

EDITORIALE

Come è noto, l'Istituto di Ricerca sulle Acque ha il compito di predisporre metodi analitici per le acque aventi carattere di ufficialità secondo quanto disposto da alcune normative riguardanti la tutela delle acque (L. 10/5/1976, n. 319; D.C.M. 4/2/1977 e D.L. 130/92). Nell'assolvere a questo delicato compito l'Istituto deve, da un lato, rispondere alle esigenze dei potenziali utilizzatori (laboratori pubblici di controllo, e in generale, tutti coloro che operano nel settore della protezione e gestione delle acque), dall'altro alle esigenze della normativa in termini di inquinanti o parametri da esaminare e di livelli di sensibilità da conseguire.

È evidente che nello sviluppo di dette metodologie un fattore fondamentale di cui si deve tener conto è rappresentato dalle apparecchiature disponibili e dalle capacità operative del personale addetto. In questi ultimi anni si è assistito, seppure in modo non uniforme, ad una crescente diffusione di strumentazioni avanzate nei diversi laboratori di controllo sparsi sul territorio nazionale.

Il metodo per la determinazione di amminoacidi liberi in acque di mare proposto in questo numero del Notiziario, pur riferendosi a parametri non normati, rappresenta un primo tentativo di introdurre una tecnica, la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), che, seppure relativamente nuova, per alcune difficoltà intrinseche di standardizzazione non ha ancora trovato spazio nei manuali di metodologie standard.

I metodi di preconcentrazione che utilizzano substrati solidi, supportanti o meno specifici reagenti, nella determinazione di contaminanti inorganici e organici in tracce hanno incontrato negli ultimi anni un crescente interesse tra gli addetti ai lavori. La metodologia proposta basata sull'impiego delle resine Chelex consente la separazione e concentrazione di un'ampia gamma di metalli pesanti da acque superficiali prima dell'analisi in assorbimento atomico. Le proposte di metodo introdotte in questo numero hanno lo scopo di ribadire l'interesse dell'Istituto allo sviluppo e ottimizzazione non solo di metodologie e tecniche ben collaudate ma anche di quelle più innovative che la comunità scientifica man mano proporrà all'attenzione degli operatori.

Prof. Roberto Passino
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, marzo 1996

DETERMINAZIONE DI AMMINOACIDI LIBERI IN ACQUA DI MARE

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

RIASSUNTO

Viene presentata la messa a punto di un metodo in cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) e rivelazione in fluorescenza per la separazione, identificazione e determinazione di amminoacidi liberi (DFAA) nelle acque.

L'intera procedura è stata applicata inizialmente a soluzioni standard di amminoacidi e poi a campioni di acqua di mare.

SUMMARY

A routine method is evaluated for the determination of dissolved free amino acids in seawater. Derivatization of amino acids with O-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol reagent and subsequent separation by reversed-phase high performance liquid chromatography combined with fluorimetric detection are employed.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni numerose ricerche sono state avviate con l'obiettivo di evidenziare, attraverso l'identificazione di specifici componenti della materia organica nell'ambiente marino, le complesse reazioni biogeochimiche a cui tali componenti partecipano (Wenk et al., 1991; Jorgensen et al., 1993; Tupas et al., 1990). Tra le varie classi di composti organici particolare attenzione è stata rivolta allo studio della

INDICE

EDITORIALE	1
DETERMINAZIONE DI AMMINOACIDI LIBERI IN ACQUE DI MARE	1
METODO DI PRECONCENTRAZIONE MEDIANTE RESINA CHELEX-100 PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI IN TRACCIA IN ACQUE SUPERFICIALI	6
DETERMINAZIONE DEI TENSIOATTIVI NON IONICI NELLE ACQUE (BIAS).	14

dinamica della frazione di amminoacidi in fase disciolta (Burdige et al., 1988; Fuhrman, 1990).

