



Editoriale

In questo secondo numero del 2017 del Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News vengono presentati, nella prima sezione, quattro metodi per la determinazione di parametri chimici dei quali tre di tipo chimico-analitico relativi a microinquinanti organici ed uno relativo ad un parametro di tipo integrale.

I tre contributi di tipo chimico-analitico impiegano le più moderne tecniche strumentali quali la cromatografia liquida interfacciata alla spettrometria di massa (HPLC-MS) e riguardano, il primo, la determinazione in due matrici ambientali (biota e sedimento) di una categoria di inquinanti organici emergenti e caratterizzati da una elevata persistenza nell'ambiente: gli acidi perfluoroalchil carbossilici (PFCA) e gli acidi perfluoroalchil solfonici (PFSA). Il secondo metodo riguarda la determinazione in acque superficiali di un'altra categoria di inquinanti organici, le microcistine e la nodularina, che fanno parte delle cianotossine e che sono più frequentemente note tra le tossine identificate nei corpi idrici di acque dolci durante gli eventi di bloom algale. Il terzo contributo di tipo chimico-analitico riguarda la determinazione dell'erbicida glifosate e del suo principale metabolita, l'acido aminometilfosfonico, a livello di sub-microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$) in campioni di acqua superficiale mediante derivatizzazione con fluorenilmetilcloroforniato e successiva analisi con HPLC-MS in alta risoluzione.

Viene inoltre presentato un quarto contributo dedicato alla proposta di un protocollo per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) operando con volumi ridotti e per via spettrofotometrica. La possibilità di utilizzare piccoli volumi, oltre all'economicità, presenta il vantaggio di ridurre notevolmente l'impiego di composti a base di cromo.

Nella seconda sezione (News) trovano spazio la presentazione di una tesi di dottorato svolta all'interno dell'Istituto e la presentazione del progetto di ricerca "MANGIAFANGHI" finalizzato alla riduzione dei fanghi durante la depurazione delle acque di scarico, recentemente finanziato dalla Regione Puglia nell'ambito del programma regionale a sostegno della specializzazione intelligente e della sostenibilità sociale ed ambientale - Intervento "Cluster tecnologici regionali"- FSC 2007/2013.

Un ultimo avviso riguarda la pubblicazione di una Linea Guida, redatta a cura di personale dell'Istituto, ISPRA e del Sistema Nazionale della Protezione Ambientale, riguardante il calcolo dei Valori di Fondo per i corpi idrici sotterranei.

In questo numero:

Determinazione di acidi perfluoroalchilici in biota e sedimento mediante LC-MS/MS accoppiata alla purificazione online degli estratti tramite *Turbulent Flow Chromatography* **2**

Determinazione di microcistine e nodularina in acque superficiali mediante SPE online - HPLC/MS-MS **13**

Determinazione del COD in provette da 5 mL per via spettrofotometrica **16**

Determinazione di Glifosate e Acido aminometilfosfonico (AMPA) mediante derivatizzazione ed analisi HPLC-MS in alta risoluzione **21**

News:

Modelli pore-scale di flusso e trasporto reattivo nei mezzi porosi (Tesi di Dottorato) **30**

Il Progetto MANGIAFANGHI per la riduzione dei fanghi della depurazione delle acque di scarico **33**

Linee guida recanti la procedura da seguire per il calcolo dei valori di fondo per i corpi idrici sotterranei **34**

Determinazione di acidi perfluoroalchilici in biota e sedimento mediante LC-MS/MS accoppiata alla purificazione on-line degli estratti tramite Turbulent Flow Chromatography

a cura di

Michela Mazzoni, Dipartimento di Scienze Teoriche ed Applicate, Università degli Studi dell'Insubria - Como

Sara Valsecchi (*), Stefano Polesello, Marianna Rusconi, Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Brugherio (MB)

RIASSUNTO

È stato sviluppato un metodo per l'analisi di 8 acidi perfluoroalchil carbossilici (PFCA) da 5 a 12 atomi di carbonio e 3 acidi perfluoroalchil solfonici (PFSA) di 4, 6 e 8 atomi di carbonio in matrici ambientali (biota e sedimento). Il metodo consiste nell'estrazione a freddo con acetonitrile e ultrasuoni del campione e in una successiva purificazione online dell'estratto tramite Turbulent Flow Chromatography (TFC) accoppiata all'analisi con Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). La quantificazione viene effettuata mediante diluizione isotopica con standard di riferimento marcati con isotopi stabili.

Per alcuni campioni biologici, molto ricchi in fosfolipidi, è necessaria una purificazione ulteriore off-line mediante l'utilizzo di cartucce HybridSPE® Phospholipid Ultra.

La linearità è accettabile in un intervallo di due ordini di grandezza (tra 0,5 e 50 µg/L per PFUnDA e PFDoDA e tra 1 e 100 µg/L per gli altri composti), e le percentuali di recupero dei composti in campioni di mollusco sono compresi tra 98 e 133% per i PFCA e tra 40 e 60% per i PFSA. I limiti di rivelabilità e quantificazione del metodo (MLD e MLQ) variano tra 0,03 a 0,3 ng/g peso fresco (p.f.) e da 0,1 a 0,9 ng/g p.f. rispettivamente. La ripetibilità (precisione *intra-diem*) è caratterizzata da RSD tra 3 e 13%, mentre la riproducibilità (precisione *inter-dies*) tra 4 e 27%.

Questo metodo, che prevede un'alta automazione e poche fasi di manipolazione del campione, permette un'elevata produttività analitica in programmi di monitoraggio ambientale intensivi ed estensivi.

SUMMARY

A new method was developed for the analysis of 8 perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) from 5 to 12 carbon atoms and 3 perfluoroalkyl sulfonic acids (PFSA) of 4, 6 and 8 carbon atoms in environmental samples (biota and sediment). The method includes sonicated-assisted extraction with acetonitrile and the purification online of the extract by Turbulent Flow Chromatography (TFC) coupled to the analysis with Ultra High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). The quantitation is performed by isotopic dilution using stable isotope labelled standards.

In biological samples the phospholipids are further removed using Ultra HybridSPE® Phospholipid cartridges.

The linearity, in a range of two orders of magnitude (between 0.5 and 50 µg/L to PFUnDA and PFDoDA and between 1 and 100 µg/L for the other compounds), was good and the recoveries of the compounds in mussel samples are comprised between 98 and 133% for PFCA and between 40 and 60% for the PFSA. MLD and MLQ vary between 0.03 and 0.3 ng/g ww and from 0.1 to 0.9 ng/g ww, respectively. The repeatability (intra-day precision) shows RSD from 3 to 13% while the reproducibility (inter-day precision) from 4 to 27%.

This method, which provides a high automation and limits sample manipulation, allows a high analytical productivity in environmental monitoring programs.

INTRODUZIONE

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) sono composti prodotti dal 1950 e utilizzati in molte applicazioni industriali e in prodotti di uso comune (come vernici, capi di abbigliamento, contenitori di cibo etc..) (Lindstrom, Strynar, and Libelo 2011). I PFAS comprendono migliaia di sostanze ma gli studi ambientali si sono concentrati sugli acidi perfluoroalchilici (PFAA) che si distinguono per avere una catena carboniosa

completamente fluorurata ed un gruppo idrofilo terminale. Essi comprendono la famiglia degli acidi perfluorocarbossilici (PFCA) e quella degli acidi perfluorosolfonici (PFSA) delle quali fanno parte rispettivamente l'acido perfluorooctanoico (PFOA) e l'acido perfluoroottansolfonico (PFOS) (Buck et al. 2011).

A causa della loro alta persistenza in ambiente, dell'ampia distribuzione in tutti i comparti e della loro capacità di bioaccumulo (Ahrens and Bundschuh 2014) l'Unione Europea ha provveduto alla loro rego-

* valsecchi@irsa.cnr.it

lamentazione; in particolare, il PFOS è stato inserito nella lista delle sostanze pericolose prioritarie che devono essere monitorate nei corpi idrici europei e ha stabilito nella Direttiva 2013/39/UE lo standard di qualità ambientale nei pesci (9,1 ng/g p.f.).

La quantificazione dei PFAA nel biota però è resa difficoltosa dalla composizione della matrice che può interferire sulla ionizzazione dei composti, causando una soppressione o un incremento anomalo del segnale (Trufelli et al. 2011). In particolare, i fosfolipidi possono esercitare un effetto marcato sulla ionizzazione e sulla desolvatazione dei PFAA nelle sorgenti elettrospray (ESI) (King et al. 2000).

L'influenza della matrice può essere mitigata nelle fasi di preparazione del campione, ad esempio introducendo una fase di purificazione dopo l'estrazione. La cromatografia a flusso turbolento (*Turbulent Flow Chromatography* - TFC) è una tecnica introdotta fin dagli anni '90 per l'analisi di fluidi biologici accoppiando la separazione cromatografica alla purificazione del campione, basata sull'esclusione di grosse molecole (maggiori di 8000 - 10000 Da), come le proteine presenti nella matrice. Il campione è iniettato con un flusso ad alta velocità (maggiore di 1 mL/min) in una colonna impaccata con particelle di grosso diametro (30-60 µm) che presentano pori funzionalizzati. Nonostante l'alta velocità del flusso, vicino alla fase stazionaria persiste una zona a flusso laminare, dove le forze di diffusione dominano il processo di trasferimento; le molecole più piccole, che diffondono più velocemente di quelle grandi, riescono quindi ad interagire con le particelle della fase stazionaria e legarsi ai gruppi funzionali che rivestono i pori, mentre le molecole più grandi vengono eliminate nello scarico (Núñez et al. 2012). Poiché le colonne per la cromatografia a flusso turbolento hanno una bassa risoluzione cromatografica, in anni recenti sono state utilizzate accoppiate a colonne di separazione analiti-

ca per ottenere metodi ad alta produttività, alta riproducibilità e buona purificazione in tempi brevi e senza manipolazione del campione (Valsecchi et al. 2015).

In questo articolo viene presentato un metodo per la determinazione LC-MS/MS di acidi perfluoroalchilcarbossilici da 5 a 12 atomi di carbonio e acidi perfluoroalchilsolfonici con 4, 6 e 8 atomi di carbonio in matrice biologica e sedimento dopo purificazione on-line TFC (Tabella 1). La cromatografia a flusso turbolento e l'estrazione a freddo permettono di ridurre le fasi di manipolazione del campione ed ottenere, quindi, un metodo ad alta produttività analitica, adatto ad essere implementato in programmi di monitoraggio ambientale, secondo i requisiti richiesti dalla Direttiva 2013/39/UE (Mazzoni et al., 2015).

1. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consente di determinare la concentrazione di 11 acidi perfluoroalchilici (otto acidi carbossilici, da 5 a 12 atomi di carbonio, e tre solfonici, da 4, 6 e 8 atomi di carbonio) in campioni di materiale biologico e sedimento freschi. L'estrazione avviene a freddo con acetonitrile e ultrasuoni mentre la purificazione degli estratti è eseguita "in-linea" con la tecnica "*Turbulent Flow Chromatography*" che prevede un flusso ad alta velocità e l'utilizzo di una colonna impaccata con particelle di grosso diametro con pori funzionalizzati che permettono la ritenzione delle molecole di interesse e l'eliminazione delle macromolecole biologiche. In seguito gli analiti sono eluiti con metanolo e separati su fase stazionaria pentafluorofenilica prima della rivelazione mediante spettrometro di massa a triplo quadrupolo. La ionizzazione è ottenuta mediante elettro-nebulizzazione negativa e lo spettrometro di massa opera in modalità *Multiple Reaction Monitoring* ((-) ESI-MS/MS).

Tabella 1. Elenco degli acidi perfluoroalchilcarbossilici e perfluoroalchilsolfonici analizzabili con il presente metodo

Composto	Sigla	Formula	N° atomi carbonio	Peso molecolare	N° CAS
Acido perfluoropentanoico	PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂	5	264	2706-90-3
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂	6	314	307-24-4
Acido perfluoroeptanoico	PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂	7	364	375-85-9
Acido perfluoroottanoico	PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	8	414	335-67-1
Acido perfluorononaonico	PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	9	464	375-95-1
Acido perfluorodecanoico	PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	10	514	335-76-2
Acido perfluoroundecanoico	PFUnDA	C ₁₁ HF ₂₁ O ₂	11	564	2058-94-8
Acido perfluorododecanoico	PFDoDA	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	12	614	307-55-1
Acido perfluorobutansolfonico	PFBS	C ₄ HF ₉ O ₃ S	4	300	375-73-5
Acido perfluoroesansolfonico	PFHxS	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	6	400	355-46-4
Acido perfluoroottansolfonico	PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	8	500	1763-23-1

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile a sedimenti e campioni biologici. Il limite di rilevabilità, valutato per campioni di tessuto biologico, è compreso tra 0,03 e 0,3 ng/g p.f.. Il limite di quantificazione, tra 0,1 e 0,9 ng/g p.f., e l'incertezza sono conformi ai requisiti della Direttiva della Commissione 2009/90/CE, per quanto riguarda il monitoraggio di PFOS nel biota ai sensi della Direttiva 2013/39/UE.

3. REAGENTI

Tutti i reagenti sono di grado analitico. Metanolo Chromasolv di grado LC-MS, acetonitrile Chromasolv di grado LC-MS, ammonio acetato (99%) e acido formico concentrato sono stati forniti da Sigma-Aldrich. Si utilizza acqua ad elevato grado di purezza (<18 MΩcm), prodotta tramite il sistema di purificazione Millipore Direct-QUV (Millipore, Bedford, MA, USA). Fosfatidilcolina pura di soia "Epikuron 200" è stata acquistata da Cargill Inc. Minneapolis, MN, USA.

4. ANALITI

4.1 Standard nativi

Gli acidi perfluorobutanoico (PFBA), perfluoropentanoico (PFPeA), perfluoroesanoico (PFHxA), perfluoroeptanoico (PFHpA), perfluorooctanoico (PFOA), perfluorononanoico (PFNA), perfluorodecanoico (PFDA), perfluoroundecanoico (PFUnDA), perfluorododecanoico (PFDoDA); perfluorobutan-solfonato di tetrabutylammonio (PFBS), perfluoro-esansolfonato di potassio (PFHxS) e perfluoroottansolfonato di tetrabutylammonio (PFOS) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA).

4.2 Soluzione di riferimento multicomponente con concentrazione di 1 g/L in metanolo

La soluzione si prepara diluendo opportunamente in metanolo i singoli analiti.

4.3 Soluzione di riferimento intermedia multicomponente con concentrazione di 10 mg/L in metanolo

La soluzione si prepara diluendo opportunamente in metanolo la soluzione 4.2

4.4 Soluzioni di riferimento diluite in acetonitrile (0-100 µg/L)

Le soluzioni sono preparate settimanalmente per diluizione seriale in acetonitrile della soluzione 4.3.

4.5 Standard marcati isotopicamente

La soluzione contenente PFCA e PFSA marcati con isotopi stabili (SIL-IS) (¹³C₂-PFHxA, ¹³C₄-PFOA, ¹³C₅-PFNA, ¹³C₂-PFDA, ¹³C₂-PFUnDA, ¹³C₂-PFDoDA, ¹⁸O₂-PFHxS e ¹³C₄-PFOS), ad una concentrazione di 2 µg/mL, è fornita da Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada).

4.6 Soluzione di riferimento diluita contenente standard marcati (SIL-IS) alla concentrazione di 40 µg/L

La soluzione 4.5 viene diluita opportunamente con metanolo.

4.7 Soluzione di riferimento di fosfatidilcolina alla concentrazione di 10 mg/L

La soluzione di fosfatidilcolina di 10 mg/L si prepara sciogliendo fosfatidilcolina pura in acetonitrile.

5. APPARECCHIATURE

5.1 Cartucce per rimuovere fosfolipidi

Le cartucce HybridSPE®Phospholipid Ultra (30 mg, 1 mL SPE Tubes) sono state acquistate da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA).

