

c.n.r. istituto di ricerca sulle acque

Metodi analitici

per le acque

notiziario

ARCHIVIO PUBBLICAZIONI

ISSN: 0392-1425

Anno 4 - N. 3

Luglio-Settembre 1984

- Determinazione di idrocarburi policiclici aromatici (C. Cartoni, T. La Noce, A. Liberatori e L. Zoccolillo)
- Metodi di determinazione degli oli minerali in acqua di mare: separazione e purificazione (V.U. Fossato e A. Liberatori)
- Caratterizzazione della sostanza organica mediante spettrofotometria infrarossa. Nota 1: impiego di un programma di calcolo (A. Liberatori)
- Indice generale del manuale sui «Metodi analitici per le-acque»
- Indice generale del manuale sui «Metodi di analisi per acque di mare»

- *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (C. Cartoni, T. La Noce, A. Liberatori and L. Zoccolillo)*
- *Determination of mineral oils in seawater: separation and purification (V.U. Fossato and A. Liberatori).*
- *Characterization of organic matter by IR spectrometry. Note 1: utilization of a computing program (A. Liberatori)*
- *«Metodi Analitici per le Acque» (Handbook for Water Analysis). General Index.*
- *«Metodi di analisi per acque di mare» (Handbook for Seawater Analysis). General Index.*

Notiziario di informazioni scientifico-tecniche dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del C.N.R.
Direzione e Redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque. Via Reno, 1 - 00198 Roma - Tel. 06/841451 - Telex IRSAI 614588
Comitato di Redazione: Luigi Campanella, Tullio La Noce, Alfredo Liberatori
Segreteria di Redazione: Mario Barboni, Giuliana De Giovanni, Ornella Malaguti - Grafico. Piero Fusco

La riproduzione è autorizzata a condizione che venga citata la fonte:
C.N.R. - ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE - ROMA

ARCHIVIO
PUBBLICAZIONI
CIVILIA

Con questo Notiziario trimestrale l'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR intende dare un contributo alla divulgazione ed al trasferimento dei risultati di studi relativi all'ammodernamento ed aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi degli inquinanti nelle acque, con riferimento allo sviluppo di nuove tecniche analitiche, alla determinazione di nuovi indici, alla definizione ed ai rimedi per nuove interferenze. In tal senso il Notiziario si rivolge ai laboratori di analisi e controllo pubblici e privati ed ai centri di ricerca specializzati nel settore dell'analisi delle acque ai quali intende fornire un utile strumento di lavoro.

NORME REDAZIONALI

1. Il Notiziario accoglie lavori originali, contributi e comunicazioni a carattere sperimentale e applicativo, reviews e informazioni su attività relative alle metodologie applicate all'analisi delle acque. Inoltre pubblica rubriche speciali dedicate a particolari argomenti di carattere ambientale ivi incluse normative nazionali e comunitarie. I lavori vengono sottoposti per l'approvazione al Comitato di Redazione che provvederà a comunicare agli autori il proprio parere in merito.

2. I testi dei lavori debbono pervenire in originale, dattiloscritti con interlinea due e debbono essere corredati da: 1) il titolo del lavoro; 2) i nomi completi degli Autori e dei rispettivi enti di appartenenza; 3) un breve riassunto (non più di 10 righe) in italiano e in inglese.

3. Il materiale illustrativo deve essere di ottima qualità e consistere in originali disegnati con inchiostro di china su carta non millimetrata, oppure copie eliografiche o fotografiche, oppure fotografie in bianco e nero, possibilmente su carta opaca. Figure (Fig.) e tabelle (Tab.) debbono avere la relativa didascalia, essere numerate progressivamente con numeri arabi e richiamate nel testo.

È preferibile non appesantire le figure con scritte esplicative, che trovano migliore collocazione nella didascalia a piè pagina con numerazione di richiamo nella figura.

4. La Bibliografia sarà riportata alla fine del testo e dovrà essere ordinata alfabeticamente indicando, nel seguente ordine, il cognome e le iniziali del nome di tutti gli Autori, l'anno di pubblicazione, possibilmente il titolo dell'articolo, il titolo del periodico, il numero del volume, la prima e l'ultima pagina del lavoro.

La Bibliografia dovrà essere citata nel testo indicando il cognome degli Autori e l'anno di pubblicazione di ciascun lavoro.

Per l'abbreviazione dei titoli dei periodici si prega di attenersi alle norme internazionali oppure si consiglia di citarli per esteso.

DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI

G. Cartoni*, T. La Noce**, A. Liberatori**, L. Zoccolillo*
 *Dipartimento di Chimica - Università «LA SAPIENZA» - Roma
 **Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR Roma

Riassunto

Gli idrocarburi policiclici aromatici presenti in un campione d'acqua sono estratti con cicloesano. L'estratto è concentrato, purificato su gel di silice e analizzato mediante HPLC a fasi inverse, con rivelazione spettrofluorimetrica.

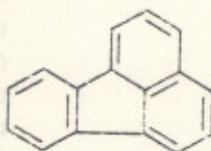
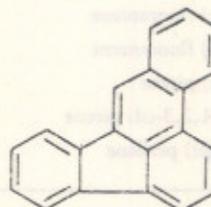
Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons are extracted from aqueous sample by cyclohexane. The organic phase is concentrated, cleaned on silica gel and analyzed by reverse phase HPLC with spectrofluorimetric detector.

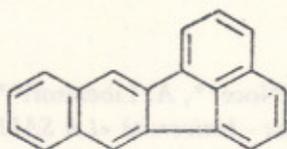
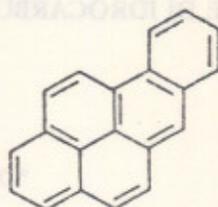
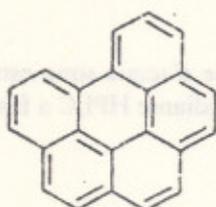
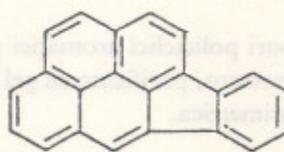
1. Scopo e campo di applicazione

Nelle acque è stata riscontrata la presenza di un gran numero di idrocarburi policiclici aromatici (PAH), alcuni dei quali noti cancerogeni; essi si trovano in soluzione o adsorbiti sul materiale in sospensione.