Gli amminoacidi liberi disciolti (DFAA) sono infatti importanti prodotti intermedi nelle trasformazioni della materia organica nelle acque essendo da un lato rilasciati da organismi viventi (prodotti di escrezione) e non (lisi delle cellule) e dall'altro facilmente reincorporati nella biomassa vivente attraverso processi di assimilazione da parte di batteri e alghe.

Nell'ambiente marino la concentrazione media degli amminoacidi totali disciolti (liberi e combinati) è approssimativamente 50 $\mu\text{g/L}$, con valori che variano in un intervallo che va da 20 a 250 $\mu\text{g/L}$ (Miller et al., 1992).

La concentrazione dei DFAA è normalmente da 4 a 10 volte più bassa di quella delle forme combinate, ma essi vengono utilizzati molto più efficacemente dai microrganismi.

Gli amminoacidi naturali sono tutti α -amminoacidi con il gruppo amminico in posizione α rispetto al gruppo carbossilico e questa loro caratteristica fa sì che essi presentino una serie di proprietà chimiche in comune e prima fra tutte la possibilità di formare lunghe catene poliammidiche (proteine). In base alla loro struttura possono essere suddivisi in varie classi: 1) amminoacidi acidi aventi un secondo gruppo carbossilico (ad es. gli acidi aspartico e glutammico), 2) amminoacidi basici aventi un secondo gruppo basico amminico (lisina), o guanidinico (arginina) o imidazolico (istidina); 3) amminoacidi neutri (ad es. glicina e alanina), 4) amminoacidi idrossialfatici contenenti un gruppo ossidrilico (treonina e serina) e 5) amminoacidi aromatici contenenti sistemi ciclici, benzenici o eterociclici (prolina, fenilalanina, triptofano).

Viene qui presentata una procedura per l'analisi quali/quantitativa di queste cinque classi di amminoacidi liberi in acque di mare. La procedura indicata vuole essere un contributo pratico per la determinazione di questi composti organici nella comune routine di laboratorio.

1 - Principio del metodo

Per la determinazione dei DFAA contenuti nei campioni si è utilizzata la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore a fluorescenza. Gli amminoacidi presenti nel campione sono stati derivatizzati con il reattivo aldeide o-ftalica e 2-mercaptoetanolo in ambiente alcalino (>9,5) secondo la procedura di Mopper e Lindroth (1982). I derivati isoindolici sono stati quindi separati utilizzando una colonna in fase inversa C_{18} -DB e quindi rivelati con un detector a fluorescenza.

2 - Parte sperimentale

2.1 - Apparecchiatura

Tutta la vetreria utilizzata è stata pulita tenendola a bagno in HCl al 10% per almeno un'ora; è stata quindi sciacquata con acqua calda, lavata con sapone, sciacquata con acqua calda e poi risciacquata accuratamente con acqua Millipore. Infine è stata trattata in muffola (450°C) per almeno 4 ore.

L'analisi cromatografica è stata eseguita con uno strumento Perkin-Elmer Series IV equipaggiato con un iniettore Rheodyne Modello 7125 avente un "loop" di 100 μL e con un rivelatore in fluorescenza Perkin-Elmer LS4. La lunghezza d'onda di eccitazione era posta a 340 nm, a 440 nm quella di emissione. Il sistema di acquisizione dati era costituito da un integratore Perkin-Elmer LCI-100. La colonna cromatografica, 25 cm x 4,6 mm i.d., dotata di relativa precolonna conteneva particelle di C_{18} -DB di diametro medio di 5 μm (Supelco).