5.2 Bagno ad ultrasuoni

5.3 Centrifuga

5.4 On-line TFC/UHPLC-MS/MS

Il sistema cromatografico è costituito da un auto-campionatore CTC PAL, due pompe Thermo Scientific Accela LC (600 e 1250), 4 valvole a 6 vie per la purificazione in linea del campione e tre tipologie di colonne cromatografiche. Il sistema analitico è costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

5.4.1 Colonna a fase C18 (trap column) da inserire tra la pompa UHPLC e la valvola d'iniezione

La colonna utilizzata è Thermo Hypersil GOLD (1,9 µm, 50×2,1 mm).

5.4.2 Colonne TFC

Le due colonne TFC connesse serialmente sono Thermo Fluoro XL (50×0,5 mm) e Thermo Cyclone (50×0,5 mm).

5.4.3 Colonna per separazione cromatografica a fase pentafluorofenilica

La colonna utilizzata è Thermo Hypersil GOLD PFP (1,9 µm, 50×2,1 mm).

5.4.5 Spettrometro di massa a triplo quadrupolo

In questo lavoro si è utilizzato Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX con sorgente di elettrospray operante in modalità negativa, (-)ESI (Electrospray Ionisation), e in Multiple Reaction Monitoring (MRM).

6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per l'estrazione dei campioni solidi è stato utilizzato il metodo Lacina et al. 2011 modificato. Alcuni grammi di campione fresco (ad es. 5 g di sedimento, 5-10 g di

tessuto molle di bivalvi e filetto di pesce, 1-1,5 g di tuorlo d'uovo) sono trasferiti in provette tipo falcon di polipropilene (PP) da 15 mL e addizionati con standard interno marcato (100 µL di soluzione 4.6, la concentrazione finale in 1 mL di estratto è pari a 4 µg/L). In seguito si aggiungono 1,5 mL di acqua e acetonitrile in rapporto 10:90 e 40 µL di acido formico per ogni grammo di campione. I campioni sono quindi passati al vortex per 1 minuto, sonicati per 15 minuti e infine centrifugati per 10 minuti a 11000 rpm a 10 °C. Il surnatante viene prelevato con una pipetta Pasteur e trasferito in altre provette in PP da 15 mL. Il procedimento di estrazione viene quindi ripetuto altre due volte e il surnatante ottenuto aggiunto a quello precedente. A questa soluzione vengono aggiunti 0,2 g di NaCl, per favorire l'estrazione dei composti, e 0,6 g di MgSO₄ anidro, per eliminare l'acqua residua (essiccato in muffola a 500 °C per 5 h), per ogni grammo di campione. I campioni vengono agitati immediatamente, posti nuovamente in centrifuga per 10 minuti a 11000 rpm a 10 °C e tenuti in congelatore per una notte.

Il giorno successivo il surnatante viene ridotto in flusso d'azoto a 40 °C fino ad un volume di circa 1 mL. Il residuo è prelevato con una siringa da 1 mL per essere sottoposto alla successiva procedura di rimozione dei fosfolipidi (par. 7). Il volume finale dell'estratto è determinato per pesata.

7. ELIMINAZIONE DEI FOSFOLIPIDI

Per eliminare i fosfolipidi, che interferirebbero con l'analisi cromatografica dei composti perfluorurati,

ogni estratto di tessuto biologico viene fatto passare per gravità su una cartuccia HybridSPE® Phospholipid Ultra. Il liquido percolato dalla cartuccia viene acidificato con 50 µL di acido formico e trasferito nelle vial dell'autocampionatore del sistema UHPLC-MS/MS.

8. ANALISI

La determinazione dei composti perfluoroalchilici negli estratti di campioni biologici, dopo rimozione dei fosfolipidi, è effettuata mediante UHPLC-MS/MS accoppiata alla purificazione on-line del campione con sistema TFC.

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportate, rispettivamente, le condizioni operative delle fasi di purificazione TFC e di separazione analitica mentre in tabella 4 è riportato il gradiente di eluizione della separazione analitica. In figura 1 sono presentate le varie fasi del processo di purificazione e separazione analitica.

Nella prima fase (A) 50 µL di campione vengono trasferiti mediante l'autocampionatore nel loop da 100 µL mentre le colonne di purificazione e la colonna analitica sono condizionate con i rispettivi eluenti; nella seconda fase (B) la valvola V1 commuta e l'eluente, ad una velocità di 2000 µL/min, passa nel loop spingendo il campione nelle colonne TFC, gli analiti rimangono intrappolati nei pori mentre la componente macromolecolare della matrice viene eliminata nello scarico.

Nella terza fase (C) il loop viene caricato con 100 µL di metanolo che, nella quarta fase (D), viene spinto

Tabella 2. Condizioni operative della fase di purificazione TFC

Pompa di loading	Thermo ACCELA 600 pump
Colonne di purificazione	Thermo Cyclone TM (0,5x50 mm) e Thermo Fluoro XL (0,5x50 mm)
Fase mobile	(A) 0,1 % HCOOH; (B) MeOH; (C) acetonitrile:isopropanolo:acetone (45:45:10); (D) 2 mM NH ₄ OAc + 5% MeOH
Flusso	come in Tabella 4
Temperatura	ambiente
Gradiente	come in Tabella 4
Loop	100 µL

Tabella 3. Condizioni operative della fase analitica

Pompa analitica	Thermo ACCELA 1250 pump
Colonna di separazione	Thermo Hypersyl GOLD PFP (2,1x50 mm; 1,9 µm)
"Trap column"	Thermo GOLD Hypersil (2,1x50 mm; 1,9 µm) posta tra la pompa analitica e la valvola di iniezione
Fase mobile	(A) 2 mM NH ₄ OAc + 5% MeOH; (B) MeOH
Flusso	come in Tabella 4
Temperatura	ambiente
Gradiente	come in Tabella 4

nelle colonne TFC per eluire gli analiti e trasferirli nella colonna analitica tramite una giunzione a T (che permette il miscelamento con il flusso di eluente analitico).

Nell'ultima fase (E) nella colonna analitica avviene la separazione cromatografica mentre le colonne TFC sono ricondizionate per l'analisi successiva.

Al termine della separazione cromatografica gli analiti sono analizzati mediante spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente di elettrospruzzazione ESI (*Electrospray Ionisation*), operante in modalità negativa e MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) con risoluzione di 0,7 Da. I parametri dello spettrometro di massa sono elencati in tabella 5, mentre in tabella 6 sono riportate le transizioni MS/MS per ogni composto, le energie di collisioni e il tube lens offset.

Per il controllo degli strumenti, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software "Xcalibur 2.1" di Thermo Scientific.

In figura 2 sono riportati i cromatogrammi delle transizioni MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), per i soli composti non marcati, di una soluzione standard in acetonitrile. Nel caso di PFHxS e PFOS si può notare la presenza di due picchi cromatografici poiché la colonna analitica è in grado di separare parzialmente la miscela degli isomeri ramificati (primo picco cromatografico) dall'isomero lineare (secondo picco cromatografico) che è presente in maggiore quantità nella miscela commerciale con cui è stata preparata la soluzione di riferimento.

9. CALCOLI

Le rette di calibrazione sono state preparate usando standard in acetonitrile a diversa concentrazione

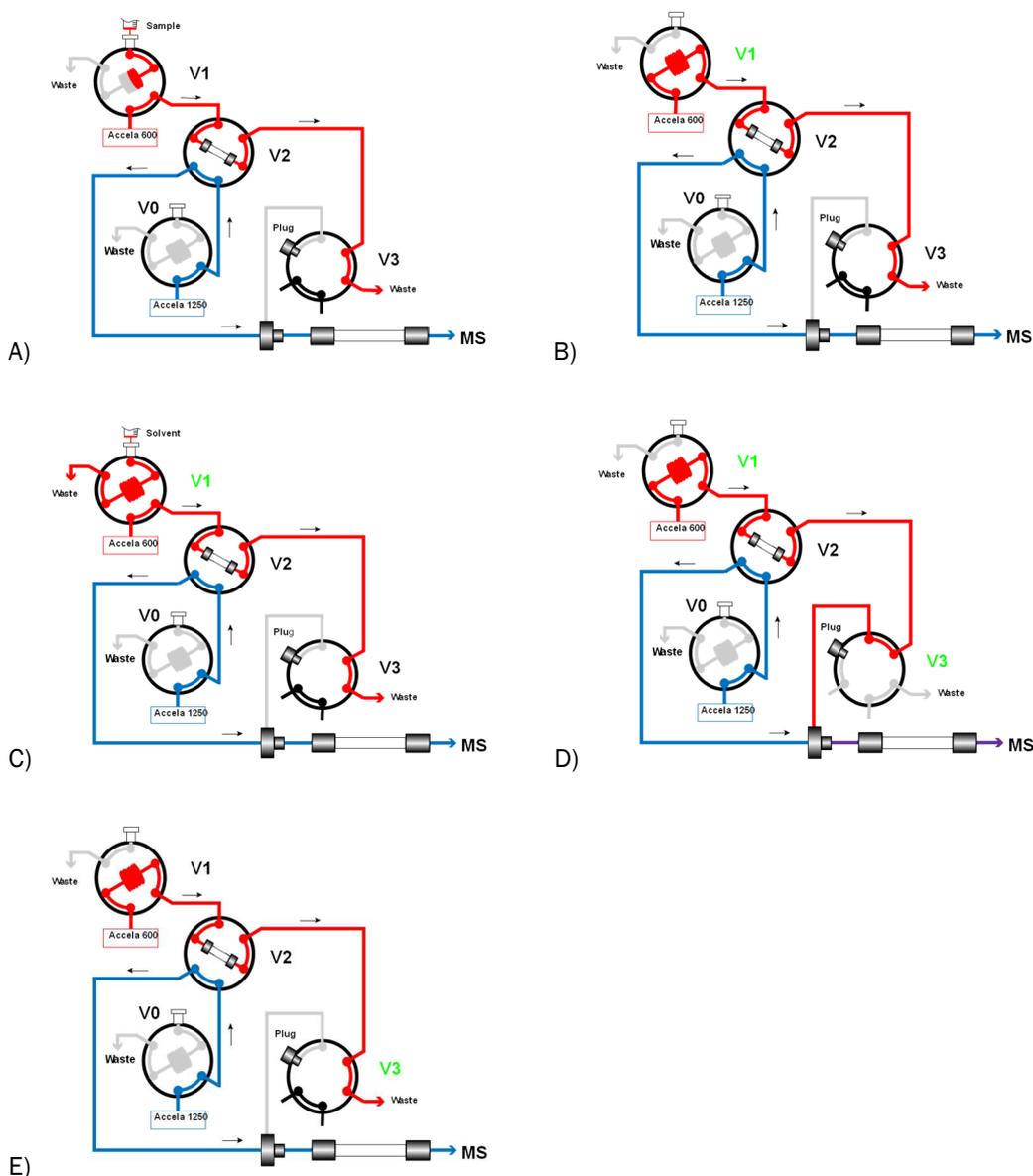


Figura1. Schema delle fasi di purificazione ed analisi: (A) fase di riempimento del *loop* con 50 μ L di campione; (B) fase di purificazione del campione; (C) fase di caricamento del *loop* con metanolo (D) fase di eluizione degli analiti e trasferimento alla colonna cromatografica; (E) fase di separazione cromatografica e contemporaneo lavaggio e ricondizionamento delle colonne TFC.

Tabella 4. Gradiente degli eluenti durante l'analisi

Fase	Tempo (min)	Pompa analitica			Pompa di caricamento del campione (<i>loading</i>)				
		Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	A%	B%	Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	A%	B%	C%	D%
A+B	0,00	300	95	5	2000	100	0	0	0
	0,99				2000	100	0	0	0
C+D	1,00	200	95	5	100	0	5	0	95
	2,00	200	95	5	100	0	5	0	95
	2,99	200	62,5	37,5					
E	3,00	300	62,6	37,5	100	0	37,5	0	62,5
	3,01				200	0	0	0	100
	4,00	300	30	70					
	9,00	300	30	100	200	0	0	100	0
	11,99				200	0	0	100	0
	12,50	300	0	100					
	12,99				200	100	0	0	0
	14,50	300	95	5					
16,50	300	95	5	200	100	0	0	0	

Tabella 5. Condizioni operative della fase analitica

Spettrometro di massa	Thermo TSQ Quantum Access Max	
Sorgente di ionizzazione	HESI (Heated Electrospray Ionisation)	
Parametri della sorgente di ionizzazione	Potenziale dello Spray (Spray Voltage)	3500 V
	Temperatura del capillare (Capillary T)	270 °C
	Gas di schermo (Sheath Gas)	25 au
	Gas Ausiliario (Auxiliary Gas)	10 au
	Temperatura del vaporizzatore (Vaporizer Temperature)	40 °C
Condizioni di ionizzazione	Ionizzazione negativa	
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple Reaction Monitoring (MRM), come in Tab. 5	
Gas di collisione	Argon	
Pressione del gas di collisione	1,5 (mTorr)	

Tabella 6. Parametri LC/MS/MS per tutti gli analiti e gli standard di riferimento marcato (SIL-IS) utilizzati nella validazione del metodo

	Analiti	RT (min)	Ione Precursore (m/z)	Ioni Prodotti (m/z)	Energia di Collisione	Tube lens offset
Acido perfluoropentanoico	PFPeA	4,3	262,9	69 218,9	39 11	85
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	4,6	312,9	119,1 268,9	22 11	86
Acido perfluoroeptanoico	PFHpA	4,9	362,9	169 318,9	18 12	91
Acido perfluorooctanoico	PFOA	5	412,9	169 368,9	19 13	96
Acido perfluorononanoico	PFNA	5,3	462,9	218,9 418,9	18 13	104
Acido perfluorodecanoico	PFDA	5,5	512,9	268,9 468,9	18 13	97
Acido perfluoroundecanoico	PFUnDA	5,7	562,9	268,8 518,8	20 14	96
Acido perfluorododecanoico	PFDoDA	6	612,9	318,8 568,9	20 14	107
Acido perfluorobutansolfonico	PFBS	4,4	298,9	80,2 99,1	44 32	85
Acido perfluoroesansolfonico	PFHxS	4,8	398,9	80,1 99	38 34	91
Acido perfluorooottansolfonico	PFOS	5,2	498,9	80,3 99,1	45 45	104
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₄] butanoico	¹³ C ₂ -PFHxA	4,6	314,9	269,9	11	86
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] hexanoico	¹³ C ₄ -PFOA	5	416,9	371,9	13	96
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₄] octanoico	¹³ C ₅ -PFNA	5,3	467,9	422,9	13	104
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₅] nonanoico	¹³ C ₂ -PFDA	5,5	514,9	469,9	13	97
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] decanoico	¹³ C ₂ -PFUnDA	5,7	564,9	519,8	14	96
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] undecanoico	¹³ C ₂ -PFDoDA	6	614,9	569,9	14	107
Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] dodecanoico	¹⁸ O ₂ -PFHxS	4,8	402,9	103	34	91
Acido perfluoro-n-esan [¹⁸ O ₂] solfonico	¹³ C ₄ -PFOS	5,2	502,9	99,1	45	104

Tabella 7. Effetto matrice in estratti di bivalvi.

$$ME (\%) = (\text{Area}_{\text{molluschi}} \times \text{Area}_{\text{std}}) \times 100; (N = 3).$$

Composti	Effetto matrice (%)		Effetto matrice (%)	
	Nativo	SIL-IS	Nativo	SIL-IS
	2 µg/L	4 µg/L	15 µg/L	4 µg/L
PFPeA	n.d.	n.a.	41	n.a.
PFHxA	40	42	40	46
PFHpA	43	n.a.	46	n.a.
PFOA	75	109	98	94
PFNA	66	51	57	55
PFDA	57	52	57	57
PFUnDA	66	54	55	54
PFDoDA	99	87	83	84
PFBS	n.d.	n.a.	49	n.a.
PFHxS	85	81	81	93
PFOS	n.d.	135	99	149

quindi della ionizzazione. La tabella 7 mostra una minore soppressione della ionizzazione (tra 1 e 25%) per PFOA, PFDoDA, PFHxS e PFOS mentre la soppressione è più marcata (tra 34 e 60%) per tutti gli altri composti.

