6.1 - Acqua ultrapura

Per la preparazione dei bianchi e delle soluzioni di riferimento utilizzare acqua ultrapura, cioè proveniente da opportuni sistemi di purificazione alimentati da acqua deionizzata.

6.2 - Soluzione concentrata di riferimento contenente 100 mg/L di N-NO₃

Sciogliere 0,607 g di nitrato di sodio, NaNO₃, puro per analisi, in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 1000 mL. La soluzione è stabile per due mesi. In alternativa è possibile utilizzare soluzioni concentrate di riferimento già pronte reperibili in commercio.

TOC). In tal caso, qualora sia necessario conoscere la quantità delle varie forme di azoto (azoto ammoniacale, azoto organico, nitrati e nitriti) occorre procedere come segue:

- effettuare la misura di azoto totale con il TN;
- effettuare la misura di azoto ammoniacale con un metodo spettrofotometrico o con il cromatografo ionico;
- effettuare la misura di nitrati e nitriti con il cromatografo ionico;
- calcolare l'azoto organico per differenza tra l'azoto totale e la somma delle forme di azoto inorganico.

Tale procedura impiega l'uso di strumentazioni molto efficienti ed è comunque più veloce della procedura tradizionale Kjeldhal.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the examination of water and wastewater", XX Ed., Washington, APHA).

APAT-IRSA (2003): "Metodi analitici per le acque", Manuali e Linee Guida 29/2003, APAT, Roma.

Shimadzu (2001): "Total Nitrogen Analysis: A New Perspective on TOC", application note.

istituto di ricerca sulle acque - cnr

NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a Quaderni, 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma

Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta

Segreteria di redazione: G. Barbiero

Stampato in proprio

Grafica: M. Ronda

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: A. Priori