2.2 - Reattivi

- acqua ad alto grado di purezza (MILLIPORE MILLIQ)
- alcool metilico per HPLC
- tetraidrofurano per HPLC
- acido borico, grado analitico
- idrossido di sodio, grado analitico
- aldeide o-ftalica (per analisi in fluorescenza)
- 2-mercaptoetanolo, grado analitico
- amminoacidi, grado analitico

2.3 - Soluzioni standard

È stata preparata una soluzione concentrata (1 mM) in metanolo/acqua (80:20, v/v) di ogni singolo amminoacido. Le soluzioni concentrate venivano conservate a 4°C. Dalle soluzioni concentrate veniva preparata una soluzione a concentrazione 25 μM di ciascun amminoacido. Diluendo opportunamente detta soluzione con acqua Millipore, si ottenevano le soluzioni standard di lavoro. Queste ultime dovevano essere preparate immediatamente prima dell'uso.

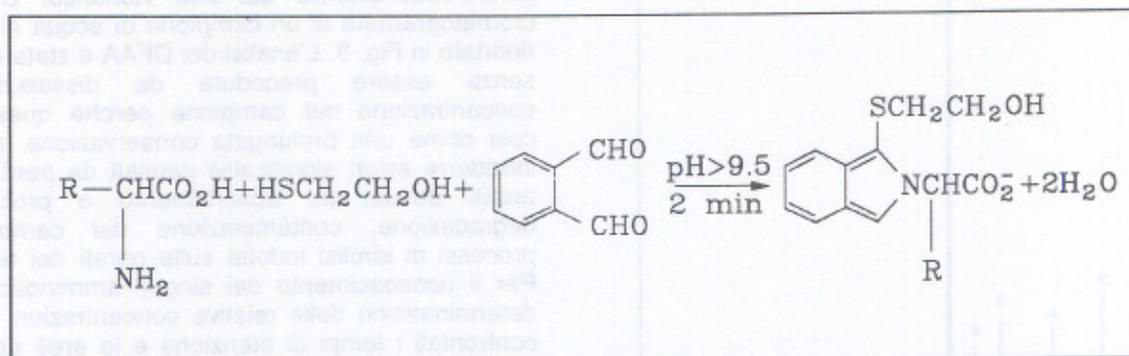
2.4 - Procedura di derivatizzazione

Il reattivo derivatizzante è stato preparato aggiungendo a 50 mg di aldeide o-ftalica 50 μL di 2-mercaptoetanolo e 1 mL di metanolo.

Questa soluzione, conservata a 4°C, può essere utilizzata solo dopo almeno 24 ore di invecchiamento per minimizzare la fluorescenza residua del reattivo e comunque non oltre i 6 - 7 giorni successivi al momento della preparazione. Il tampone borato è stato ottenuto preparando una soluzione di acido borico 0,8 M e aggiungendo idrossido di sodio 10 M fino a pH = 12,5. Per effettuare la derivatizzazione

degli amminoacidi, a 500 μL dello standard o del campione di acqua di mare venivano addizionati 5 μL di tampone borato e 5 μL del reattivo derivatizzante a temperatura ambiente. Dopo 2 minuti esatti si

iniettavano 100 μL di questa soluzione nel cromatografo liquido. La reazione di derivatizzazione segue lo schema di Fig. 1.



10279

Fig. 1 - Schema della reazione di derivatizzazione

3 - Discussione

Le metodologie proposte per l'analisi degli amminoacidi nelle acque basate sull'impiego della cromatografia liquida derivano in larga misura dal protocollo proposto da Lindroth e Mopper (1979). In particolare le fasi mobili impiegate per l'eluizione a gradiente sono costituite da tampone fosfato 0,1 M e metanolo in percentuali diverse a seconda delle specifiche esigenze separative (Henrichs e Williams, 1985). L'utilizzo del tampone fosfato a concentrazioni così elevate comporta una serie di problemi operativi (precipitazione con conseguente ostruzione dei tubicini), evitabili solo con l'impiego di laboriose procedure di lavaggio alla fine del ciclo di analisi giornaliero. Per questo motivo negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi lavori in cui sono state utilizzate soluzioni tampone più diluite di acetato (30-50 mM) e metanolo in miscela con tetraidrofurano o acetonitrile (Burdige e Martens, 1988; Tupas e Koike, 1990; Cowie e Hedges, 1992).