Per correggere l'effetto matrice si utilizzano composti marcati con isotopi stabili (SIL-IS) come standard interni, utili anche a compensare il recupero di estrazione e la variabilità d'iniezione e dei parametri strumentali. La soluzione SIL-IS è stata aggiunta sia agli estratti di biota sia alle soluzioni standard per raggiungere la concentrazione finale di 4 µg/L.

10.2 Intervallo di linearità e limiti di rivelabilità

La linearità è stata valutata iniettando 7 livelli di soluzioni standard multicomponente (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 µg/L per PFUnDA e PFDoDA e 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/L per i restanti composti) addizionati con SIL-IS a 4 µg/L. Le linearità è buona con coefficienti di determinazione $R^2 > 0,987$ per tutti i composti (Tabella 8). I limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati misurati secondo la norma ISO 6107-2:2006 come tre e dieci volte, rispettivamente, la deviazione standard dello standard multicomponente più basso (ILOD e ILOQ) e di un estratto di mol-

Tabella 8. Parametri di validazione: linearità e sensibilità

Composti	Linearità		Sensibilità (ng/g p.f.)			
	(µg/L)	R ²	ILOD	ILOQ	MLOD	MLOQ
PFPeA*	1-100	0,997	0,2	0,7	0,3	0,9
PFHxA	1-100	0,994	0,1	0,2	0,06	0,2
PFHpA*	1-100	0,998	0,04	0,1	0,1	0,4
PFOA	1-100	0,997	0,03	0,1	0,1	0,4
PFNA	1-100	0,992	0,04	0,1	0,07	0,2
PFDA	1-100	0,995	0,03	0,07	0,07	0,2
PFUnDA	0,5-50	0,997	0,02	0,04	0,04	0,1
PFDoDA	0,5-50	0,998	0,03	0,08	0,03	0,1
PFBS*	1-100	0,999	0,2	0,4	0,3	0,8
PFHxS	1-100	0,989	0,03	0,07	0,1	0,2
PFOS	1-100	0,987	0,04	0,1	0,2	0,5

* Valori corretti con ¹³C2-PFHxA.

lusco (MLOD e MLOQ) fortificato a 1 µg/L. ILOD e ILOQ, che rappresentano i limiti di rivelabilità strumentali, variano da 0,02 a 0,2 e da 0,04 a 0,7 ng/g p.f. rispettivamente, mentre MLOD e MLOQ, limiti di rivelabilità del metodo, sono compresi tra 0,03 a 0,3 e tra 0,1 e 0,9 ng/g p.f. rispettivamente (Tabella 8).

10.3 Accuratezza

La precisione del metodo è stata valutata come la deviazione standard di quattro iniezioni ripetute per tre giorni non consecutivi di soluzioni standard multi-componenti e di estratti di biota fortificati (Tabella 9). Sia la ripetibilità (precisione *intra-diem*) sia la riproducibilità (precisione *inter-dies*) sono migliori per i PFCA, senza mostrare differenze significative tra le soluzioni standard e gli estratti. Per le alte concentrazioni la ripetibilità varia da 3 a 8% per PFCA e da 5 a 13% per PFSA mentre la riproducibilità varia da 4 a 17% e da 12 a 27% per PFCA e PFSA rispettivamente.

Non essendo disponibili per i PFAS materiali di riferimento certificati in matrice biologica, l'accuratezza,

espressa come recupero percentuale, è stata stimata analizzando campioni reali fortificati a due concentrazioni (0,4 e 3 ng/g p.f.) e bianchi fortificati a 1,5 ng/g p.f. (Tabella 9). Si ottengono recuperi soddisfacenti per PFCA (98-133%), mentre sono inferiori per PFSA (40-60%), probabilmente perché il metodo è dieci volte meno sensibile per i composti solfonati rispetto ai carbossilati.

Tabella 9. Parametri di validazione: accuratezza

Composti	Precisione sol. std (%RSD)				Precisione in estratti (RSD%)				Recupero (%)		
	Intra-diem	Inter-dies	Intra-diem	Inter-dies	Intra-diem	Inter-dies	Intra-diem	Inter-dies	Bianco	Biota	Biota
	2 µg/L	2 µg/L	10 µg/L	10 µg/L	4 µg/L	4 µg/L	30 µg/L	30 µg/L	1,5 ng/g p.f.	0,4 ng/g p.f.	3 ng/g p.f.
PFPeA*	7	9	6	14	19	36	5	11	96	<LOQ	120
PFHxA	9	28	8	17	8	21	4	13	104	65	98
PFHpA*	12	9	8	7	10	6	8	4	135	<LOQ	132
PFOA	16	14	3	12	13	6	5	13	121	134	133
PFNA	7	16	4	19	4	6	3	9	108	101	109
PFDA	12	1	5	10	8	6	2	9	111	106	109
PFUnDA	13	8	5	10	12	10	4	7	112	97	111
PFDoDA	3	8	4	11	6	13	4	5	107	95	109
PFBS*	34	40	8	15	15	26	10	19	51	86	60
PFHxS	21	13	13	20	7	26	6	12	100	49	53
PFOS	47	38	7	13	18	9	5	27	71	29	40

Le concentrazioni sono state calcolate con il metodo della diluizione isotopica. * Valori corretti con ¹³C2-PFHxA

BIBLIOGRAFIA

Ahrens, Lutz, and Mirco Bundschuh. 2014. "Fate and Effects of Poly- and Perfluoroalkyl Substances in the Aquatic Environment: A Review." *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 33(9): 1921–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24924660> (October 7, 2014).

Buck, Robert C et al. 2011. "Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins." *Integrated environmental assessment and management* 7(4): 513–41.

King, Richard et al. 2000. "Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization." *American Society for Mass Spectrometry* 11: 942–50.

Lacina, Ondrej, Petra Hradkova, Jana Pulkrabova, and Jana Hajslova. 2011. "Simple, High Throughput Ultra-High Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry Trace Analysis of Perfluorinated Alkylated Substances in Food of Animal Origin: Milk and Fish." *Journal of chromatography. A* 1218(28): 4312–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621213> (December 1, 2014).

Lindstrom, Andrew B, Mark J Strynar, and E Laurence Libelo. 2011. "Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future." *Environmental science & technology* 45(19): 7954–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866930>.

Mazzoni, Michela, Stefano Polesello, Marianna Rusconi, and Sara Valsecchi. 2015. "Liquid Chromatography Mass Spectrometry Determination of Perfluoroalkyl Acids in Environmental Solid Extracts after Phospholipid Removal and On-line Turbulent Flow Chromatography Purification." *Journal of Chromatography A* 1453: 62–70.

Núñez, Oscar, Héctor Gallart-Ayala, Claudia P B Martins, and Paolo Lucci. 2012. "New Trends in Fast Liquid Chromatography for Food and Environmental Analysis." *Journal of Chromatography A* 1228: 298–323.

Trufelli, Helga, Pierangela Palma, Giorgio Famiglini, and Achille Cappiello. 2011. "An Overview of Matrix Effects in Liquid Chromatography - Mass Spectrometry." *Mass spectrometry reviews* 30: 491–509.

Valsecchi, Sara et al. 2015. "On-Line Sample Extraction and Purification for the LC-MS Determination of Emerging Contaminants in Environmental Samples." *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 8: 27–37. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214158815300040>.

Determinazione di microcistine e nodularina in acque superficiali mediante SPE online - HPLC/MS-MS

a cura di

Lydia Balest, Pier Paolo Abis, *Acquedotto Pugliese S.p.A. - Bari*

Giuseppe Mascolo (*), *Sapia Murgolo, CNR - Istituto di Ricerca Sulle Acque, Sede di Bari*

RIASSUNTO

E' stato sviluppato un metodo basato sulla estrazione in fase solida on-line (on line SPE) accoppiato ad HPLC/MS-MS per la determinazione di cinque congeneri di microcistine ed alla nodularina in acque superficiali a livelli di microgrammi per litro. Il metodo è stato ottimizzato analiticamente al fine di ottenere massimi recuperi ed è stato validato ai sensi della norma UNI EN ISO IEC 17025 e delle linee guida UNICHIM. Il metodo è poi stato applicato al monitoraggio di microcistine e della nodularina in campioni di acque superficiali durante una campagna della durata di nove mesi, durante la quale i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dal metodo immunoenzimatico ELISA. Il confronto tra i due metodi analitici di quantificazione ha evidenziato un buon accordo tra i risultati per campioni nei quali le concentrazioni riscontrate per gli analiti erano le più alte.

SUMMARY

An on-line solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography in tandem with mass spectrometry (on-line SPE/HPLC/MS-MS) method for the determination of five microcystins and nodularin in surface waters at sub $\mu\text{g L}^{-1}$ concentrations has been optimized. Maximum recoveries were achieved by carefully optimizing the extraction sample volume, loading solvent, wash solvent and pH of the sample. The developed method was also validated according to both UNI EN ISO IEC 17025 and UNICHIM guidelines. The method was applied for the routine monitoring of the concentrations of microcystins and nodularin in raw surface water during a sampling campaign of nine months in which the ELISA assay method was used as standard official method. The results of the two methods were compared showing good agreement when the highest concentration values of MCs were found.

Un fenomeno naturale noto come "bloom" (fioritura) algale, soprattutto per una particolare specie di alghe, le cianofite, ha interessato negli ultimi anni diversi corpi idrici superficiali in diverse regioni del mondo. Tale fenomeno, probabilmente, in parte naturale ed in parte influenzato da variazioni climatiche o da inquinamento di origine antropica, ha come conseguenza negativa il potenziale rilascio nel corpo idrico in cui si verifica, di particolari tossine. Le microcistine e la nodularina sono le cianotossine più frequentemente note tra le tossine identificate nei corpi idrici durante gli eventi di bloom nelle acque dolci [1, 2]. Dal punto di vista tossicologico le cianotossine sono classificabili come epatotossine, neurotossine e promotori tumorali. Dal punto di vista chimico strutturale le microcistine sono eptapeptidi ciclici mentre la nodularina è un pentapeptide ciclico. Sono stati identificati diversi congeneri di microcistine (circa 90), tutti aventi come struttura base un amminoacido aromatico detto "Adda", un D-ammino acido, (D-alanina, D-eritrometilaspargato, D-glutamato) e due amminoacidi la cui natura è differente nei diversi congeneri presenti in natura (x e z n fig. 2). I sostituenti X più

frequentemente riscontrati sono la leucina e l'arginina mentre come sostituito Z si riscontra spesso arginina, alanina, metionina. L'identità di tali sostituenti viene identificata nella nomenclatura del particolare congenero di microcistina (MC) con apposito suffisso (i.e- MC-LR, MC-LY, etc.). Per alcuni congeneri in cui si riscontra la demetilazione di uno degli amminoacidi costituenti, il nome viene preceduto dal prefisso dm (es. dm-MC-LR).

In base alla tossicità di questi composti, e alla possibilità che queste tossine possano contaminare acque destinate a consumo umano, la World Health Organization (WHO) ha stabilito un valore guida provvisorio per il parametro microcistina MC-LR pari a $1 \mu\text{g/L}$, inteso come valore di riferimento per la esposizione a lungo termine [3].

In Europa sono state adottate le stesse linee guida dell'OMS in diversi Paesi interessati al monitoraggio dei bloom algali e delle loro tossine nei corpi idrici.

In Italia, l'Istituto Superiore di Sanità, in accordo con i valori guida definiti dal WHO ha recepito, tramite le linee guida, il valore guida di $1 \mu\text{g/L}$ nelle acque potabili espresso in concentrazione di MC-LR totale, sia derivante dal contributo di tossine sia intra che extra-

* giuseppe.mascolo@ba.irsra.cnr.it

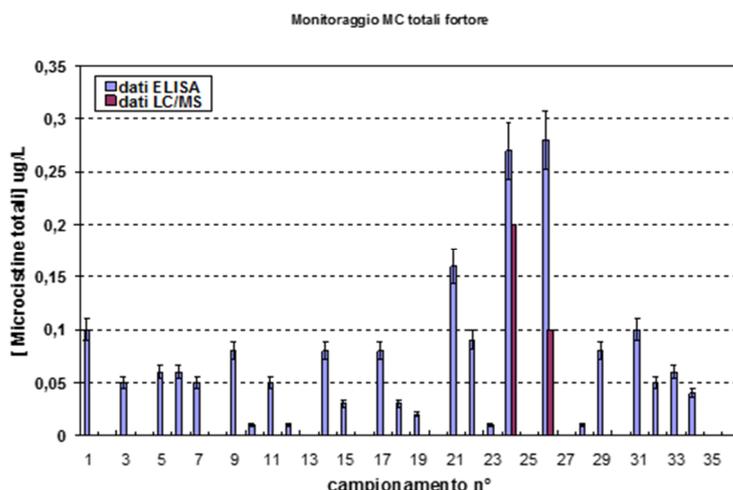


Figura 1. Concentrazione totale di MC rilevata mediante test ELISA e on line SPE-HPLC/MS-MS durante la campagna di monitoraggio di un corpo idrico superficiale della durata di nove mesi (da gennaio 2014 a settembre 2015).

cellulare. Inoltre, tutti i congeneri di microcistine per i quali sono disponibili commercialmente delle soluzioni di riferimento (dm-MC-RR, MC-RR, MC-YR, dm-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW) devono essere monitorate nei corpi idrici .

Attualmente diversi metodi analitici sono disponibili per la quantificazione di microcistine nelle acque. I metodi basati su reazioni immunoenzimatiche, noti come test ELISA [4] , si basano sulla reazione di un anticorpo con la molecola di una generica microcistina e forniscono una informazione sul contenuto totale dei congeneri. Tali metodi hanno tuttavia il difetto di essere aspecifici e di sovrastimare la risposta analitica. Metodi basati su determinazioni in HPLC/UV non sono invece sufficientemente sensibili e selettivi tanto da differenziare e dosare adeguatamente i quantitativi dei differenti congeneri [5, 6]. Lo scopo di ottenere una adeguata selettività strumentale unitamente ad una adeguata sensibilità analitica è attualmente ottenibile solo grazie a tecniche HPLC/MS-MS [7,8].

E' stato quindi sviluppato un metodo di estrazione on-line in fase solida, accoppiata ad HPLC/MS-MS che unisce i pregi della tecnica analitica con una minimizzazione delle procedure di preparazione del campione. Il metodo è stato validato ai sensi della norma UNI EN ISO IEC 17025 e secondo le linee guida UNICHIM, accreditato ufficialmente da ACCREDIA per l'analisi utile a confermare quantitativamente la presenza di differenti congeneri nelle matrici acquose durante le campagne di monitoraggio dei corpi d'acqua di approvvigionamento per acque destinate a consumo umano. Il metodo è stato applicato per la quantificazione dei congeneri: dm-RR, MC-LR, MC-YR, MC-RR, dm-LR e NOD nel range 0.1 µg/L- 2.0 µg/L e confrontato quantitativamente con i risultati ottenuti dai test ELISA durante tutta la campagna di monitoraggio.

La campagna di monitoraggio ha avuto una durata di nove mesi, durante la quale sono state analizzate le acque grezze del corpo idrico superficiale oggetto dello studio. I risultati di screening mediante test ELISA mostrano su quasi tutti i campioni una concentra-

zione di MC totali inferiore a 0.1 µg/L. Solo in tre campioni della campagna la concentrazione rilevata mediante i test è stata tra 0.16 - 0.28 µg/L.

L'analisi di conferma effettuata mediante online-SPE-HPLC/MS-MS ha riscontrato la presenza di due campioni aventi una concentrazione totale di microcistine compresa tra 0.1-0.2 µg/L.