Il metodo, che viene qui proposto, consente di determinare in acque naturali, incluse le marine, i seguenti PAH:

Fluorantene (0)* C₁₆H₁₀Benzo (b) fluorantene (++) C₂₀H₁₂

* Attività cancerogena: (0) non cancerogeno; (++) fortemente cancerogeno.

Benzo (k) fluorantene (+ +) $C_{20}H_{12}$ Benzo (a) pirene (+ +) $C_{20}H_{12}$ Benzo (ghi) perilene (+) $C_{22}H_{14}$ Indeno (1,2,3-cd) pirene (+) $C_{22}H_{14}$

I sei suddetti PAH sono gli stessi che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha raccomandato di dosare nelle acque superficiali destinate alla potabilizzazione (1). Successivamente anche la direttiva CEE 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano (2) ha fatto riferimento al parametro idrocarburi policiclici aromatici. Tale direttiva sarà attuata quanto prima nell'ordinamento giuridico italiano.

I limiti di rivelazione per i sei PAH, in un campione di acqua, sono riportati in Tab. 1.

Tab. 1

PAH	ng/l
Fluorantene	0.1
Benzo (b) fluorantene	0.05
Benzo (k) fluorantene	0.01
Benzo (a) pirene	0.05
Indeno (1,2,3-cd) pirene	0.5
Benzo (ghi) perilene	0.06

(+) debolmente cancerogeno; (+ +) fortemente cancerogeno.

2. Principio del metodo

Il metodo prevede un'estrazione liquido-liquido del campione di acqua con cicloesano. L'estratto è concentrato e sottoposto a purificazione su strato sottile (TLC) di gel di silice per eliminare le sostanze interferenti, quindi analizzato mediante HPLC a fasi inverse, con rivelazione spettrofluorimetrica.

Il metodo è applicabile a campioni non filtrati (*).

I composti sono identificati paragonando i loro tempi di ritenzione ed i loro spettri di eccitazione e di emissione, eseguiti con la tecnica dello «stopped-flow», con quelli di PAH standard, impiegando due differenti fasi mobili. Il calcolo delle concentrazioni viene eseguito con il metodo dello standard esterno in cui si confrontano le aree dei picchi del campione con le aree dei picchi della soluzione standard.

3. Interferenze

L'impiego della TLC preparativa quale tecnica di purificazione della frazione PAH riduce al minimo l'interferenza dovuta ad altre sostanze organiche, quali lipidi, fenoli, esteri ftalici, ecc., capaci di esibire fluorescenza alle lunghezze d'onda prescelte per l'analisi. Eventuali interferenze, peraltro difficilmente valutabili, possono esserci da parte di altri PAH che la colonna impiegata non è in grado di separare. Fortunatamente l'alta efficienza delle colonne, oggi disponibili, abbinata alla selettività ottenibile con la rivelazione spettrofluorimetrica permettono di ottenere risultati quali-quantitativi abbastanza attendibili.

Ulteriori interferenze possono essere dovute ad impurezze presenti nei solventi, che pertanto vanno accuratamente distillati, o ai recipienti di vetro che possono causare perdite di campione per adsorbimento sulla superficie.

4. Rischi

Alcuni PAH sono altamente cancerogeni per cui devono essere maneggiati con estrema attenzione. Deve essere evitato qualsiasi contatto con materiali solidi, soluzioni standard ed estratti.

I PAH possono codistillare con il solvente e depositarsi all'esterno dei contenitori, questi quindi devono essere maneggiati usando guanti resistenti ai solventi.

5. Campionamento e conservazione del campione

I PAH sono preferenzialmente adsorbiti sul materiale sospeso ed è perciò importante assicurarsi che il campione sia rappresentativo.

Per il campionamento si utilizzano contenitori in vetro scuro, muniti di tappo di vetro, della capacità di 5 l, accuratamente lavati in modo da evitare contaminazioni del campione. I contenitori devono essere riempiti fino all'orlo evitando spazi di aria.

(*) Eventuale materiale grossolano può essere eliminato mediante passaggio attraverso garza idrofila.

Le analisi devono essere eseguite lasciando intercorrere il minor tempo possibile dal momento del prelievo. In caso contrario è opportuno bloccare l'attività biologica dei microrganismi, presenti nell'acqua, tramite aggiunta di cloruro mercurico (50 mg/l).

6. Apparecchiatura

6.1. *Normale vetreria da laboratorio.* A causa delle concentrazioni estremamente basse dei PAH da dosare, va evitata qualsiasi contaminazione della vetreria da utilizzare. È consigliabile perciò effettuare accurati lavaggi ed un accurato controllo della vetreria stessa prima dell'uso.

6.2. *Contenitori per il campionamento* in vetro scuro muniti di tappo di vetro, capacità 5 l.

6.3. *Estrattore liquido-liquido* per solventi con pesi specifici inferiori all'acqua, capacità 2 l. (Fig. 1).

6.4. *Mantello riscaldante* elettrico di dimensioni opportune.

6.5. *Agitatore magnetico.*

6.6. *Evaporatore rotante* con bagno d'acqua.

6.7. *Pompa ad acqua* o equivalente per fare il vuoto.

6.8. *Vaschetta per sviluppo lastre TLC* in vetro, con coperchio a perfetta tenuta.

6.9. *Lampada UV* emittente a 254 nm.