In questo lavoro sono stati utilizzati una miscela di tampone acetato a pH=6 (85%) e metanolo/tetraidrofurano (9:1, v/v) al 15% come fase mobile A mentre tampone acetato (30%) e metanolo/tetraidrofurano (70%) costituivano la fase mobile B. Il tampone veniva preparato a partire da una soluzione di acetato di sodio 0,02 M a cui venivano aggiunte poche gocce di acido acetico glaciale fino a pH = 6. Applicando il programma di eluizione riportato nel seguito (Tab. 1) è stato possibile separare ed identificare 17 amminoacidi, i più comuni tra quelli presenti nelle acque naturali. In Fig. 2 è riportato un cromatogramma esemplificativo ottenuto iniettando uno standard avente una concentrazione di 62,5 nM di ciascun amminoacido.

Tab. 1 - Programma di eluizione

Settore	Tempo (min)	Flusso (mL/min)	A (%)	B (%)	Curva
1	4	1.5	100	0	
2	8	1.5	75	25	1.0
3	8	1.5	50	50	1.0
4	3	1.5	50	50	
5	8	1.5	25	75	1.0
6	12	1.5	0	100	
7	6	1.5	100	0	0.0

La sperimentazione condotta ha dimostrato che, per ottenere una risoluzione ottimale di alcune coppie di amminoacidi (es. valina-triptofano) la cui separazione era particolarmente critica, è risultato necessario aumentare la percentuale di tetraidrofurano da 1,5 a 7% nel corso del cromatogramma. Anche la suddivisione del gradiente in settori intermedi invece di un unico gradiente lineare (100% A→100% B in 50 minuti) si è dimostrata utile ai fini della separazione di altre coppie di amminoacidi (es. serina-istidina; glicina-treonina). Altri autori (Cowie e Hedges, 1992) hanno proposto di aumentare la temperatura della colonna (mantenuta costantemente a 30°C nel corso del run) per impedire variazioni dei tempi di ritenzione dovute a fluttuazioni della temperatura ambiente e migliorare così la separazione.

Successivamente, in previsione di una estensione futura della metodologia agli amminoacidi totali idrolizzabili, si è ampliato il numero degli amminoacidi determinabili includendone anche altri presumibilmente presenti in forme combinate. Questi sono costituiti principalmente da amminoacidi legati a formare catene proteiche e peptidiche, ma includono

anche singoli amminoacidi presenti in complessi abbastanza forti da non essere derivatizzati con aldeide o-ftalica.