Alla fine della campagna 25 campioni sono risultati positivi allo screening con test ELISA; di questi soltanto due sono stati confermati quantitativamente mediante analisi HPLC/MS-MS. Tale riscontro può essere spiegato in due modi. La prima interpretazione dei risultati del confronto tra i metodi porta a poter affer-

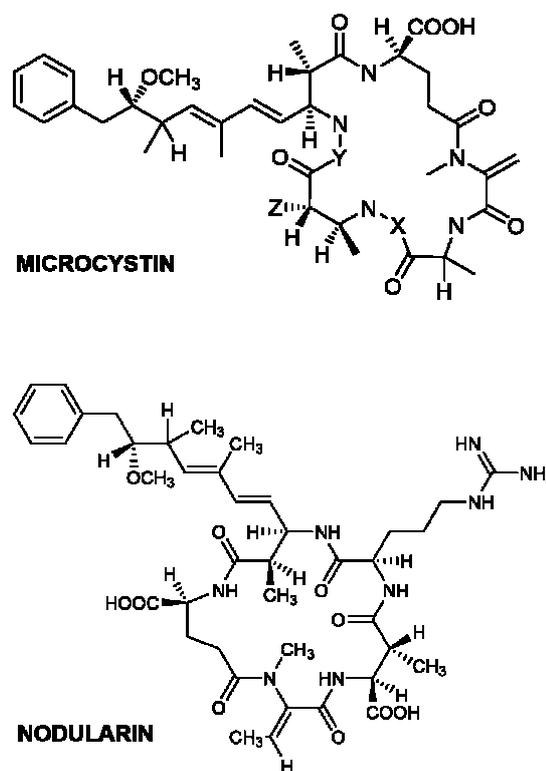


Figura 2. Struttura chimica dei congeneri di microcistina oggetto della campagna di monitoraggio e della nodularina.

mare che i test ELISA tendono a sovrastimare il contenuto totale di microcistine, soprattutto per livelli di concentrazione più bassi, tendendo a dare falsi positivi essendo la reazione immunoenzimatica su cui sono basati i test ELISA, genericamente legata alla presenza del gruppo amminoacidico Adda.

Come tale potrebbe fornire risultati positivi anche nel caso in cui l'amminoacido Adda sia presente in forma lineare non tossica, e non nella struttura ciclica in cui è contenuto nelle MCs, a cui è legata la tossicità dei vari congeneri.

Il secondo aspetto che evidenziato dai dati ottenuti è che i test ELISA, non essendo selettivi per il particolare congenero, rispondono alla presenza di ogni eventuale congenero presente, che non sia compreso tra le molecole target delle analisi in HPLC/MS-MS.

L'analisi dei risultati ha evidenziato un sostanziale allineamento dei dati relativi alla presenza delle cianotossine ottenuti da test ELISA e analisi mediante i test tramite la tecnica "On line-SPE/HPLC/MS-MS" soprattutto per valori di concentrazione più elevati. Tuttavia, i risultati confermano la necessità che, nell'ambito di una attività di reale monitoraggio di un acquedotto, sia utilizzato un metodo di conferma HPLC/MS-MS nel caso di un riscontro positivo evidenziato da test di screening basati su metodi immunoenzimatici. Questo in particolar modo a bassi livelli di concentrazioni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (1):7-60. doi:10.1002/mnfr.200600185.
- [2] Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T (2006) Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research* 40 (19):3485-3496.
- [3] Guidelines for Drinking-Water Quality (1998). Health Criteria and Other Supporting Information, vol Addendum to Volume 2. World Health Organization, Geneva.
- [4] Carmichael WW, An J (1999) Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins* 7 (6):377-385. doi:10.1002/1522-7189(199911/12)7:6<377::aid-nt80>3.0.co;2-8.
- [5] Oehrle SA, Southwell B, Westrick J (2010) Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* 55 (5):965-972. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.001
- [6] Schmidtkunz C, Bernd Stich H, Welsch T (2009) Improving the Selectivity and Confidence in the HPLC Analysis of Microcystins in Lake Sediments. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32 (6): 801 - 821. doi:10.1080/10826070902767999
- [7] Pérez S, Aga DS (2005) Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (7):658-670. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2005.04.005
- [8] Roy-Lachapelle A, Fayad PB, Sinotte M, Deblois C, Sauvé S (2014) Total microcystins analysis in water using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 820 (0):76-83. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.02.021

Microcystin	X	Y	Z
MC-LR	Leucine	Arginine	CH ₃
MC-RR	Arginine	Arginine	CH ₃
MC-YR	Tyrosine	Arginine	CH ₃
dm-LR	Leucine	Arginine	H
dm-RR	Leucine	Arginine	H

Determinazione del COD per via spettrofotometrica in provette da 5 mL

a cura di

Giuseppe Cuomo, Barbara Casentini, Luciana Di Gregorio, Valter Tandoi (*), *Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, Monterotondo (RM)*

RIASSUNTO

Il metodo della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) è stato valutato, operando con volumi ridotti (3,75 mL) e per via spettrofotometrica, secondo gli *Standard Methods*: è stata ottenuta una buona riproducibilità nell'intervallo 100-800 mg/L (*low detection limit*: 26,7 mg/L). Tale metodo di estrema semplicità ed economicità, mantiene tutta la sua validità, ed è un contributo alla riduzione dell'uso di composti di cromo in un momento in cui l'applicazione del REACH potrebbe comportarne la soppressione e sostituzione con il parametro Carbonio Organico Totale (TOC): su questo punto è tuttora aperto un confronto in ambito UE.

SUMMARY

The Chemical Oxygen Demand (COD) Method has been evaluated, working spectrophotometrically with reduced volumes (3,75 mL), according to the *Standard Methods*: a good reproducibility has been observed in the range 100-800 mg/L (*low detection limit*: 26,7 mg/L). This Method, due to its simplicity and inexpensiveness, keeps all its validity, and it is a contribution to the overall reduction of chromium compound use just when the REACH application might cause its suppression and substitution with the parameter Total Organic Carbon (TOC): this debate is still open at UE level.

1. INTRODUZIONE

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione liquido, per mezzo di un ossidante forte (dicromato di potassio) in ambiente acido a caldo (151 °C) ed in presenza di un catalizzatore di ossidazione (argento solfato); la reazione avviene in presenza anche di solfato mercurico per complessare eventuali cloruri presenti che possono dare interferenza positiva. Contribuiscono al valore del COD dello scarico, sostanze organiche, riducenti inorganici quali Fe²⁺, solfuri, tiosolfati, solfiti etc.; tra le forme d'azoto, l'ammonio non viene ossidato, i nitrati non vengono ridotti, ma il nitrito viene ossidato a nitrato ed interferisce quindi positivamente.

Il COD, utilizzato per la stima del contenuto di sostanze in grado di sottrarre ossigeno ad un corpo idrico ricevente, viene preferito al BOD, per il minor tempo richiesto dall'analisi; è utilizzato, nel controllo di routine di liquami grezzi e depurati, soprattutto industriali. Esiste in genere un rapporto COD/BOD, che varia in funzione del tipo di sostanze presenti: liquami da fognature prevalentemente civili hanno, ad esempio, un rapporto COD/BOD = 1,9-2,5 e ciò vale anche per

molti effluenti industriali provenienti da lavorazioni alimentari. L'uso del COD per il controllo delle acque superficiali è molto più limitato, soprattutto per i bassi valori che si riscontrano, al di sotto dei limiti di sensibilità del metodo.

L'analisi del COD è tuttora ampiamente utilizzata (è uno dei parametri previsti nella tabella 3, Allegato 5, parte III del D.Lgs 152 del 2006) per il controllo delle caratteristiche dei reflui sottoposti a trattamento. Ciononostante è in corso un confronto a livello UE sull'opportunità di sostituire il COD con il TOC, come parametro di controllo degli scarichi di impianti di trattamento di reflui urbani (Direttiva 91/271/EEC), a seguito delle restrizioni imposte all'uso dei composti di cromo VI dal Regolamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*, 2003).

In questa nota si presentano i risultati del Metodo spettrofotometrico (*Standard Methods*, 2005) modificato in modo da utilizzare volumi ridotti dei vari reagenti, così da limitare in modo significativo l'uso di reattivi contenenti Cr e, conseguentemente, la quantità di reflui da smaltire.

* tandoi@irsa.cnr.it



Figura 1. Reattivi: a sinistra, soluzione 2.2.1 ($K_2Cr_2O_7$, 0,250 N), a destra soluzione 2.2.2 (Soluzione acida: H_2SO_4 addizionato di Ag_2SO_4)

NOTA: Quest'ultima è già disponibile pronta in commercio (ad un prezzo di circa 50 €/L)

2. PROCEDURA SPERIMENTALE

2.1 Apparecchiature

- 2.1.1 Termoreattore per COD: si tratta di un blocco metallico di forma cilindrica provvisto di fori di diametro e profondità tali da permettere l'introduzione delle provette cilindriche per metà della loro altezza. La temperatura del blocco deve poter essere mantenuta a 150 °C per una durata di 120 minuti.
- 2.1.2 Spettrofotometro per misure di assorbanza nel campo 400-800 nm, con alloggiamento per provette cilindriche
- 2.1.3 Provette cilindriche in vetro con tappo a vite e guarnizione interna in PTFE, 70 x 10 mm (5.5 ml)
- 2.1.4 MicroPipette a volume variabile da 1000 µL, 5000 µL, con relativi puntali in PP.

2.2 Reattivi.

Per l'esecuzione del test si preparano 2 soluzioni (fig. 1):

2.2.1. Soluzione acida di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$)

- Sciogliere il dicromato di potassio in quantità indicate nella tabella 1 (0,250 N o 0,025 N, per alto o basso range) in 500 mL di acqua distillata in base al valore di COD atteso.
- Aggiungere 33,3 g di $HgSO_4$
- Aggiungere lentamente, facendo attenzione all'aumento della temperatura dovuta alla reazione isotermica, 167 mL di Acido Solforico al 96% (densità 1,84)
- Portare a 1 L con acqua distillata

2.2.2 Acido solforico (H_2SO_4), additivato con solfato di argento Ag_2SO_4

- Sciogliere 5,5 g di Solfato di argento in 540 mL di acido solforico al 96% (densità 1,84)

2.2.3 Standard di COD: Per la preparazione di una soluzione standard da 1000 mg/L di COD:

- Sciogliere 425 mg circa di potassio ftalato acido (pesata rapida con fattore di pesata), previamente essiccato (a 105 °C per 2 ore), in 500 mL di acqua distillata

Tabella 1. Soluzioni di digestione con dicromato di potassio per diversi range di COD

Soluzione	Range (mg/L)	H ₂ O dist. (mL)	K ₂ Cr ₂ O ₇ (g)	HgSO ₄ (g)	H ₂ SO ₄ (96%) (mL)	Volume Finale con H ₂ O dist. (mL)
0,250 N	100-800	500	10,216	33,3	167	1000
0,025 N	10- 70	500	1,022	33,3	167	1000

Tabella 2. Preparazione del campione per COD

(1) Campione (mL)	(2) Soluzione Digestione (mL)	(3) Soluzione Ag_2SO_4 in acido solforico (mL)	Lunghezza d'onda spettrofotometro (nm)	Range (mg/L)
1,25	0,75 (conc. 0,250N)	1,75	600	100-800
1,25	0,75 (conc. 0,025 N)	1,75	420	10-70

**Figura 2.** Provetta con l'aggiunta in sequenza dei tre componenti per la procedura del COD

2.3 Procedure (Tab. 2)

Operando all'interno della cappa chimica, aggiungere nella provetta in sequenza (fig. 2):

- 1) 1,25 mL di campione
- 2) 0,75 mL di soluzione 2.2.1 (soluzione acida dicromato di potassio).
- 3) 1,75 mL di soluzione 2.2.2 (acido solforico/ solfato di argento)
- 4) Si chiude ermeticamente la provetta
- 5) Si pone la provetta nel digestore per 120 min a 150 °C.

Il digestore va posto sotto cappa (fig. 3) o alternatively in camera di acciaio a chiusura ermetica

ATTENZIONE: PROVETTE CON UN ALTO CONTENUTO DI COD E/O ALTO CARBONIO INORGANICO POTREBBERO ESPLODERE NEL DIGESTORE

Si lasciano raffreddare i campioni per 30 minuti circa e poi si leggono le assorbanze con lo spettrofotometro (Lange DR 2800, o equivalente), inserendo direttamente la provetta negli appositi alloggiamenti, ad una lunghezza d'onda di 600 nm per l'alto range e 420 nm per il basso range.

In pratica per l'alto range si determina l'intensità del colore verde dovuto al Cr(III) prodotto a seguito della riduzione del dicromato, mentre per il basso range si determina l'intensità del colore arancione dovuto al dicromato residuo al termine della reazione.

**Figura 3.** Allestimento del reattore di digestione del COD

Tabella 3. Unità di assorbanza misurate a 600 nm, per standard dell'alto range, corrette per il Bianco (Abs campione - Abs Bianco). Il valore di Abs relativo al bianco era pari a $19,8 \pm 2,8$.

COD (mg/L)	U. Abs	U. Abs replica	U. Abs replica 2	U. Abs media	Dev. standard	Coefficiente Variabilità %
100	44	41	33	39,3	5,69	14,5
200	104	84	83	90,3	11,85	13,1
300	127	110	113	116,7	9,07	7,8
500	190	186	170	182,0	10,58	5,8
600	230	236	235	233,7	3,21	1,4
700	252	253	248	251,0	2,65	1,1
800	313	300	289	300,7	12,01	4,0

3. COSTRUZIONE RETTE DI TARATURA

Si è preparata una soluzione madre da 1000 mg/L di COD come da procedura previamente descritta e, da questa, due serie di standard a diversa concentrazione, nei range 100-800 mg/L e 10-70 mg/L.

Trascorso il tempo di reazione, si è misurata, per quanto riguarda l'alto range, l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 600 nm, mentre per il basso range alla lunghezza d'onda di 420 nm.

3.1 Retta di taratura alto range (100-800 mg/L)

La tabella 3 riporta i dati concentrazione e relativa assorbanza e la figura 4 la retta di taratura ricavata. La retta di taratura è stata costruita preparando tre repliche delle soluzioni a COD noto in modo da testare la replicabilità del metodo.

Da questa retta si è determinata l'equazione che mette in relazione il COD con l'assorbanza misurata:

$$COD = U.A./0,3747;$$

range 100-800 mg/L di COD; LOD* = 26,7 mg/L

*LOD= Low detection limit, rappresenta la variabilità della misura espressa come 3σ della misura spettrofotometrica del bianco (acqua milliQ) processato con il metodo descritto.

3.2 Retta di taratura basso range (0-70 mg/L)

La tabella 4 e la figura 5 riportano i dati relativi ai campioni preparati per il basso range.

Analogamente per il basso range si è ottenuta la seguente equazione:

$$COD = (165,76 - UA)/1,7365$$

range 10-70 mg/L di COD

Tale retta è stata ricavata per campioni singoli.