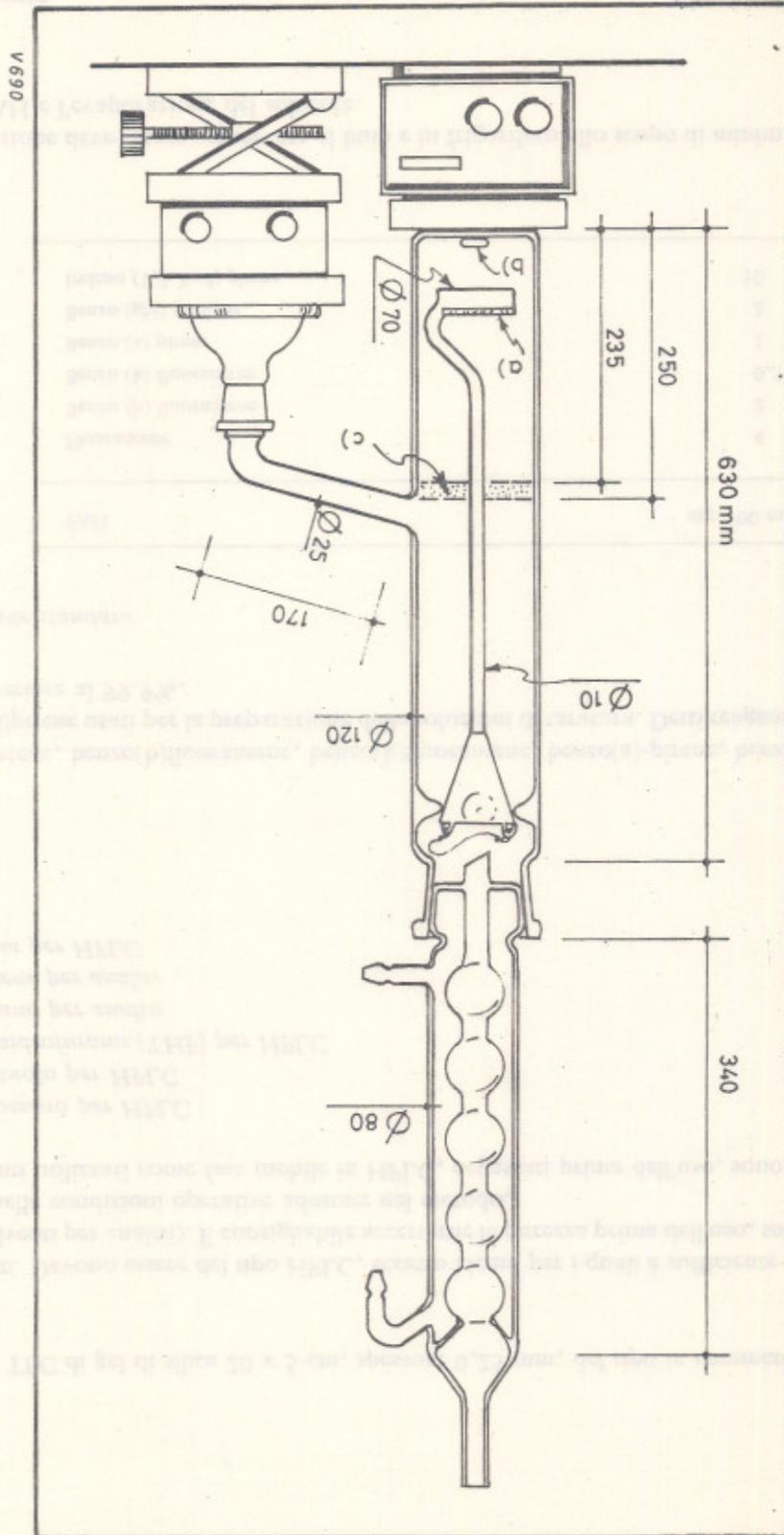
6.10. *Microsiringhe per liquidi* da 5, 10 e 100 μ l.

6.11. *Strumentazione HPLC*, cromatografo liquido con rivelatore spettrofluorimetrico adatto per le colonne e le condizioni operative richieste.

6.12. *Colonna cromatografica in acciaio inossidabile*: lunga 16,5 cm, diametro interno 4,6 cm, riempita con silice (5 μ m) previamente derivatizzata con octadecilsilano.

Possono essere impiegate colonne a fase inversa RP-18 del tipo in commercio. Da notare che in questo caso, i materiali sebbene chimicamente simili, possono presentare proprietà separative diverse per cui il grado di risoluzione dei composti può risultare alterato.

Fig. 1 -
 Estrattore liquido-liquido.
 (a: setto poroso in vetro (G_1);
 b: barretta magnetica rivestita in teflon;
 c: solvente organico).



7. Reattivi

7.1. *Lastre TLC* di gel di silice 20 x 5 cm, spessore 0,25 mm, del tipo in commercio.

7.2. *Solventi*. Devono essere del tipo HPLC, eccetto alcuni per i quali è sufficiente un normale grado di purezza (solventi per analisi). È consigliabile accertarne la purezza prima dell'uso, sottoponendoli ad analisi HPLC nelle condizioni operative adottate nel metodo.

I solventi utilizzati come fase mobile in HPLC, degassati prima dell'uso, sono i seguenti:

7.2.1. *Cicloesano per HPLC*

7.2.2. *Metanolo per HPLC*

7.2.3. *Tetraidrofurano (THF) per HPLC*

7.3.4. *n-Esano per analisi*

7.2.5. *Benzene per analisi*

7.2.6. *Acqua per HPLC*

8. PAH

Fluorantene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)-pirene, benzo(ghi)perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene usati per la preparazione delle soluzioni di taratura. Detti reagenti debbono avere una purezza superiore al 99.9%.

8.1. Soluzione standard

PAH	mg/100 ml THF
Fluorantene	4
Benzo (b) fluorantene	2
Benzo (k) fluorantene	0.5
Benzo (a) pirene	2
Benzo (ghi) perilene	2
Indeno (1,2,3-cd) pirene	10

La soluzione deve essere conservata al buio e in frigorifero allo scopo di minimizzare la decomposizione dei PAH e l'evaporazione del solvente.

9. Procedimento

I PAH, anche se in misura diversa, subiscono fotodecomposizione, tutti gli stadi della procedura devono quindi essere eseguiti in assenza di intensa luce solare o sorgenti di radiazione UV.

9.1. Estrazione

2 l di acqua, raccolta e conservata secondo le istruzioni riportate in 4, vengono estratti con 150 ml di cicloesano in estrattore liquido-liquido (Fig. 1) per 50 ore ad una velocità di distillazione di circa 5 ml/min. L'estrazione viene eseguita sotto costante agitazione. Alla fine dell'estrazione circa 100 ml di cicloesano rimangono stratificati sull'acqua il rimanente — raccolto in pallone a parte — costituisce l'estratto.

Concentrare l'estratto a 1 + 2 ml con l'evaporatore rotante (6.6) (il bagno di acqua non deve superare i 40 °C), trasferire in provetta sfinata e portare a secco in corrente d'azoto a temperatura ambiente.

9.2. Separazione della frazione PAH

Riprendere l'estratto con 100 μ l di tetraidrofurano e applicarlo con una microsiringa sulla lastra di gel di silice. Sviluppare la lastra usando come eluente n-esano-benzene (1:1).