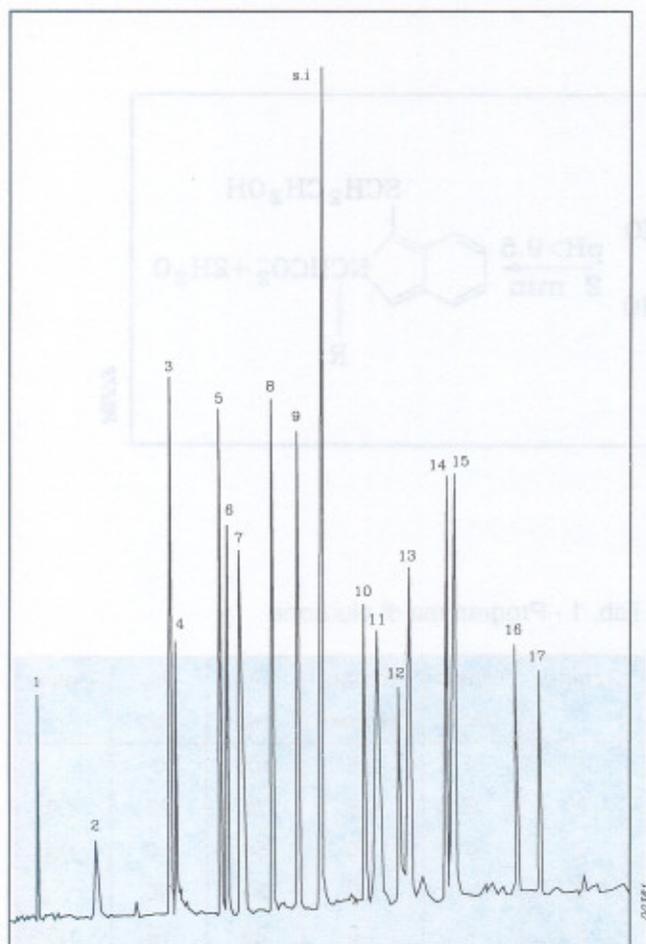


Fig.2 - Cromatogramma di uno standard contenente 17 amminoacidi naturali e l'acido α -aminobutirrico (s.i.) a concentrazione di 62,5 nM per ciascun amminoacido (1-Aspartico; 2-Glutammico; 3-Serina; 4-Istidina; 5-Glicina; 6-Treonina; 7-Arginina; 8-Alanina; 9-Tirosina; 10-Metionina; 11-Valina; 12-Triptofano; 13-Fenilalanina; 14-Isoleucina; 15-Leucina; 16-Ornitina; 17-Lisina)

Gli amminoacidi aggiuntivi presi in esame sono stati: asparagina, glutammina, metioninsulfone, acido γ -aminobutirrico e norvalina. Modificando il programma di eluzione mostrato in precedenza (Tab. 2) si è riusciti a separare efficacemente 22 amminoacidi riducendo la durata del cromatogramma da 50 a 35 minuti.

In questo caso la ricerca delle condizioni ottimali di eluzione si è rivelata più complessa per la presenza di diverse coppie di amminoacidi tendenti a coeluire (istidina/glutammina, treonina/metioninsulfone, tirosina/ γ -aminobutirrico, norvalina/triptofano). I problemi separativi sono stati superati modificando la curva del gradiente nella parte centrale e terminale del cromatogramma. Si è passati cioè da un

gradiente di tipo lineare ad uno dapprima concavo e poi convesso, in accordo con quanto indicato anche da altri autori (Cowie e Hedges, 1992).

Applicando le condizioni di eluzione cromatografica mostrate in precedenza è stata analizzata una serie di campioni prelevati in acque costiere del bacino centro-settentrionale del Mar Adriatico. Un tipico cromatogramma di un campione di acqua di mare è riportato in Fig. 3. L'analisi dei DFAA è stata eseguita senza essere preceduta da dissalazione o concentrazione del campione perché queste fasi, così come una prolungata conservazione, possono introdurre errori significativi causati da perdita degli analiti dovuta ad adsorbimento e processi di degradazione, contaminazione del campione o processi di idrolisi indotta sulle pareti dei recipienti. Per il riconoscimento dei singoli amminoacidi e la determinazione delle relative concentrazioni si sono confrontati i tempi di ritenzione e le aree dei picchi osservati nel campione con quelli della miscela standard preparata giornalmente. L'acido α -ammino butirrico è stato utilizzato come standard interno.

Per minimizzare i rischi di contaminazione presenti nelle fasi di preparazione dei reattivi e di manipolazione del campione, le analisi sia degli standard che dei campioni sono state condotte in triplicato, utilizzando per i calcoli i relativi valori medi. In Tab. 3 sono riportati gli intervalli di valori della deviazione standard percentuale per ciascun amminoacido ottenuti su campioni di acqua di mare. Come si può osservare, per la maggior parte degli amminoacidi esaminati tali deviazioni sono risultate intorno o inferiori al 10%; deviazioni più elevate, maggiori del 20% sono state occasionalmente riscontrate per l'ornitina e la lisina.