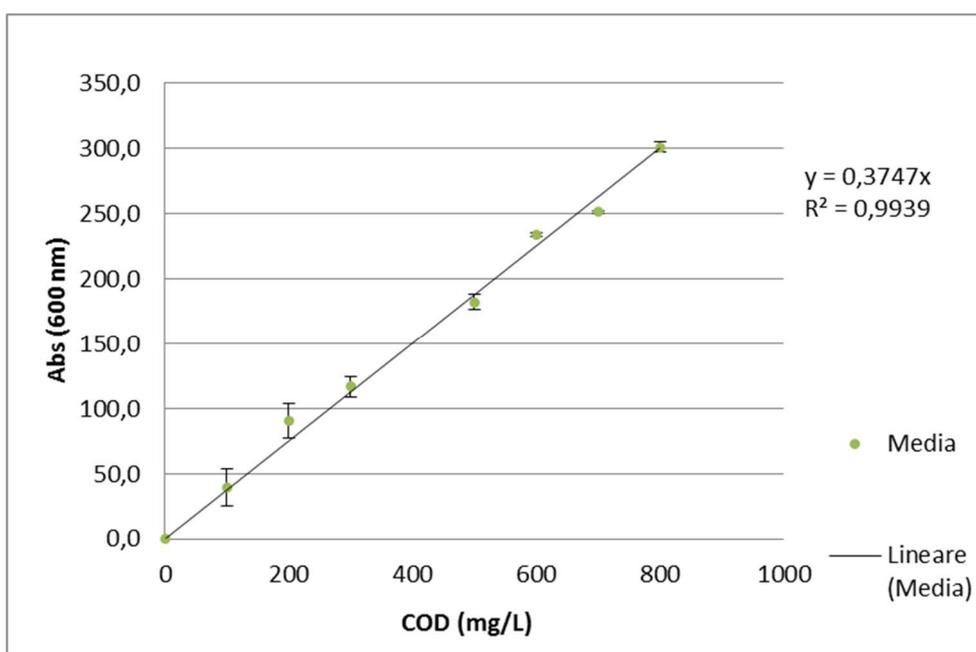


Figura 4. Retta di taratura per COD alto range con barra di errore del coefficiente di variabilità. I valori di assorbanza riportati sono corretti per il bianco e alla retta è stato imposto il passaggio per lo zero

Tabella 4. Unità di assorbanza misurate a 420 nm, relativamente al basso range

COD (mg/L)	U. Abs (420 nm)
0,0	177
11,6	131
23,2	127
46,4	80
58,0	75
69,6	42
81,2	36

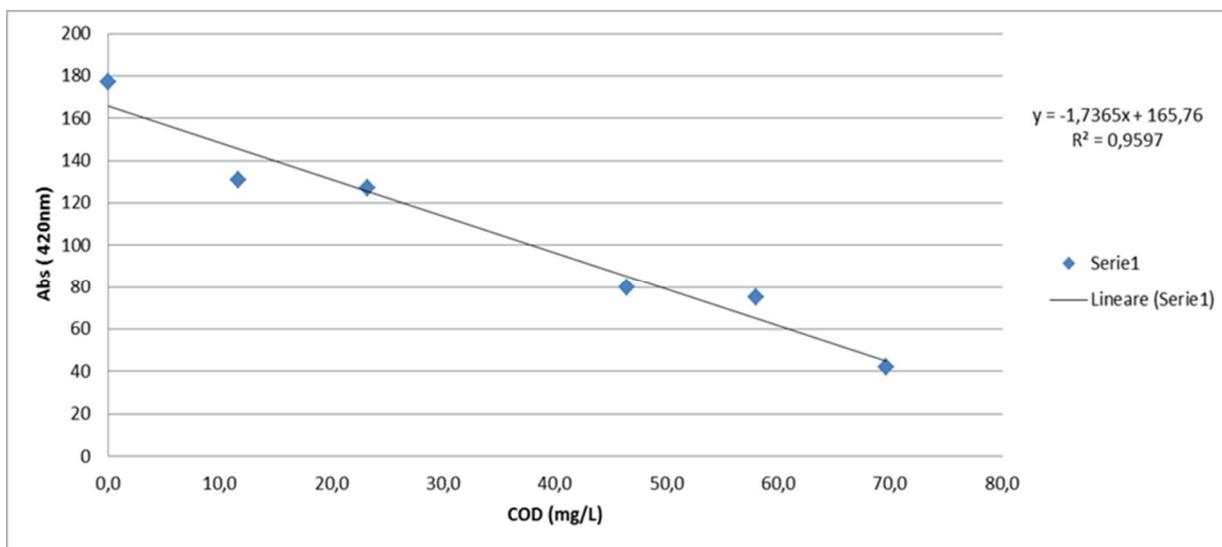


Figura 5. Retta di taratura per COD basso range. I valori di assorbanza riportati sono corretti per il bianco

4. CONCLUSIONI

In conclusione il metodo descritto presenta una buona riproducibilità (testata nella retta dell'alto *range*) ed un costo unitario per analisi molto basso: circa 13 cent di euro per analisi a cui bisogna aggiungere 40 centesimi di euro circa per lo smaltimento (considerando di produrre 10 mL di rifiuto liquido ad analisi). Tale costo appare nettamente inferiore a quello dei kit in commercio (circa 4,0 € cadauno escluso lo smaltimento).

BIBLIOGRAFIA

Standard Methods for the examination of water and wastewater 2005, 21st Edition.
 REACH regulation (EU) No 348/2013 of 17 April 2013, amending Annex XIV to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)

Determinazione di Glifosate e Acido aminometilfosfonico (AMPA) mediante derivatizzazione ed analisi HPLC-MS in alta risoluzione

a cura di

Michele Mazzetti (*), Lisa Patricelli, Paolo Altemura, ARPA Toscana, Sett. Laboratorio AVL, Chimica II – Livorno
Guido Spinelli, ARPA Toscana - Firenze

RIASSUNTO

Il presente metodo ha lo scopo di determinare l'erbicida glifosate insieme al suo principale metabolita, l'acido aminometilfosfonico (AMPA), a livello di sub-microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$) in campioni di acqua superficiale, mediante analisi HPLC-MS in alta risoluzione previa derivatizzazione degli analiti con il derivatizzante fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl). La novità del presente metodo è l'uso della spettrometria di massa ad alta risoluzione con sistema Orbitrap come analizzatore. Il sistema analitico, oltre a garantire un'eccezionale affidabilità nella rilevazione e riconoscimento degli analiti, ha sensibilità sufficiente per raggiungere i limiti di rilevabilità richiesti dalla normativa. Il campo di misura del presente metodo è compreso tra 0,020 e 0,5 $\mu\text{g/L}$.

Il limite di quantificazione del metodo, per entrambi gli analiti Glifosate ed AMPA, è pari ad una concentrazione di 0,02 $\mu\text{g/L}$, con un coefficiente di variazione (CV) intorno al 10 %, per entrambi gli analiti a questa concentrazione. La valutazione dell'incertezza del metodo è stata realizzata attraverso la partecipazione a circuiti interlaboratorio.

SUMMARY

The aim of this method is to determine glyphosate herbicide together with aminomethylphosphonic acid (AMPA), its main metabolite, at sub-micrograms per liter ($\mu\text{g/L}$) in surface water samples, by HPLC-MS with high resolution mass spectrometry after derivatization of the analyte with fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). The novelty of this method is the use of high resolution mass spectrometry with Orbitrap as the mass analyzer. The analytical method, as well as providing exceptional reliability in the detection and identification of the analytes, has sufficient sensitivity to reach the required detection limits. The measuring range of this method is between 0.020 and 0.5 $\mu\text{g/L}$.

The method quantification limit for both glyphosate and AMPA is 0.02 $\mu\text{g/L}$, with a 10% coefficient variation (CV) for both analytes at that concentration level. The evaluation of the uncertainty of the method was carried out by participating in interlaboratory circuits.

INTRODUZIONE

Il glifosate (N-(fosfonometil)glicina, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$), è un analogo aminofosforico della glicina, scoperto da Monsanto all'inizio degli anni '70 come diserbante sistemico di post-emergenza non selettivo (fitotossico per tutte le piante). Il glifosate ha una penetrazione molto bassa nel suolo, in quanto viene degradato dai batteri presenti nel suolo e, di conseguenza, non raggiunge elevate concentrazioni nelle falde acquifere. Il suo principale prodotto di degradazione è l'acido aminometilfosfonico (AMPA) che invece è fra gli erbicidi più frequentemente ritrovati nei corpi acquiferi sotterranei.

L'uso del glifosate in agricoltura è stato approvato per la prima volta negli anni settanta del XX secolo e negli anni a seguire ha ricevuto approvazione in 130 paesi del mondo (dati 2010), tra cui l'Italia, dove era uno dei diserbanti più diffusi sia per il diserbo totale agricolo sia urbano.

Recentemente il Ministero della Salute ha approvato il 9 agosto 2016 il decreto Revoca di autorizzazioni all'immissione in commercio e modifica delle condizioni d'impiego di prodotti fitosanitari contenenti la

sostanza attiva glifosate in attuazione del Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1313. Il Decreto ha modificato le condizioni d'impiego di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva glifosate, fra le quali:

- divieto di impiego nelle aree frequentate dalla popolazione, quali: parchi, giardini, campi sportivi e aree ricreative, cortili e aree verdi all'interno di plessi scolastici, aree gioco per bambini e aree adiacenti alle strutture sanitarie;
- divieto di impiego in pre-raccolta al solo scopo di ottimizzare il raccolto o la trebbiatura;
- divieto, ai fini della protezione delle acque sotterranee, dell'uso non agricolo su suoli contenenti una percentuale di sabbia superiore all'80%, nelle aree vulnerabili e nelle zone di rispetto.

Per quanto riguarda il limite per le acque destinate al consumo umano, il D.Lgs. 31/2001 prevede come valore di parametro 0,1 $\mu\text{g/L}$ per ciascuno antiparassitario determinato e 0,5 $\mu\text{g/L}$ per la somma totale degli antiparassitari.

Il presente metodo ha lo scopo di determinare l'erbicida glifosate insieme al suo principale metabolita, l'acido aminometilfosfonico (AMPA), a livello di sub-

* m.mazzetti@arpato.toscana.it

microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$) in campioni di acqua superficiale, mediante analisi HPLC-MS in alta risoluzione previa derivatizzazione degli analiti con il derivatizzante fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl). La novità del presente metodo è l'uso della spettrometria di massa ad alta risoluzione con sistema Orbitrap come analizzatore. Il sistema analitico, oltre a garantire un'eccezionale affidabilità nella rilevazione e riconoscimento degli analiti, ha sensibilità sufficiente per raggiungere i limiti di rilevabilità richiesti dalla normativa.

1. PRINCIPIO DEL METODO

Il presente metodo ha lo scopo di determinare l'erbicida glifosate insieme all'acido aminometilfosfonico (AMPA), il suo metabolita principale, mediante analisi HPLC-MS in alta risoluzione previa derivatizzazione degli analiti con il derivatizzante fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl).

Il metodo prevede le seguenti fasi:

- 1) derivatizzazione degli analiti con Fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl),
- 2) stadio di purificazione su colonna di estrazione in fase solida (SPE) non in linea;
- 3) rilevazione e quantificazione degli analiti mediante diluizione isotopica previa aggiunta all'aliquota di saggio di una quantità nota di $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ Glifosate e $^{13}\text{C}^{15}\text{ND}_2$ Acido aminometilfosfonico (AMPA) utilizzando la tecnica cromatografia liquida ad alta prestazione e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HRMS) con tecnologia Orbitrap e ionizzazione Electrospray (ESI) positiva.

La presente procedura di prova integra e dettaglia il metodo United States Geological Survey (USGS) "Determination of Glyphosate its Degradation product Aminomethylphosphonic Acid, in Water by Isotope Dilution and Online Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Techniques and methods 5-A10" per la determinazione di concentrazioni di Glifosate e Acido aminometilfosfonico (AMPA) a livello di sub-microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$) in campioni di acqua superficiale e sotterranea.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo si applica all'analisi di campioni di acqua sotterranea e superficiale, incluse le acque di transizione.

Il campo di applicazione del presente metodo è compreso tra 0,020 e 0,5 $\mu\text{g/L}$ ed è perciò conforme ai requisiti richiesti dal D.Lgs 31/2001.

Poiché le particelle in sospensione vengono rimosse dai campioni mediante filtrazione, il metodo è adatto per la determinazione della frazione disciolta dei composti in esame.

3. REAGENTI E MATERIALI

3.1 Reagenti

I reagenti utilizzati, di grado di purezza analitico quando non diversamente specificato, sono i seguenti:

- 3.1.0 Metanolo, Isopropanolo, Acqua (grado LC-MS),
 - 3.1.1 Acido formico (grado LC-MS),
 - 3.1.2 Ammonio formiato (grado LC-MS),
 - 3.1.3 Diclorometano (grado per analisi di residui),
 - 3.1.4 Sodio tetraborato
 - 3.1.5 Potassio idrossido (KOH)
 - 3.1.6 Acido Cloridrico concentrato (HCl)
 - 3.1.7 Fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl)
 - 3.1.8 Sale tetrasodico di EDTA (Na_4EDTA , purezza >99%)

3.2 Soluzioni di lavoro di reagenti:

- 3.2.1 Soluzione HCl 6M: La soluzione deve essere preparata diluendo 50 mL di HCl concentrato con 50 mL di acqua
- 3.2.2 Soluzione KOH 6M: deve essere preparata sciogliendo cautamente 33,7 g di KOH in 100 mL di acqua
- 3.2.3 Soluzione FMOC-Cl 6,5 mM: La soluzione deve essere preparata giornalmente disciogliendo 168 mg di FMOC-Cl in 100 mL di acetonitrile.
- 3.2.4 Soluzione di Na_4EDTA 1,0 M: La soluzione deve essere preparata disciogliendo 38,2 g di Na_4EDTA in 100 mL di acqua
- 3.2.5 Soluzione di Tampone Borato 5%: La soluzione deve essere preparata disciogliendo 25 g di sodio tetraborato in 500 mL di acqua utilizzando un bagno ad ultrasuoni e scaldando, se necessario, fino a 50°C. La soluzione deve essere conservata refrigerata a 4°C e, se correttamente conservata, ha una validità di sei mesi dalla data di preparazione. Prima dell'utilizzo l'eventuale corpo di fondo presente deve essere completamente ridisciolto, ad esempio, ponendo la bottiglia contenente la soluzione in questione in un bagno ad ultrasuoni.
- 3.2.6 Soluzione HPLC. Fase eluente A: Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%, metanolo, 2%
- 3.2.7 Soluzione HPLC. Fase eluente B: Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%
- 3.2.8 Soluzione di ricostituzione per ionizzazione positiva: identica a Soluzione HPLC. Fase eluente A

3.3 Materiali

- 3.3.1 Normale vetreria da laboratorio.
- 3.3.1 Vial per cromatografia, in vetro o materiale plastico, dotati di riduzione interna da almeno da 0,3 ml con tappo a vite e setto teflonato.
- 3.3.1 Filtri in carta tipo Whatman grado 1, (qualitativi, porosità 11 μm) o equivalenti.
- 3.3.1 Cartina indicatrice di pH universale.
- 3.3.1 Colonne per estrazione in fase solida (SPE) Phenomenex Strata-X 33 μm , 200 mg, o equivalente

3.3.1 Colonna per separazione HPLC Phenomenex Gemini C18-NX, 150 mm, 2 mm, 3 μ m, o equivalente

4. ANALITI

Gli analiti da determinare, glifosate e acido aminometilfosfonico (AMPA), e i composti analoghi marcati con isotopi stabili, 1,2- $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ glifosate e $^{13}\text{C}^{15}\text{ND}_2$ acido aminometilfosfonico (AMPA), devono essere della massima purezza disponibile.

4.1 Soluzioni di conservazione degli standard

Tutte le soluzioni devono essere conservate in recipienti di polietilene o altro materiale plastico, congelate, alla temperatura di -18°C .

4.1.1 Soluzioni di conservazione di standard: Le soluzioni di conservazione devono avere una concentrazione di almeno 100 mg/L. La data di scadenza di tali soluzioni, se correttamente conservate, è di un anno dalla data di preparazione o di apertura e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per lo standard originario.

4.1.1 Soluzioni di conservazione intermedie di standard: Le soluzioni di conservazione intermedie devono avere una concentrazione di almeno 1 mg/L. La data di scadenza di tali soluzioni se correttamente conservate è di sei mesi dalla data di preparazione e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per lo standard originario

4.1.1 Soluzioni di lavoro di standard: Le soluzioni di conservazione intermedie devono avere una concentrazione di 0,1 mg/L. La data di scadenza di tali soluzioni se correttamente conservate è di un mese dalla data di preparazione e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per lo standard originario

5. APPARECCHIATURE

5.1 Bagno ad ultrasuoni

5.1 Bilancia tecnica con sensibilità di 0,01 g

5.1 Bilancia analitica con sensibilità di 0,1 mg

5.1 Pompa a membrana KNF o equivalente

5.1 Sistema di evaporazione centrifugo Genevac o equivalente

5.1 Sistema di evaporazione in corrente di gas inerte (Azoto)

5.1 Sistema di eluizione per colonne SPE Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold o equivalente dotato di rubinetti in teflon

5.1 Sistema HPLC/HRMS Thermo Accela 1250/Thermo Orbitrap Exactive con autocampionatore Thermo Open Accela o equivalente

6. CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Per il campionamento devono essere utilizzate bottiglie di plastica da 500 mL. Le aliquote di prova campionate in contenitore di materiale plastico sono conservate a temperatura pari o inferiore a -18°C .