Individuare la macchia relativa ai PAH mediante luce UV ($\lambda = 254$ nm), quindi estruderla, poverizzarla, trasferirla su sistema filtrante, costituito da un imbuto munito di setto di vetro (porosità 16 + 40 μ m) su beuta da vuoto, ed eluirla con 5 ml di tetraidrofurano. Per eliminare eventuale silice residua, che danneggerebbe la colonna nella successiva analisi HPLC, la soluzione tetraidofuranica viene ulteriormente filtrata su filtro millipore (0,5 μ m). La soluzione risultante si porta a secco, seguendo le condizioni soprariportati (9.1), e si riprende con 100 μ l di metanolo (7.2.2.). In caso di campione a concentrazione molto bassa di PAH, riprendere con 50 o anche 30 μ l di metanolo.

9.3. Analisi

L'analisi viene eseguita mediante HPLC a fasi inverse, operando in isocratica, nelle seguenti condizioni:

Colonna: indicazioni in 6.11.1

Fase mobile: metanolo-acqua (90:10)

Flusso: 1 ml/min

Campione iniettato: 5-10 μ l.

Rivelazione spettrofluorimetrica: la lunghezza d'onda di eccitazione viene mantenuta fissa, quella di emissione variata nel corso dell'analisi, come indicato nel prospetto sottostante, in modo da rilevare ciascun PAH nelle migliori condizioni.

PAH	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluorantene	290	440
Benzo (b) fluorantene	290	440
Benzo (k) fluorantene	290	440
Benzo (a) pirene	290	440
Benzo (ghi) perilene	290	420
Indeno (1,2,3-cd) pirene	290	500

Impiegando le condizioni riportate e scelto un opportuno valore dell'attenuazione registrare il cromatogramma dell'estratto. Ripetere le stesse operazioni e registrare il cromatogramma della soluzione standard.

Un cromatogramma tipico di acqua fluviale è riportato in Fig. 2. Misurare i valori delle aree dei picchi, manualmente o utilizzando un sistema di elaborazione dati.

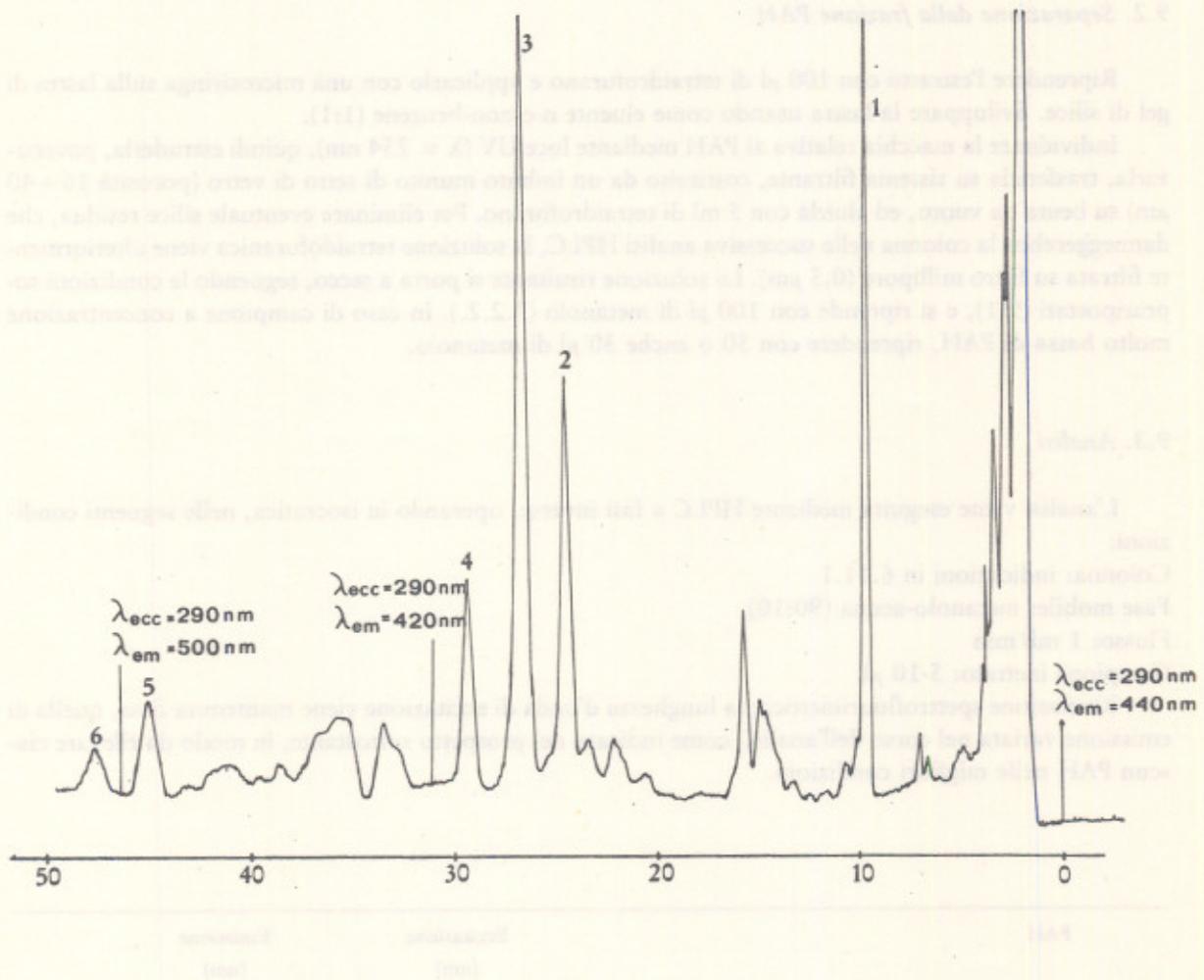


Fig. 2 - Cromatogramma della frazione PAH di un'acqua di fiume

- 1) Fluorantene
- 2) Benzo(b)fluorantene
- 3) Benzo(k)fluorantene
- 4) Benzo(a)pirene
- 5) Benzo(ghi)perilene
- 6) Indeno(1,2,3-cd)pirene

10. Calcoli

La concentrazione di ciascun componente (Q), in ng/l, è ricavata la seguente espressione:

$$Q = \frac{A_c Q_s V_{is} V_e}{A_s V_{ie} V_{tot}}$$

A_c = Area del picco del componente i nel campione moltiplicata per il fattore di attenuazione;

A_s = Area del picco del componente i nel cromatogramma della soluzione standard moltiplicata per il fattore di attenuazione;

Q_s = concentrazione del composto nella soluzione standard, in ng/l;

V_{is} = Volume iniettato della soluzione standard, in μ l;

V_{ie} = Volume iniettato dell'estratto, in μ l;

V_e = Volume dell'estratto, in ml;

V_{tot} = Volume di campione sottoposto ad estrazione, in ml.