Tab. 2 - Programma di eluzione

Settore	Tempo (min)	Flusso (mL/min)	A (%)	B (%)	Curva
1	1	1.5	100	0	
2	2	1.5	85	15	1.0
3	8	1.5	75	25	5.0
4	8	1.5	50	50	1.0
5	10	1.5	25	75	0.3
6	5	1.5	0	100	0.0
7	10	1.5	100	0	0.0

4 - CONCLUSIONI

Il metodo presentato è caratterizzato da una sensibilità estremamente elevata (limite di rivelabilità 1-10 nmoli/L per singolo amminoacido) tale da non richiedere alcuna preconcentrazione e/o cleanup del campione.

Una scrupolosa conduzione delle operazioni di lavaggio della vetreria e di preparazione e di

Tab. 3 - Intervallo di valori delle deviazioni standard percentuali calcolate su campioni di acqua di mare a concentrazioni di aminoacidi totali compresi tra 100 e 800 nmoli/L

AMMINOACIDI	RSD (%)
Acido Aspartico	3,9-9,2
Acido Glutammico	2,5-6,2
Asparagina	2,2-8,5
Serina	5,1-11,6
Istidina	5,2-10,9
Glutammina	3,3-12,2
Glicina	3,9-9,6
Treonina	3,1-10,6
Metioninsulfone	3,2-11,1
Arginina	4,0-11,6
Alanina	5,0-10,4
Tirosina	2,5-11,2
Acido γ -amminobutirrico	2,8-10,1
Metionina	2,5-9,2
Valina	2,4-6,8
Triptofano	1,7-6,0
Norvalina	1,4-4,9
Fenilalanina	3,1-8,9
Isoleucina	2,4-11,4
Leucina	1,9-10,2
Ornitina	6,7-25,7
Lisina	4,5-21,7

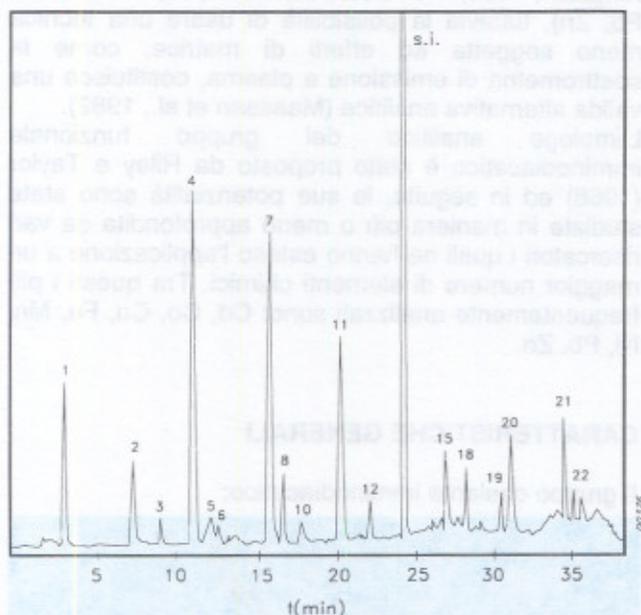


Fig. 3 - Cromatogramma di un campione di acqua di mare (Adriatico centro-settentrionale, maggio 1994); (1-Aspartico; 2-Glutammico; 3-Asparagina; 4-Serina; 5-Istidina; 6-Glutammina; 7- Glicina; 8- Treonina; 9- Metioninsulfone; 10- Arginina; 11-Alanina; 12- Tirosina; 13- γ -amminobutirrico; 14- Metionina; 15- Valina;; 16- Triptofano; 17-Norvalina; 18- Fenilalanina; 19- Isoleucina; 20- Leucina; 21- Ornitina; 22-Lisina).

manipolazione dei campioni è comunque fondamentale per minimizzare i livelli dei bianchi.