Prima delle operazioni analitiche, le aliquote di prova vengono scongelate mantenendole a temperatura ambiente per circa 24 ore.

7. DERIVATIZZAZIONE

Una aliquota di prova (circa 100 mL) viene filtrata attraverso un filtro di carta, quindi, 80 mL di filtrato limpido vengono trasferiti in una bottiglia di vetro e acidificati a pH 1 tramite aggiunta di 1,6 mL di HCl 6 M.

Al fine di massimizzare la dissociazione dei possibili complessi analita-catione, l'aliquota viene agitata manualmente per un minuto e lasciata riposare per almeno un'ora.

Successivamente l'aliquota viene neutralizzata con circa 2 mL di una soluzione 6M di KOH, verificando il pH con cartina indicatrice universale, e addizionata di 0,08 mL di soluzione di lavoro a 0,1 mg/L in miscela di materiale di riferimento isotopicamente arricchito (1,2- $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ Glifosate e $^{13}\text{C}^{15}\text{ND}_2$ AMPA). Tale addizione corrisponde alla introduzione di 8 ng di ciascuno dei due analiti isotopicamente arricchiti, per un valore di concentrazione nell'aliquota di prova di 0,1 $\mu\text{g/L}$.

L'aliquota così trattata viene ulteriormente addizionata di 10 mL di tampone borato, di 10 mL di soluzione di FMOC-Cl (concentrazione FMOC-Cl nell'aliquota di 650 μM), agitata vigorosamente e lasciata a reagire per una notte.

Trascorso tale periodo la reazione viene arrestata acidificando la soluzione circa a pH 3 tramite aggiunta di 1 mL di acido formico concentrato.

L'aliquota derivatizzata viene filtrata attraverso un filtro di carta tipo Whatman Grado 1 in una bottiglia da 250 mL, diluita con 100 mL di acqua e addizionata di 4 mL di soluzione di Na₄EDTA.

8. ANALISI

8.1 Estrazione in fase solida (SPE)

Una colonna SPE (3.3.5) viene installata in una posizione di un sistema Supelco Visiprep o equivalente precedentemente collegato ad una pompa a membrana.

Eseguite tali operazioni, la colonna viene condizionata eluendo sequenzialmente 5 mL di metanolo e successivamente 5 mL di una soluzione acquosa allo 0,1% di acido formico.

L'aliquota derivatizzata, filtrata, diluita e addizionata di Na₄EDTA viene quindi fatta passare attraverso la colonna SPE ad un flusso approssimativo di 2,5 mL/min.

Al termine dell'eluizione l'acqua rimasta sulla fase stazionaria viene rimossa tramite flusso forzato di aria o azoto per circa 30 minuti, al termine dei quali, viene eseguito uno stadio di lavaggio con 2,5 mL di diclorometano ed un successivo nuovo stadio di essiccazione con flusso d'aria o azoto per ulteriori 30

minuti.

Gli analiti vengono desorbiti dalla colonna tramite passaggio, attraverso la stessa, di 9 mL di metanolo avendo cura di raccogliere gli eluati in tubo di prova.

La soluzione metanolica viene quindi evaporata a secchezza tramite evaporatore centrifugo o in corrente di azoto ed il residuo ridisciolti in 0,25 mL di soluzione di ricostituzione.

8.2 Analisi strumentale

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia liquida con rivelatore costituito da uno spettrometro di massa ad alta risoluzione con tecnologia Orbitrap e ionizzazione Electrospray (ESI) positiva.

Gli analiti derivatizzati vengono ricercati operando simultaneamente in modalità di scansione totale (Full Scan) (risoluzione pari almeno a 50000, una accura-

tezza di massa di 2 ppm) e in modalità di frammentazione in cella di collisione (HCD) (risoluzione pari almeno a 50000, una accuratezza di massa di 5 ppm).

Con l'apparecchiatura utilizzata, tale valore di risoluzione consente, qualora venga eseguito un solo evento spettrometrico, una velocità di acquisizione di 2 cps e, nel caso venga eseguito un secondo evento spettrometrico, una velocità di acquisizione di 1 cps (ad esempio una frammentazione sequenziale (MS/MS) in cella di collisione).

La sequenza strumentale per le analisi di routine è costituita dagli estratti derivatizzati dei campioni e da un bianco di processo.

8.2.1 Parametri Strumentali

Le condizioni cromatografiche e spettrometriche sono riportate nelle tabelle seguenti (Tabelle 1-4).

Relativamente alla modalità di scansione completa

Tabella 1. Principali parametri cromatografici

Colonna	Phenomenex Gemini C18 -NX, 150 mm, 2 mm, 3 µm
Temperatura colonna	35°C
Fase eluente A	Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%, metanolo, 2%
Fase eluente B	Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%
Volume di iniezione	50 µL

Tabella 3. Principali parametri spettrometrici

Scan range	150-2000
Fragmentation	HCD on
Polarity	Positive
Microscans	1
Sheath Gas flow rate	35
Aux Gas flow rate	18
Sweep Gas flow rate	0
Spray Voltage	4.50
Capillary temperature	350°C
Capillary Voltage	70
Tube lens Voltage	125
Skimmer Voltage	18
Heater temperature	30°C

Tabella 2. Principali parametri cromatografici: Gradiente HPLC

Tempo (minuti)	Percentuale Fase eluente A	Percentuale Fase eluente B	Flusso (µL/min)
0	90	10	400
1	90	10	400
20	5	95	400
25	5	95	400
27	90	10	400
32	90	10	400

Tabella 4. Parametri di acquisizione MS

Event 1	Event 2
Polarity: positive	Polarity: positive
Resolution: High (50000)	Resolution: High (50000)
ACG Tgt: Balanced	ACG Tgt: Balanced
Max injection time. 100 msec	Max injection time. 100 msec
Fragmentation: off	Fragmentation: on
HCD: none	HCD: 15 eV
Lock mass: on, (m/z=391,28429)	Lock mass off
Scan range: 300-450	Scan Range: 100-400

Tabella 5. Parametri di acquisizione MS: ioni caratteristici (molecolari protonati): modalità di ionizzazione positiva

Analita	Formula ione	lone quantificatore: (Target: Tgt) m/z	lone qualificatore (Qualifier: Qual) m/z
Glifosate-FMOC	C ₁₈ H ₂₀ PNO ₇	392,08936	393,09272
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N Glifosate -FMOC	¹³ C ₂ C ₁₆ H ₂₀ P ¹⁵ NO ₇	395,09311	396,09646
AMPA-FMOC	C ₁₆ H ₁₈ PNO ₅	334,08389	335,08724
¹³ C ¹⁵ ND ₂ AMPA-FMOC	¹³ CC ₁₅ D ₂ H ₁₆ P ¹⁵ NO ₅	338,09683	339,10018

Tabella 6. Parametri di acquisizione MS: principali ioni frammento (HCD 15 eV)

Analita	lone m/z	lone m/z	lone m/z
Glifosate-FMOC	392,08936	214,01111	170,02129
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N Glifosate -FMOC	395,09311	217,01486	173,02503
AMPA-FMOC	334,08389	156,00564	112,01581
¹³ C ¹⁵ ND ₂ AMPA-FMOC	338,09683	160,01858	116,02875

(full scan) in ionizzazione positiva, sono ricercati i seguenti rapporti massa/carica caratteristici del "pattern" isotopico delle specie ioniche in oggetto (Tabella 5).

Il sistema spettrometrico utilizzato (Thermo Orbitrap Exactive), se correttamente calibrato, consente, nelle condizioni d'uso (Enhanced) di operare, in modalità di frammentazione, con una accuratezza di massa di 5 ppm e una risoluzione di 50000.

In maniera similare a quanto riportato per la modalità di scansione completa (full scan), le masse degli ioni

frammento degli analiti, generati in HCD a 15 eV (Tabella 6), saranno ricercate con otto cifre significative (cinque cifre decimali) ma, se richiesto, riportate con sei cifre significative (tre cifre decimali).

I percorsi di frammentazione sono rappresentati graficamente di seguito (Figura 1).

Gli analiti sono identificati e confermati quando è rilevato il picco relativo allo ione di quantificazione (Target) e/o lo ione qualificatore oppure lo ione di quantificazione (Target) e/o almeno uno ione frammento.

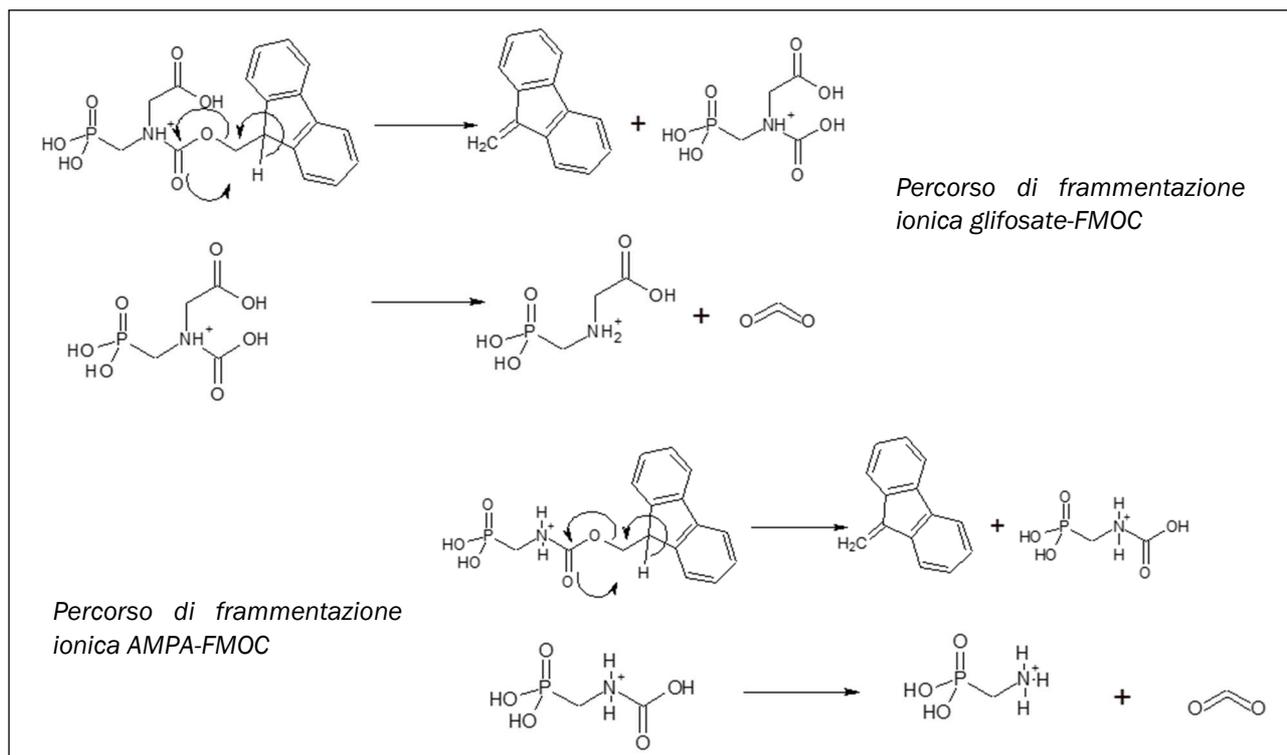


Figura 1. Percorso di frammentazione ionica degli analiti derivatizzati

9. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEL RISULTATO

La risposta strumentale di un rivelatore cromatografico può essere espressa come:

$$A_x = K_x \times m_x \times C_x \quad (1)$$

in cui:

A_x = Area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x

K_x = Fattore di proporzionalità legato alla particolare situazione strumentale

m_x = Fattore di proporzionalità fra la concentrazione dell'analita x e l'area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x

C_x = Concentrazione dell'analita x

Una analoga equazione è valida anche per l'analita x isotopicamente arricchito, e dividendo membro a membro le due equazioni è possibile scrivere la seguente:

$$\frac{A_x}{A_{xILS}} = \frac{K_x \times m_x \times C_x}{K_{xILS} \times m_{xILS} \times C_{xILS}} \quad (2)$$

nella stessa corsa cromatografica K_x e K_{xILS} sono uguali, perciò l'equazione sopra può essere ridotta a:

$$\frac{A_x}{A_{xILS}} = \frac{m_x \times C_x}{m_{xILS} \times C_{xILS}} \quad (3)$$

eseguendo una corsa cromatografica dove le concentrazioni sono uguali l'equazione sopra può essere ulteriormente ridotta a :

$$\frac{A_x}{A_{xILS}} = \frac{m_x}{m_{xILS}} \quad (4)$$

Tale grandezza può essere denominata: Fattore di risposta dell'analita x verso l'analita x isotopicamente arricchito ($F_{x/xILS}$). Quindi:

$$F_{x/xILS} = \frac{A_x}{A_{xILS}} = \frac{m_x}{m_{xILS}} \quad (5)$$

sostituendo nella equazione 4 e riarrangiando opportunamente è possibile scrivere la seguente equazione utilizzata nel calcolo degli analiti in esame:

$$C_x = (A_x/A_{xILS}) \times C_{xILS} \times \frac{1}{F_{x/xILS}} \quad (6)$$

I Fattori di risposta sono stati determinati eseguendo quattro prove in isoconcentrazione per la coppia Glifosate / Glifosate $1,2-^{13}C_2^{15}N$ e Acido aminometilfosfonico (AMPA)/ $^{13}C^{15}ND_2$ Acido aminometilfosfonico (AMPA) (Tabella 7).

Tabella 7. Fattori di risposta per le coppie Glifosate/ Glifosate $1,2-^{13}C_2^{15}N$ e Acido aminometilfosfonico (AMPA)/ $^{13}C^{15}ND_2$ Acido aminometilfosfonico (AMPA)

Prova	F Glifosate / Glifosate $1,2-^{13}C_2^{15}N$	F AMPA / $^{13}C^{15}ND_2$ AMPA
1	1,065790	1,002453
2	1,037343	1,029284
3	1,071827	1,023681
4	1,082627	1,020028
Media	1,064397	1,018862

I risultati sono espressi in microgrammi/litro ($\mu g/L$) con un massimo di tre cifre dopo la virgola (esempio 0,00X $\mu g/L$) e massimo tre cifre significative.

10. VALIDAZIONE

10.1 Precisione e incertezza

Limite di Ripetibilità

Una valutazione della ripetibilità del metodo è stata realizzata attraverso 8 prove eseguite in condizioni di ripetibilità stretta sul *Proficiency Test* denominato *Glyphosate, AMPA, Aminotriazole in Clean Water AGLAE 15M55.1* e su altrettante prove eseguite su di un successivo, analogo PT denominato *Glyphosate, AMPA, Aminotriazole in Clean Water AGLAE 15M55.2*.