11. Bibliografia

- (1) World Health Organisation «International Standard for Drinking Water», 3ª Edizione, WHO Ginevra 1971.
- (2) CEE: Direttiva del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano (80/778/CEE), in Gazz. Uff. delle Comunità Europee L. 229 del 30 agosto 1980.

METODI DI DETERMINAZIONE DEGLI OLI MINERALI IN ACQUA DI MARE: SEPARAZIONE E PURIFICAZIONE

V.U. Fossato* e A. Liberatori**

*Istituto di Biologia del Mare, CNR - Venezia

**Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR Roma

Riassunto

La determinazione degli oli minerali in acqua di mare può essere effettuata con tre differenti tecniche: gravimetrica, spettrofotometrica IR e spettrofotometrica UV (fluorescenza).

In questa breve comunicazione sono illustrate le ragioni che hanno reso possibile l'unificazione dei procedimenti di separazione e purificazione comuni ai tre metodi.

Summary

The determination of mineral oils in seawater can be done by three different techniques: gravimetry, IR spectrometry and fluorescence-UV spectrometry.

In this short communication the reasons which have permitted the unification of separation and purification procedures common to the above methods are discussed.

Quando presso l'Istituto di Ricerca sulle Acque si è affrontato il problema della determinazione degli oli minerali in acqua di mare si è tenuto conto del fatto che nessuno dei metodi generalmente adottati è completamente soddisfacente.

Il metodo gravimetrico è caratterizzato da scarsa sensibilità e presenta lo svantaggio che gran parte degli oli minerali, durante il processo di rimozione del solvente, evaporano e sfuggono alla determinazione analitica.

Il metodo spettrofotometrico all'infrarosso ha una sensibilità migliore ma misura quasi esclusivamente la componente alifatica.

Il metodo spettrofluorimetrico ha un'ottima sensibilità, ma determina soltanto la frazione aromatica.

Per molti versi i tre metodi possono essere considerati complementari.

L'obiettivo che si è cercato di raggiungere per i tre differenti metodi è stato quello di omogeneizzare i procedimenti di estrazione e purificazione degli estratti.

Per quanto concerne la scelta del solvente è stato possibile concludere che può essere utilizzato per tutti e tre i metodi il freon 113 (1.1.2 - tricloro - 1.2.2 - trifluoroetano) il quale presenta un basso punto di ebollizione e buona trasparenza, sia nell'infrarosso che nell'ultravioletto.

In particolare si è potuto constatare che gli spettri di assorbimento e di emissione nell'UV di diversi idrocarburi aromatici polinucleari in esano e in freon 113 sono abbastanza simili sia in termini qualitativi che quantitativi (coefficienti di estinzione e di emissione). Anche nell'IR gli spettri di assorbimento ri-

spettivamente in tetracloruro di carbonio e in freon 113 di differenti sostanze presentano similarità tali da giustificare l'impiego indifferentemente dell'uno o dell'altro solvente.

Per quanto concerne invece la purificazione degli estratti non è stato possibile adottare come adsorbente il florisil che pure aveva fornito ottimi risultati nella determinazione gravimetrica e spettrofotometrica IR degli oli minerali in campioni di acque naturali e di scarico; infatti questo substrato ha una forte capacità di trattenere i composti aromatici polinucleari. Ad esempio eluendo con 80 ml di freon una colonna di florisil (diam. int. 10 mm, altezza 5 cm) disattivato con il 10% di acqua, solo il 20% del crisene viene recuperato. Nelle stesse condizioni di eluizione, lo spettro di emissione di una soluzione di petrolio del Kuwait subisce una netta distorsione con perdita quasi completa della banda di luce oltre i 400 nm ed una netta riduzione di intensità (40 + 50) della luce emessa a 360 nm. Tutto ciò porta alla conclusione che non è possibile unificare la procedura di purificazione degli estratti usando il florisil come adsorbente.

Diverse prove eseguite con il gel di silice hanno dimostrato invece che questo substrato, già adottato nella procedura dell'UNESCO per la determinazione spettrofluorimetrica degli oli minerali in acqua di mare, funziona bene anche usando freon come eluente.

Inoltre questo substrato è stato già utilizzato con successo per la determinazione gravimetrica e spettrofotometrica IR degli oli minerali ed è stato recepito negli «Standard Methods» della American Public Health Association (1980) nei metodi che prevedono l'impiego di freon 113 come solvente.

Per questi motivi riteniamo di poter concludere che i metodi IRSA per la determinazione degli oli minerali in acqua di mare debbano prevedere l'impiego del freon 113 per l'estrazione e il gel di silice per la purificazione, con il vantaggio di arrivare ad una uniformità delle procedure che sarà certamente apprezzata dagli utenti ai quali è rivolto l'invito a far pervenire presso l'IRSA osservazioni e commenti.

Appendice A - Estrazione

Si pongono 2 l del campione in esame in un imbuto separatore e, se non già fatto all'atto del campionamento, vi si aggiungono 5 ml di HCl 1 + 1. Si controlla il pH, che deve risultare minore o eguale a 2, in caso contrario si aggiunge dell'altro acido cloridrico.

Si versano nell'imbuto separatore 100 ml di freon 113, dopo aver lavato con lo stesso la bottiglia di raccolta. Utilizzare per la prima estrazione il solvente eventualmente già impiegato per il lavaggio del dispositivo di campionamento e raccolto assieme al campione.

Agitare l'imbuto separatore per mezzo minuto, aprire il rubinetto per ridurre la pressione interna e continuare l'agitazione per altri due minuti. Lasciare decantare, imprimendo eventualmente un movimento rotatorio al liquido per favorire la separazione delle fasi. Spillare la fase organica in un imbuto filtrante contenente circa 3 g di sodio solfato anidro uniformemente distribuito sul setto e raccogliere l'estratto in un pallone da 500 ml.

Ripetere l'estrazione con 80 ml di freon e alla fine lavare l'imbuto filtrante con altri 20 ml di solvente riunendo gli estratti.

Misurare in un cilindro graduato il volume d'acqua sottoposto ad estrazione.

Concentrare, se necessario, la fase organica a piccolo volume (5 ml circa) in evaporatore rotante sotto leggero vuoto, alla temperatura di 35 - 40 °C.

Appendice B

Per ottenere una buona purificazione degli estratti senza avere perdite di idrocarburi, è necessario ricercare le migliori condizioni operative.

Il gel di silice, controllato ed eventualmente purificato, viene attivato in stufa a 120 °C per otto ore e poi raffreddato in essiccatore.

Tre porzioni da 10 g l'una di gel di silice attivato vengono poste in beute da 100 ml e addizionate del 1 - 3 - 5 per cento di acqua. Si agita vigorosamente per 20 minuti e si lascia a riposo per una notte.

Si riempiono tre colonne cromatografiche (diam. int. 10 mm) con il gel di silice così disattivato per un'altezza di 10 cm, si applicano poi 5 ml di una opportuna soluzione standard alla concentrazione di 2 µg/ml e si eluisce con 30 ml di freon ad una velocità di flusso fra 1 e 2 ml/min. L'eluato viene concentrato in evaporatore rotante e portato a 5 ml, infine si registrano gli spettri di fluorescenza assieme alla soluzione standard.

Con lo stesso procedimento si purificano gli estratti dei campioni d'acqua usando il gel di silice che ha fornito il recupero più elevato.

CARATTERIZZAZIONE DELLA SOSTANZA ORGANICA MEDIANTE SPETTROFOTOMETRIA INFRAROSSA. Nota I: Impiego di un programma di calcolo

A. Liberatori

Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR Roma

Riassunto

In questa nota è valutata la capacità della spettrofotometria infrarossa nella caratterizzazione della sostanza organica dal punto di vista qualitativo con l'ausilio di un semplice programma di calcolo. L'identificazione dei gruppi funzionali è stata effettuata su 23 composti aventi differenti e varie caratteristiche.

Summary

In this work the ability of infrared spectrophotometry for the qualitative characterization of organic substances with the aim of a simple computer program was evaluated. The identification of functional groups of 23 different and various compounds was done.

Il problema della determinazione delle sostanze organiche in campioni di acqua è divenuto in questi anni di grande attualità.

Per la determinazione quali-quantitativa di singole sostanze trovano attualmente una larga applicazione i metodi cromatografici accoppiati alla spettrometria di massa e con l'ausilio di apparecchiature per elaborazione automatica dei dati.

Questa metodologia è particolarmente adatta per il controllo dell'inquinamento da sostanze pericolose di cui si può ipotizzare la presenza e fornisce risultati tanto migliori quanto maggiori sono le informazioni immagazzinate nella banca dati.

Tuttavia nella maggior parte dei casi l'identificazione è limitata a circa il 10 ÷ 15 per cento di tutto il materiale organico.

Per ottenere informazioni sulla composizione di tutto il carico organico, insieme all'impiego di parametri onnicomplessivi come TOC e COD, vengono attualmente utilizzati procedimenti di separazione basati su caratteristiche chimiche, fisiche o chimico-fisiche delle sostanze organiche in esame.

La loro successiva determinazione quantitativa viene riferita a dette caratteristiche o a una classe chimica.

Tuttavia, poiché i campioni ottenuti dall'ambiente sono per lo più costituiti da miscele e poiché le molecole organiche sono spesso caratterizzate da una pluralità di gruppi funzionali, il riferimento ad una data classe potrebbe risultare non corretto.

Un procedimento vantaggioso per ottenere alcune ulteriori informazioni significative potrebbe essere quello di considerare il campione come una singola sostanza avente un certo numero di funzioni, specificando il peso relativo di ciascuna di esse.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di studiare la capacità della spettroscopia infrarossa di ottenere

questo tipo di caratterizzazione sulla base delle rispettive proprietà vibrazionali dei legami organici, utilizzando un programma di calcolo che renda automatica l'elaborazione dei dati.

1. Teoria

Lo spettro IR è diviso in intervalli di $0.1 \mu\text{m}$; se un picco cade in un intervallo la risposta viene considerata positiva, altrimenti viene considerata negativa. In questo modo lo spettro può essere tradotto in forma binaria.

I gruppi funzionali delle molecole organiche possono essere rappresentati da spettri derivati da composti standard sottraendo i picchi che sono caratteristici dello stesso gruppo funzionale.

Lo spettro incognito viene comparato a quello di ciascun gruppo funzionale e la similarità tra le due serie viene valutata, attraverso la misura della distanza di Tanimoto, con la seguente equazione:

$$S_{xj} = \frac{a_{xj}}{b_x + b_j - a_{xj}}$$

dove:

a_{xj} è il numero di picchi comuni agli spettri x e j

b_x è il numero di picchi dello spettro incognito

b_j è il numero di picchi dello spettro j.

Da questo procedimento derivano j valori di S_{xj} e il peso relativo di ciascun gruppo può essere ottenuto dall'equazione:

$$\bar{S}_{xj} = \frac{S_{xj}}{\sum S_{xj}} \cdot 100$$

2. Procedimento

Il programma, scritto in FORTRAN IV, è riportato in Tab. 1 ed è stato verificato su 23 sostanze campione, i cui spettri sono stati presi dal Sadtler Handbook of infrared spectra.

La banca dati è stata costruita utilizzando sempre i dati dello stesso Handbook in base alle risposte relative a 8 gruppi funzionali, sottraendo le risposte che appartengono ad altri gruppi per evitare sovrapposizioni (Tab. 2).

Nella traduzione di ogni spettro in forma binaria sono stati presi in considerazione solamente i picchi con una assorbanza superiore a 0.1; inoltre lo spettro di ogni sostanza campione è stato diviso in tre parti tali a coprire tre intervalli di assorbanza:

$$0.1 - 0.4 - 0.4 + 0.7 - 0.7 + 1.0$$

3. Risultati e discussione

Per una corretta valutazione dei risultati è opportuno ricordare che la identificazione dei gruppi funzionali è stata effettuata tenendo conto dell'intensità dei picchi, solo come rientranti in tre categorie: transizione forte, media e debole.

Per questo motivo e considerando che il sistema non tiene conto del fatto che a composti differenti corrispondono differenti valori di assorbività; l'espressione dei risultati in percentuali di presenza di gruppi funzionali non deve essere considerata come uno specchio della situazione reale, ma un sistema arbitrario da utilizzare per scopi prevalentemente qualitativi.

In Tab. 3 sono riportate le sostanze prese in esame e le rispettive percentuali arbitrarie di presenza calcolate con il programma descritto.

Dal punto di vista dell'identificazione delle funzioni la metodologia adottata consente di accertare la presenza di 63 gruppi funzionali su 66.