Il limite di ripetibilità è stato valutato applicando la seguente equazione:

$$r = t \times s \times \sqrt{2} \quad (7)$$

in cui:

r = limite di ripetibilità

t = valore del parametro t di Student al 95% di pro-

Tabella 8. Calcolo del limite di ripetibilità

Analita	Circuito interlaboratorio	valore medio mg/L	Scarto tipo	Limite di ripetibilità
AMPA	AGLAE 15M55.1	0,291	0,023053	0,076
Glifosate	AGLAE 15M55.1	0,174	0,015344	0,051
AMPA	AGLAE 15M55.2	0,600	0,010385	0,034
Glifosate	AGLAE 15M55.2	0,249	0,010471	0,035

Tabella 9. Risultati dei circuiti interlaboratorio

Circuito interlaboratorio	Analita	Valore medio mg/L x	Valore di riferimento mg/L m	Scarto tipo mg/L s _z	Z-score
AGLAE 15M55.1	AMPA	0,2920	0,3822	0,0601	-1,50
AGLAE 15M55.1	Glifosate	0,1738	0,2263	0,0303	-1,74
AGLAE 15M55.2	AMPA	0,6433	0,5552	0,1012	+0,87
AGLAE 15M55.2	Glifosate	0,2063	0,3222	0,1169	-0,99
AGLAE 16M55.1	AMPA	0,1430	0,1361	0,0222	+0,31
AGLAE 16M55.1	Glifosate	0,1620	0,1285	0,0273	+1,23

bilità per (n-1) gradi di libertà, nel caso specifico per (8-1) gradi di libertà il parametro t è pari a 2.36

s = scarto tipo relativo ai dati di concentrazione espressi in mg/l per le n prove

Nella tabella 8 sono riassunti i risultati delle elaborazioni dei dati.

Esattezza

Una valutazione della esattezza del metodo è stata realizzata attraverso la partecipazione ai circuiti interlaboratorio precedentemente citati (*Glyphosate, AMPA, Aminotriazole in Clean Water AGLAE 15M55.1 e AGLAE 15M55.2*) (Tabella 9).

Conformemente alla Decisione 657/2002 punto 1.43. che stabilisce che “Per esattezza si intende la concordanza tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati e un valore di riferimento accettato”, nel presente metodo, l'esattezza è espressa secondo la seguente equazione:

la seguente equazione:

$$Esattezza = (M_x)/(R_x) \times 100 \quad (8)$$

in cui:

M_x = Concentrazione media dell'analita x determinata dal laboratorio

R_x = Concentrazione di riferimento dell'analita x

Tabella 10. Valutazione dell'esattezza

Circuito interlaboratorio	Analita	Esattezza (%)
AGLAE 15M55.1	AMPA	76.4
AGLAE 15M55.1	Glifosate	76.8
AGLAE 15M55.2	AMPA	115.8
AGLAE 15M55.2	Glifosate	64.0
AGLAE 16M55.1	AMPA	105,1
AGLAE 16M55.1	Glifosate	126,1

Poiché la normativa di riferimento “DIRETTIVA 2009/90/CE del 31 luglio 2009 che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque” non riporta alcun riferimento relativo al parametro in esame, l'esattezza del metodo è stata valutata secondo quanto riportato nella Decisione 657/2002 che, nella Tabella 2, “Esattezza minima dei metodi quantitativi” stabilisce per “concentrazioni ≤1 µg/Kg” un intervallo di esattezza accettabile “da - 50 % a + 20 %” (50-120%).

Sulla base di quanto sopra riportato l'esattezza calcolata tramite la partecipazione ai due esercizi interlaboratorio è stata giudicata accettabile.

Incertezza

In maniera simile al paragrafo precedente, una valutazione dell'incertezza del metodo è stata realizzata attraverso la partecipazione ai precedentemente citati circuiti interlaboratorio *Glyphosate, AMPA, Aminotriazole in Clean Water AGLAE 15M55.1 e AGLAE 15M55.2*.

L'ottenimento di Z-score inferiori a 2 ha consentito di utilizzare lo scarto tipo del circuito interlaboratorio come scarto tipo di riproducibilità del laboratorio

$$S_{pt}x = S_{R}x \quad (9)$$

in cui:

S_{pt}x = Scarto tipo del circuito interlaboratorio relativo alla concentrazione dell'analita x

S_Rx = Scarto tipo di riproducibilità relativo alla concentrazione dell'analita x

e quindi di calcolare l'incertezza estesa secondo la seguente formula

$$u_e x = k \times S_{R}x \quad (10)$$

in cui:

u_ex = Incertezza estesa relativa alla concentrazione dell'analita x

k = fattore di copertura. Nel caso specifico il valore di k è pari a 2

Tabella 11. Calcolo del CV%

Circuito interlaboratorio	Analita	Scarto tipo mg/L s_z	Valore di riferimento mg/L m	Incertezza estesa $U_e = k \times s_z$	CV%
AGLAE 15M55.1	AMPA	0,0601	0,3822	0,1202	17,2
AGLAE 15M55.1	Glifosate	0,0303	0,2263	0,0606	13,4
AGLAE 15M55.2	AMPA	0,1012	0,5552	0,2024	18,2
AGLAE 15M55.2	Glifosate	0,1169	0,3222	0,2338	36,3
AGLAE 16M55.1	AMPA	0,0222	0,1361	0,0444	16,3
AGLAE 16M55.1	Glifosate	0,0273	0,1285	0,0546	21,2

Tale valore viene convertito nel Coefficiente di Variazione Percentuale (CV%) applicando la seguente equazione in cui la simbologia ha i significati sopra riportati:

$$CV = (u_x) / (R_x) \times 100 \quad (10)$$

I risultati del calcolo sono riportati in tabella 11.

Il valore dell'incertezza estesa, comprensiva di un fattore di copertura di 2, viene assunta pari al 50 % del valore trovato, in tutto il campo di misura, quindi il risultato da riportare sul Rapporto di Prova sarà:

$$X \pm U_e = X \pm 2 \cdot s_z = X \pm 0,5 \cdot X$$

dove il valore dell'incertezza deve essere un numero costituito dallo stesso numero di cifre decimali del valore trovato.

La relazione sopra riportata è valida per valori all'interno del campo di misura di $0,02 \div 0,5 \mu\text{g/L}$; per valori di concentrazione di Glifosate ed AMPA superiori a $0,5 \mu\text{g/L}$ non viene riportata l'incertezza.

10.2. Limite di Quantificazione

Poiché il metodo riporta come limite inferiore del campo di applicazione la concentrazione di $0,020 \mu\text{g/L}$, tale livello di concentrazione è stato investigato eseguendo sette prove indipendenti su aliquote da

DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

Aliquota di prova: aliquota del campione totale sulla quale si esegue la prova analitica.

Aliquota da saggio: parte della aliquota di prova sulla quale viene eseguita la determinazione analitica

Nativi: analiti non arricchiti isotopicamente.

Diluizione isotopica: tecnica di quantificazione basata sull'aggiunta di analiti isotopicamente arricchiti generalmente (^{13}C e/o ^2H e/o ^{15}N).

Limite di rilevabilità: minima quantità del singolo congenere presente nel campione di prova che, nell'analisi strumentale, fornisce un'intensità del segnale 4 volte superiore a quella del rumore di fondo.

Risoluzione: Rapporto tra il valore della massa del frammento analizzato e la minima variazione di massa apprezzabile dallo spettrometro.

Accuratezza di massa: Considerando il valore di massa fornito dalla strumentazione come una sola lettura l'accuratezza della massa sarà intesa come il risultato della seguente equazione:

$$\Delta mi = \frac{(mi - ma)}{ma} \times 10^6 \quad \text{in parti per milione (ppm)} \quad (12)$$

ESI = ionizzazione per elettrospray riferibile, come sostantivo, sia al processo fisico sia alla sorgente per spettrometri

FMOC-Cl = Fluorenilmetilcloroformiato

HCD = cella di collisione per frammentazioni ioniche sequenziali

HPLC/HRMS = Cromatografia liquida ad alta risoluzione / Rivelazione a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

ILS (Isotope Labelled Standard) = materiale di riferimento certificato isotopicamente arricchito

MS/MS = processo di frammentazione ionica sequenziale

m/z = Rapporto tra la massa molecolare (o atomica) di un dato frammento e la sua carica

Na₄EDTA = sale tetrasodico dell'acido etilendiamminotetracetico

ppm = parti per milione

S/N = Rapporto tra le intensità del segnale e del rumore di fondo.

SPE = Estrazione in fase solida

saggio di acqua minerale, per verificarlo quale limite di quantificazione.

La quantificazione ha fornito per l'AMPA una concentrazione media di 0,018 µg/L con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) dell'11%, mentre per il Glifosate la concentrazione media di 0,020 µg/L con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) pari all'8%.

Si conferma quindi, che il LOQ del metodo, per entrambi gli analiti Glifosate ed AMPA, è pari ad una concentrazione di 0,02 µg/L.

10.3. Limite di Rilevabilità

Per la determinazione del parametro in oggetto, sono state eseguite cinque prove indipendenti su aliquote da saggio di acqua minerale contaminata alla concentrazione di 0,005 µg/L.

Il processo di frammentazione in HCD non ha mai fornito nessuno degli ioni frammento previsti, limitando il processo di identificazione al solo ione molecolare protonato e alla coincidenza del tempo di ritenzione con quello della analoga sostanza isotopicamente arricchita.

La quantificazione ha fornito per l'AMPA una concentrazione media di 0,0034 µg/L con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) del 20%, mentre per il Glifosate la concentrazione media di 0,0106 µg/L con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) pari al 49%.

In definitiva si assume che il LOD del metodo, per entrambi gli analiti Glifosate ed AMPA, è pari ad una concentrazione di 0,005 µg/L.

11. PRECAUZIONI DI SICUREZZA

I campioni da sottoporre a prova, i materiali di riferimento e parte dei reagenti utilizzati nel presente metodo di prova, possono essere dannosi per la salute e/o per l'ambiente, per cui occorre rispettare le normali precauzioni utilizzate nella manipolazione di reagenti chimici.

È inoltre necessario rispettare le prescrizioni riportate nelle schede di sicurezza conservate nei locali del laboratorio, ed utilizzare i dispositivi di protezione individuale necessari.

BIBLIOGRAFIA

DECRETO LEGISLATIVO. 2 febbraio 2001, n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano"

EUROPEAN COMMISSION: DECISIONE 657 del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati

EUROPEAN COMMISSION: DIRETTIVA 2009/90/CE del 31 luglio 2009 che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque"

EUROPEAN COMMISSION: "Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed". SANCO/12571/19 November 2013 AL2013 rev. 0"

U.S. GEOLOGICAL SURVEY: United States Geological Survey Techniques and methods 5-A10: 2009: "Determination of Glyphosate its Degradation product Aminomethylphosphonic Acid, in Water by Isotope Dilution and Online Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry".



Modelli *pore-scale* di flusso e trasporto reattivo nei mezzi porosi

XXVIII ciclo di Dottorato in Ingegneria Ambientale

Università degli Studi di Roma La Sapienza

Dott. Paolo Di Palma

I processi di flusso e trasporto reattivo nei mezzi porosi si osservano in una grande varietà di campi e applicazioni, tra i quali l'idrogeologia, la bonifica dei siti contaminati e le attività estrattive. In particolare nell'ambito dei problemi ambientali, la conoscenza/comprendimento di come determinate sostanze inquinanti, spesso disciolte in acqua e altamente pericolose per gli esseri viventi, si muovono nel sottosuolo è di fondamentale importanza per identificare le migliori tecnologie per la loro rimozione, sia nelle acque sotterranee che nella zona vadosa.

L'approccio tradizionale che viene utilizzato per studiare la dinamica (singola o multi-fase) dei fluidi e i processi di trasporto di sostanze disciolte nei mezzi porosi è basato su una rappresentazione macroscopica (ipotesi del continuo, Bear, 1972). Secondo tale ipotesi, il mezzo poroso reale composto di grani e vuoti, è rappresentato da un mezzo fittizio nel

quale le grandezze macroscopiche di interesse (es. porosità e permeabilità) vengono mediate su un volume elementare rappresentativo (REV) che contiene un elevato numero di molecole di fluido e pertanto può essere trattato come un continuo. A questa scala, le forze che agiscono sul fluido e tra fluido e grani sono modellati attraverso un insieme di equazioni costitutive quali la legge di Darcy per i mezzi saturi, l'equazione di Richards per il moto nella zona non satura e l'equazione di advezione e dispersione per il trasporto di un soluto.

La rappresentazione dei processi di flusso e trasporto alla macro-scala però non riesce a descrivere in modo adeguato alcuni fenomeni che avvengono nei mezzi porosi. Tra questi si possono menzionare l'effettiva entità delle reazioni chimiche e della degradazione biologica che avvengono all'interfaccia grano fluido e/o all'interno del flusso in cui viene trasportato il composto disciolto; le code di concentrazione che si generano nei plume di contaminazione, dovute a processi di *back-diffusion* o trasporto anomalo (non-Fickiano) per la presenza di eterogeneità nei mezzi porosi. Inoltre, i parametri utilizzati all'interno delle equazioni costitutive sono spesso difficili da stimare, sia in campo che in laboratorio, e affetti da incertezza. Il maggiore impatto

che queste incertezze possono provocare si riscontra nella sovrastima delle effettive reazioni chimico/biologiche per la riduzione del plume di contaminante, con una conseguente sottostima del tempo di arrivo del composto pericoloso al potenziale bersaglio sensibile e dei costi della bonifica.

Per i motivi citati, la possibilità di studiare i processi di flusso e trasporto nei mezzi porosi ad una scala di maggiore dettaglio, quale quella microscopica (*pore-scale*), è legata alla difficoltà di rappresentare il mezzo a quella scala ed alla capacità di risolvere per via numerica le equazioni bilancio della massa e quantità di moto (equazione di Navier-Stokes) per il moto del fluido e l'equazione di advezione e diffusione (e reazione) per descrivere il trasporto di un soluto.

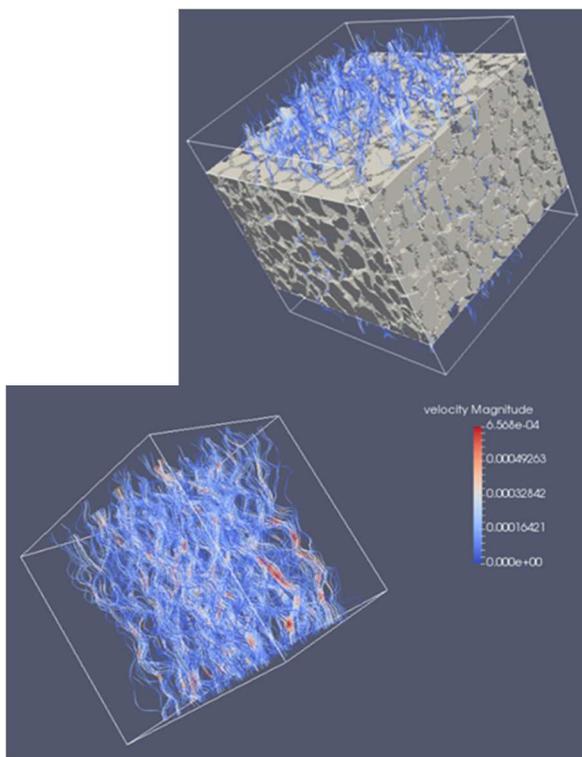


Figura 1. Risultati di una simulazione di flusso all'interno di un mezzo ricostruito. L'intensità delle velocità è rappresentata dal colore delle *streamlines*

News

L'approccio pore-scale si è rapidamente sviluppato negli ultimi decenni grazie allo sviluppo di tecnologie per l'acquisizione di immagini 3D (Micro tomografia computerizzata) di mezzi porosi reali e all'avvento di strumenti di calcolo efficienti (calcolo in parallelo) (Blunt et al., 2013). Attraverso l'approccio microscopico è possibile stimare le proprietà macroscopiche di mezzi porosi che generalmente sono difficili da ottenere e studiare processi impossibili da riprodurre in laboratorio. In questo contesto, il metodo lattice Boltzmann (LBM) è emerso negli ultimi anni come un approccio alternativo efficace e computazionalmente sostenibile per lo studio della dinamica dei fluidi (Succi, 2001). Diversamente dai tradizionali schemi numerici che risolvono le equazioni di continuità macroscopiche, il metodo LBM si basa sulla meccanica statistica e sull'equazione cinetica dei gas. L'idea di fondo è quella di considerare delle particelle fittizie, le quali rappresentano quantità statisticamente rilevanti di fluido che si muovono su una griglia di calcolo e che seguono semplici regole quando vengono a collidere tra loro. Ciascuna di queste particelle "trasporta" una grandezza fisica, come pressione e velocità per il campo idrodinamico e la concentrazione per processi di trasporto.