Nei casi in cui i gruppi funzionali non sono identificati (composti 12, 15 e 18) la risposta deve essere valutata da un differente punto di vista.

Questi composti vengono descritti *senza* la funzione carbonilica e *con* la funzione caratteristica dell'insaturazione tipo doppio legame carbonio-carbonico.

Questo fatto può essere spiegato e considerato corretto dal punto di vista dell'energia vibrazionale.

Infatti l'effetto coniugativo esercitato da gruppi vicinali insaturi dà luogo a una delocalizzazione degli elettroni con un conseguente indebolimento del legame, la cui energia di vibrazione si sposta a valori più alti di lunghezza d'onda.

La risposta, quindi, rispecchia la situazione reale della distribuzione degli elettroni di legame e la forza del legame stesso.

In altri casi (composti 4, 7, 20, 21) il sistema fornisce risposte in più rispetto ai gruppi funzionali effettivamente presenti nelle molecole. I composti 4 e 7 danno una risposta simile a quella delle olefine; entrambi i composti sono caratterizzati dalla presenza di un atomo di azoto in α rispetto all'anello aromatico e dalla presenza di un gruppo metilico che ha la proprietà di orientare in orto e in para gli elettroni dell'anello stesso. Di conseguenza, mentre il legame C-N assume alcune caratteristiche d'insaturazione, gli elettroni vengono parzialmente localizzati sull'anello aromatico, dando luogo a strutture di risonanza caratterizzate da doppi legami. Questo secondo motivo sembra essere la causa principale di questo tipo di risposta come risulta dalla diminuzione della risposta relativa all'anello aromatico rispetto agli omologhi per i quali esiste una completa delocalizzazione degli elettroni.

Anche i composti 21 e 20 danno una risposta di cui sembrano responsabili i legami $C = C$ e $C = N$ attribuibili alla prevalenza di strutture di risonanza.

L'effetto è particolarmente forte per il composto 20, in cui all'azione donatrice esercitata dal gruppo amminico si accompagna l'azione attrattiva del gruppo carbonilico, rendendo piuttosto stabilizzate le strutture di risonanza in cui sono presenti i gruppi $C = C$ e $C = N$.

Anche in tutti questi casi dunque, le risposte ottenute non solo possono essere spiegate dal punto di vista dell'energia vibrazionale, ma danno anche informazioni più conformi alla reale struttura elettronica delle molecole.

In conclusione la metodologia proposta può consentire attraverso un sistema automatizzato l'ottenimento di alcune informazioni qualitative sulle sostanze organiche, descritte come una serie di gruppi funzionali definiti dal punto di vista vibrazionale.

La semplicità del programma di calcolo e della strutturazione della banca dati rendono possibile l'estensione della metodologia ad altri gruppi funzionali, l'affinamento del sistema per risposte quantitative e suggeriscono la possibilità di applicazione all'analisi di campioni di acque superficiali.

FILE: ALI TESTO A - BY COMPUTRONE OF FRASCATI (ITALY)

```

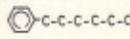
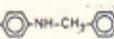
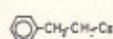
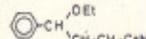
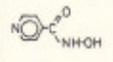
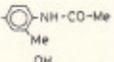
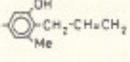
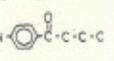
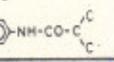
DIMENSION NC(20,135),NX(135),NRC(20),NAIJ(20),S(20),SP(20),KK(80)
100 FORMAT(///2(10X,I5),5X,F9.2,5X,F9.2)
200 FORMAT(///20X,"NUMERO DEI PICCHI DELLA SOSTANZA INCOGNITA",2X,I5///// )
300 FORMAT(/10X,"CALCOLI DI SIMILARITA' SU SPETTRI IR BINARI"//////)
400 FORMAT (I3)
500 FORMAT(80A1)
600 FORMAT(/////10X,"SOSTANZA INCOGNITA",10X,80A1//////)
700 FORMAT(5X,"PANDORA"//////)
800 FORMAT(75I1)
WRITE(6,700)
WRITE(6,300)
READ(5,500) (KK(J),J=1,80)
READ(5,400) N,M
READ(5,800) ((NC(I,J),J=1,N),I=1,M)
DO 150 KJK=1,13
READ(5,800) (NX(J),J=1,N)
WRITE(6,600) (KK(J),J=1,80)
NBX=0
DO 4 J=1,N
4 NBX=NBX+NX(J)
WRITE(6,200) NBX
ST=0.
DO 1 I=1,M
NAIJ(I)=0
NBC(I)=0
DO 2 J=1,N
IF(NC(I,J).NE.NX(J) GO TO 3
NAIJ(I)=NAIJ(I)+NC(I,J)
3 NBC(I)=NBC(I)+NC(I,J)
2 CONTINUE
S(I)=FLOAT(NAIJ(I)/FLOAT(NBC(I)+NBX-NAIJ(I)))
1 ST=ST+S(I)
DO 5 I=1,M
SP(I)=S(I)/ST*100.
Z WRITE(6,100) NBC(I),NAIJ(I),S(I),SP(I)
150 CONTINUE
STOP
END

```

Tab. 1 - Programma di calcolo

Tab. 2 - Banca dati.

Gruppo funzionale	Intervallo (cm ⁻¹)
Alifatico	1.400 - 1.420
	1.420 - 1.440
	3.000 - 3.100
	3.100 - 3.200
Insaturazione (tipo C = C)	1.580 - 1.600
Aromatico	1.440 - 1.460
	1.460 - 1.480
Idrogeno legato ad azoto od ossigeno	3.400 - 3.500
	3.500 - 3.600
	3.600 - 3.700
Nitrile	2.000 - 2.100
Nitrile coniugato	1.940 - 1.960
	1.960 - 1.980
	1.980 - 2.000
Carbonile	1.720 - 1.740
	1.740 - 1.760
Carbonile coniugato	1.700 - 1.720

		C-H	C=C		N-H O-H	C≡N	X-C≡N	C=O	X-C=O
1	C-C-C-C-C	100							
2		75		25					
3				100					
4	Me- 	61	24	4	11				
5	MeO- 	42		45	13				
6	Et-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Et	85			15				
7	Me- 	35	12	43	10				
8	CH ₃ -C≡N	35				65			
9		66		17		17			
10		63	14				23		
11		77		10		13			
12		6	60	27	7				
13	C-C-C-C-C C	83	17						
14	C-C-C-C C	83	17						
15	Me- 	8	46	8	38				
16	Me- 	25	27	5	44				
17	C-C-C-C-C O	64	17						19
18	H ₂ N- 	18	29	27	26				
19		15		54	11				20
20	H ₂ N- 	8	43	8	19				22
21		18	22	40	20				
22	C-C-C O	41						59	
23		30		38	14				18

T163

Tab. 3 - Percentuali di presenza di gruppi funzionali.