L'obiettivo della tesi ha riguardato lo studio di processi di flusso e trasporto alla *pore-scale* e la loro relazione con la dinamica dei contaminanti alla scala macroscopica. In particolare, tre domande di ricerca sono state investigate: 1) come la struttura del mezzo poroso influenzi le proprietà macroscopiche (es. permeabilità, velocità infiltrazione, coefficiente di dispersione idrodinamico) dei processi di flusso e trasporto e quale sia il limite nel considerare i valori di tali proprietà mediati sul REV 2) quale sia l'impatto che le eterogeneità nella struttura di un mezzo poroso hanno sulla migrazione di contaminanti in fase disciolta 3) come sia possibile modellare efficacemente il trasporto reattivo, che è controllato maggiormente dalle interazioni tra fluido e solido.

Per studiare gli effetti della struttura del mezzo sono state effettuate simulazioni di flusso 3D all'interno di mezzi porosi ricostruiti (Figura 1).

L'obiettivo è stato quello di valutare la sensibilità della velocità di infiltrazione (grandezza macroscopica presa come riferimento) alla distribuzione spaziale dei pori e l'incertezza associata alle dimensioni del mezzo e alla risoluzione spaziale utilizzata per lo schema LBM. La ricostruzione del mezzo poroso 3D è stata realizzata mediante un approccio di tipo geostatistico, basato sulla generazione casuale di campi gaussiani spazialmente correlati, trasformati in pieni (grani) e vuoti (pori) imponendo una soglia sulla distribuzione gaussiana per ottenere una determinata porosità. I risultati hanno indicato che la velocità di infiltrazione è influenzata maggiormente dal modello geostatistico utilizzato (variogramma) che dalla lunghezza di correlazione (*pore-size*) (Figura 2). La risoluzione spaziale influenza i risultati del flusso solo per *pore-size* piccoli, per i quali il modello LBM non è in grado di risolvere correttamente il campo idrodinamico con conse-

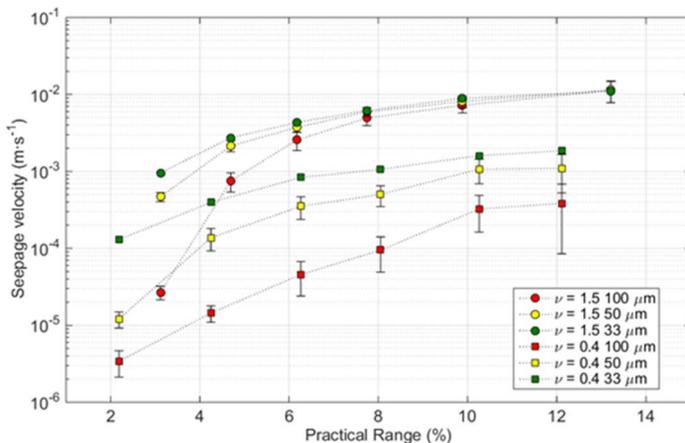


Figura 2. Andamento della velocità di infiltrazione in funzione della distribuzione del *pore-size* per due diversi modelli di semi-variogramma (rispettivamente indicatori cerchi e quadrati) a 3 diverse risoluzioni spaziali (*markers* rossi, gialli e verdi)

News

guente necessità di aumentare la risoluzione e i relativi costi computazionali (Di Palma et al. 2017).

Successivamente è stato studiato l'impatto delle eterogeneità di un mezzo poroso sulla migrazione di un contaminante in fase disciolta. Il maggiore effetto che le eterogeneità producono nel contesto dei siti contaminati è associato all'intrappolamento dei contaminanti nelle lenti fini (a bassa conducibilità idraulica) degli acquiferi, dove il composto è rilasciato per diffusione verso le zone a maggiore conducibilità, producendo delle code di concentrazione che possono aumentare notevolmente i tempi e i costi di un intervento di bonifica. Tale processo è stato riprodotto attraverso simulazioni 2D di flusso e trasporto alla pore-scale. Sono state analizzate le curve di concentrazione *breakthrough* per verificare se sia possibile stimare quantitativamente la massa di contaminante presente all'interno delle zone a bassa mobilità senza alcuna conoscenza a priori delle caratteristiche del mezzo (es. permeabilità). I risultati ottenuti hanno evidenziato che è possibile ricavare tale informazione, seppur con una determinata incertezza dalle curve di *breakthrough* simulate e che la formazione delle code di concentrazione del contaminante è influenzata sia dal rapporto di permeabilità tra mezzo poroso e lente fine che dai regimi di trasporto (advettivo o diffusivo).

Infine l'ultima parte del lavoro è stata dedicata al trasporto reattivo. Nell'ambito dei modelli LBM è stato sviluppato uno schema reattivo per le reazioni che avvengono all'interfaccia tra solido e fluido e/o flussi multifase (Di Palma et al., 2015). I risultati ottenuti sono stati confrontati per la validazione dello schema reattivo con le soluzioni analitiche di tre differenti test benchmark. Attraverso questo modello è possibile descrivere i processi chimico-fisici e biologici che controllano la dinamica di una sostanza disciolta e pertanto può essere applicato nel caso di trasporto reattivo in flussi multifase per simulare processi realistici di bonifica (es. ossidazione chimica o *bioremediation*).

I modelli di flusso e trasporto reattivo alla pore-scale sono ormai una realtà per lo studio dei processi che avvengono nei mezzi porosi naturali.

BIBLIOGRAFIA

Bear, J. (1972). Dynamics of fluids in porous media. *American Elsevier, New York*.

Blunt, M. J., Bijeljic, B., Dong, H., Gharbi, O., Iglauer, S., Mostaghimi, P., ... & Pentland, C. (2013). Pore-scale imaging and modelling. *Advances in Water Resources, 51*, 197-216.

Di Palma, P. R., Huber, C., & Viotti, P. (2015). A new lattice Boltzmann model for interface reactions between immiscible fluids. *Advances in Water Resources, 82*, 139-149.

Di Palma, P. R., Guyennon, N., Heße, F., & Romano, E. (2017). Porous media flux sensitivity to pore-scale geostatistics: A bottom-up approach. *Advances in Water Resources, 102*, 99-110.

Succi, S. (2001). The lattice Boltzmann equation: for fluid dynamics and beyond. *Oxford university press*.

Uno degli obiettivi delle simulazioni pore-scale è quello di fornire i valori dei parametri per le relazioni costitutive utilizzate nei modelli macroscopici, e l'identificazione dei parametri chiave e dei processi fisico-chimici (e/o biologici) che avvengono alla scala microscopica e si manifestano ad una scala maggiore.

La maggiore sfida risiede proprio nel passaggio di scala (*upscaling*) tra i processi che sono ormai ben descritti ad una scala microscopica, ma i cui effetti devono essere inclusi in modelli macroscopici (del continuo), necessari per simulare processi di flusso e trasporto a scale spaziali di interesse pratico. Attualmente tra le due scale esiste un gap di diversi ordini di grandezza (almeno 2 per una scala di laboratorio e fino a 5/6 ordini per quella di campo).



Il Progetto MANGIAFANGHI per la riduzione dei fanghi della depurazione delle acque di scarico

La gestione dei fanghi di depurazione rappresenta attualmente una delle maggiori criticità del ciclo di trattamento delle acque di scarico. Infatti, sebbene il volume dei fanghi prodotti rappresenti solo circa il 2% del volume di acque che affluisce ad un depuratore, il suo trattamento e smaltimento finale può arrivare ad incidere fino al 50% sui costi della depurazione. Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento continuo della produzione di fango sia su scala nazionale che europea. Ad esempio, nell'Unione europea la produzione di fango è in continuo aumento, da 5 milioni di tonnellate di secco nel 1992 fino ad oltre gli 11 milioni attuali. L'Italia con i suoi circa 1,1 milioni di tonnellate costituisce uno dei principali produttori di fanghi di depurazione.

Oltre alle criticità legate alla gestione dei fanghi di risulta, sta assumendo sempre più importanza il contenimento della produzione di odori molesti dagli impianti di depurazione, vista la continua e costante riduzione della distanza tra i centri abitati e i depuratori. Infine, negli ultimi anni si è iniziato a focalizzare l'attenzione anche sulla presenza di contaminanti definiti "emergenti", riscontrati sia nelle acque destinate al consumo umano che nelle acque reflue il cui destino ed effetti sulla salute sono ancora oscuri.



Pertanto, le problematiche sopra riportate costringono a considerare con sempre maggiore attenzione nuove tecnologie di trattamento delle acque reflue che, rispetto a quelle attualmente utilizzate, siano in grado di ridurre la produzione dei fanghi di supero, l'emissione di odori molesti e la quantità di contaminanti emergenti rilasciati con l'effluente trattato.

L'obiettivo finale del progetto MANGIAFANGHI (finanziato dalla Regione Puglia nell'ambito del programma regionale a sostegno della specializzazione intelligente e della sostenibilità sociale ed ambientale- Intervento "Cluster tecnologici regionali"- FSC 2007/2013) è la valutazione in piena scala della sostenibilità economica e ambientale di una tecnologia di depurazione innovativa (nota con l'acronimo SBBGR - *Sequencing Batch Biofilter Granular Reactor*), sviluppata dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR. Tale tecnologia è in grado di ridurre, rispetto alle tecnologie di depurazione convenzionali, la produzione di fango fino al 80%.

L'obiettivo finale del progetto verrà raggiunto attraverso:

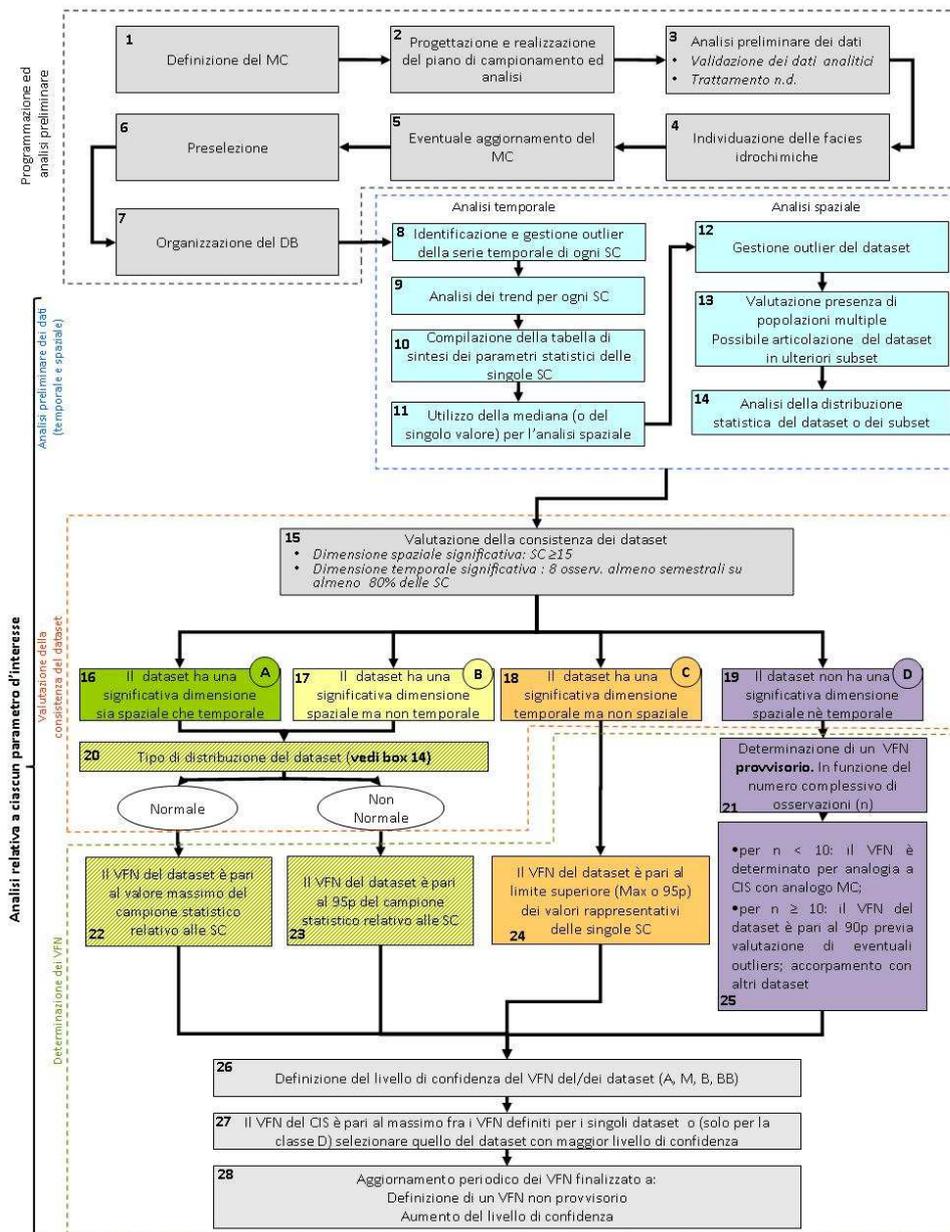
- la progettazione, la realizzazione, la conduzione e la gestione di un dimostratore di impianto SBBGR da circa 3500 abitanti equivalenti da installare presso il depuratore dell'agglomerato di Putignano;
- il monitoraggio e l'ottimizzazione delle prestazioni del dimostratore in termini di rimozione degli inquinanti convenzionali ed emergenti, produzione fanghi ed emissione di sostanze odorigene;
- la valutazione del ciclo di vita della soluzione innovativa proposta.



Linee guida recanti la procedura da seguire per il calcolo dei valori di fondo per i corpi idrici sotterranei (DM 6 Luglio 2016)

Nel corso del mese di giugno è stato pubblicato, nella collana dei manuali e linee guida dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, un documento elaborato da personale dell'IRSA in collaborazione con il Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente ed ISPRA.

Il decreto del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare del 6 luglio 2016 modifica l'allegato 1 del decreto legislativo 3 aprile 2006 n. 152. In particolare, al fine di fornire gli elementi utili alla



Schema della procedura per la determinazione dei valori di fondo per i corpi idrici sotterranei.

Abbreviazioni: MC modello concettuale, SC stazione di campionamento, VFN Valore di fondo naturale, CIS corpo idrico sotterraneo.

Per i livelli di confidenza : A alto, M medio, B basso, BB molto basso

News

valutazione dello stato chimico dei corpi idrici sotterranei, sono richieste delle linee guida da seguire per il calcolo dei valori di fondo naturale. In questo documento le modalità proposte per la determinazione dei valori di fondo sono articolate in funzione della significatività della dimensione spaziale e temporale del data set a disposizione.

Le linee guida riportano anche i criteri per l'attribuzione del livello di affidabilità (alto, medio, basso, molto basso) della determinazione ottenuta, in funzione della quantità di dati disponibili e, più in generale, del livello conoscitivo del corpo idrico sotterraneo esaminato.



Linee guida recanti la procedura da seguire per il calcolo dei valori di fondo per i corpi idrici sotterranei (DM 6 luglio 2016)



155 / 2017

MANUALI E LINEE GUIDA

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Manuali e Linee Guida

155 / 2017

Autori

Stefano Ghergo (CNR-IRSA)

Maurizio Guerra (SNPA-ISPRA)

Marco Marcaccio (SNPA-ARPAE Emilia-Romagna)

Stefano Menichetti (SNPA-ARPA Toscana)

Daniele Parrone (CNR-IRSA)

Elisabetta Preziosi (CNR-IRSA)

ISBN 978-88-448-0830-3

http://www.isprambiente.gov.it/files2017/pubblicazioni/manuali-linee-guida/MLG_155_17.pdf



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

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

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, via Salaria km 29+300.
C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Telefono: 06 90672 850

Fax: 06 90672 787

e-mail: notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Comitato di Redazione

L. Campanella, L. Guzzella, S. Polesello, L. Patrolecco, S. Valsecchi

Segreteria di Redazione

S. Ghergo

<http://www.irsa.cnr.it/Notiziario>