INDICE GENERALE DEL MANUALE SUI "METODI ANALITICI PER LE ACQUE" (*)

Codice	Metodo	Anno di pubbl. su volume	Anno di pubbl. su scheda
Sezione A - (Parte generale)			
A-001	Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio	—	—
A-002	Lineamenti di tecniche analitiche	1983	—
A-003	Metodi di campionamento	1977	—
A-004	Elaborazione dei risultati	1983	—
Sezione B - (Determinazione di parametri fisici e chimico fisici)			
B-001	pH	1972	1981
B-002	Temperatura	1972	1979
B-003	Colore	1972	1980
B-004	Materiali sedimentabili	—	1979
B-005	Materiali in sospensione	—	1979
B-006	Conducibilità	1972	—
B-007	Salinità	—	—
B-008	Odore	1972	—
B-009	Torbidità	1972	—
Sezione C - (Determinazione di metalli e di specie metalliche)			
C-001	Alluminio	1972	1981
C-002	Argento	1972	—
C-003	Arsenico	1972	1983
C-004	Bario	1972	1980
C-005	Berillio	1972	—
C-006	Boro	1972	1982
C-007	Cadmio	1972	1979
C-008	Calcio	1972	—
C-009	Cromo (VI)	1972	1982
C-010	Cromo (III)	1972	1982
C-011	Ferro	1972	1980
C-012	Litio	1972	—
C-013	Magnesio	1972	—
C-014	Manganese	1972	1980
C-015	Mercurio	1972	1979
C-016	Molibdeno	—	—
C-017	Nichel	1972	1980
C-018	Piombo	1972	1979
C-019	Potassio	1972	—
C-020	Rame	1972	1980
C-021	Selenio	1972	1979
C-022	Sodio	1972	—
C-023	Stagno	1972	1981
C-024	Zinco	1972	1980
C-025	Cromo totale	1972	1982

(segue)

(*) I metodi analitici sono in vendita presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche - Ufficio Pubblicazioni - Servizio Vendite, Piazzale Aldo Moro, 7 - 00185 Roma (Tel. 4993255). La spedizione viene effettuata con pagamento contro assegno.

Segue: Indice generale sui «Metodi Analitici per le Acque»

Codice	Metodo	Anno di pubbl. su volume	Anno di pubbl. su scheda
Sezione D - (Determinazione di sostanze e parametri inorganici non metallici)			
D-001	Acidità e basicità	1972	
D-002	Azoto ammoniacale	1972	1981-1983
D-003	Azoto nitroso	1972	1981
D-004	Azoto nitrico	1972	
D-005	Biossido di carbonio	1972	
D-006	Solfuri	1972	
D-007	Cianuri	1972	1980
D-008	Cloro	1972	
D-009	Cloruri	1972	1979
D-010	Fluoruri	1972	1983
D-011	Fosforo	1972	1981
D-012	Ossigeno disciolto	1972	
D-013	Silice	1972	
D-014	Solfati	1972	1979
D-015	Solfiti	1972	1983
Sezione E - (Determinazione di sostanze e parametri organici)			
E-001	Azoto albuminoideo	1972	
E-002	Azoto organico	1972	
E-003	Sostanze oleose totali	1972	
E-004	Oli minerali	—	
E-005	Grassi e oli animali e vegetali	—	
E-006	Carbonio organico	1972	
E-007	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	1972	1981
E-008	Richiesta biochimica di ossigeno (BOD)	1972	1982
• E-009	Pesticidi clorurati	1978	—
• E-010	Pesticidi fosforati	1982	—
• E-011	Policlorodifenili	1981	—
• E-012	Policloroterfenili	1981	—
E-013	Tensioattivi non ionici	1972	1979
E-014	Fenoli	1972	1979
E-015	Aldeidi	—	1978
E-016	Solventi aromatici	—	
E-017	Tensioattivi anionici	1972	1983
E-018	Solventi organici clorurati	—	1978
Sezione F - (Determinazione di parametri biologici e microbiologici)			
F-001	Saggio di tossicità	1972	
F-002	Coliformi totali	1972	
F-003	Coliformi fecali	1972	
F-004	Streptococchi fecali	1972	

INDICE GENERALE DEL MANUALE SUI «METODI DI ANALISI PER ACQUE DI MARE» (*)

Codice	Parametro	Anno di pubblicazione
—	Indicazioni generali:	
—	Fattori di conversione e di calcolo	
—	Campionamento	
100	Caratteristiche chimico-fisiche	
110	Trasparenza	
120	Temperatura	
130	Colore	
140	Salinità	1983
150	Materiale in sospensione	
160	pH	
170	Ossigeno disciolto	
200	Specie metalliche:	
210	Alluminio	
215	Argento	
220	Arsenico	
225	Cadmio	1983
230	Cromo	
235	Ferro	1983
240	Manganese	
245	Mercurio	
250	Nichel	1983
255	Piombo	1983
260	Rame	1983
265	Selenio	1983
270	Zinco	
300	Specie inorganiche non metalliche:	
300	Azoto ammoniacale	
315	Azoto nitroso	
320	Azoto nitrico	
325	Azoto totale	
330	Fosforo ortofosfato solubile	1982
340	Fosforo totale	1982
350	Silice disciolta	1983
400	Composti organici:	
410	Fenoli	
420	Oli minerali	
430	Tensioattivi anionici	
440	Composti organo-alogenati	
500	Saggi biologici e microbiologici	
510	Coliformi totali	1983
520	Coliformi fecali	1983
530	Streptococchi fecali	1983
540	Salmonelle	
550	Enterovirus	
600	Prove di tossicità:	
610	Saggio di ittiotossicità	

(*) I metodi sono pubblicati a scheda e sono in vendita, con il relativo raccoglitore, presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche - Ufficio Pubblicazioni - Servizio Vendite, Piazzale Aldo Moro, 7 - 00185 Roma (Tel. 4993.255). La spedizione viene effettuata con pagamento contro assegno.