La precisione, ai livelli di concentrazione esaminati (100-800 nmoli/L) è risultata buona (deviazione standard percentuale intorno al 10%). Per la sua semplicità, selettività e sensibilità, il metodo si rivela particolarmente adatto alla determinazione degli aminoacidi in campioni ambientali.

BIBLIOGRAFIA

Burdige D. J. and Martens C. M. (1988): "Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin, 10. The role of amino acids in sedimentary carbon and nitrogen cycling", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **52**, 1571-1584

Cowie G. L. and Hedges J. H. (1992): "Improved amino acid quantification in environmental samples, charge-matched recovery standards and reduced analysis time", *Mar. Chem.*, **37**, 223-238

Fuhrman J. (1990): "Dissolved free amino acid cycling in an estuarine outflow plume", *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **66**, 197-203

Jorgensen N. O. G., Kroer N., Coffin R. B., Yang X. and Lee C. (1993): "Dissolved free amino acids, combined amino acids, and DNA as sources of carbon and nitrogen to marine bacteria", *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **98**, 135-148

Lindroth P. and Mopper K. (1979): "High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldehyde", *Anal. Chem.*, **51**(11), 1667-1674

Millero F. J. and Sohn M. L. (1992): "*Chemical Oceanography*", CRC Press. Boca Raton Ann Arbor London, chap. 8, 355-414

Mopper K. and Lindroth P. (1982): "Diel and depth variation in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis", *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 336-347

Tupas L. and Koike I. (1990): "Amino acid and ammonium utilization by heterotrophic marine bacteria grown in enriched seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **35**(5), 1145-1155

Wenk A., Mintrop L. and Duinker J. C. (1991): "Automated determination of amino acids in seawater", *Mar. Chem.*, **33**, 1-7

METODO DI PRECONCENTRAZIONE MEDIANTE RESINA CHELEX-100 PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI IN TRACCIA IN ACQUE SUPERFICIALI

M. Camusso*, W. Martinotti** e S. Crescenzo*

*C.N.R., Istituto di Ricerca Sulle Acque, Brugherio, Milano

**Enel S.p.A.-Centro Ricerca Ambiente e Materiali, Milano

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo di separazione e concentrazione di metalli (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) dalle acque superficiali mediante resina chelante (Chelex-100) prima della determinazione analitica in spettroscopia atomica. Il metodo separa quantitativamente i metalli di transizione dai metalli alcalini ed alcalino-terrosi. Nel lavoro vengono discussi i limiti ed i vantaggi di tale procedura e presentati i risultati di una applicazione all'analisi di metalli in traccia nelle acque del fiume Po.

SUMMARY

A method is described for separating and concentrating Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn from surface waters using Chelex-100 resin prior to analysis by atomic spectroscopy.

The method is shown to quantitatively separate the desired elements from alkali and alkaline earth metals. The limitations and advantages of the procedure are discussed. An application for the analysis of trace elements in riverine water from the Po is reported.

INTRODUZIONE

L'interesse nella determinazione dei metalli, presenti a livelli di traccia nelle acque naturali, deriva dal fatto che spesso essi giocano un ruolo di considerevole importanza nei vari processi ambientali. Attualmente la determinazione diretta di metalli in traccia risulta possibile solo per un ristretto numero di elementi, nonostante esistano metodi di analisi caratterizzati da bassi limiti di rivelazione. Di conseguenza, nella maggior parte dei casi, occorre operare uno stadio di preconcentrazione che consenta da una parte un miglioramento della sensibilità di rivelazione e dall'altra un incremento della selettività, eliminando gli effetti negativi di specifici interferenti e/o della composizione della matrice stessa. Tra i vari metodi di preconcentrazione disponibili, quelli che utilizzano dei substrati solidi, supportanti o meno specifici reagenti, risultano molto indicati per l'alta selettività e semplicità d'uso.

Negli ultimi anni la ricerca relativa alla preparazione di resine con caratteristiche chelanti, in grado di fissare gli elementi in traccia direttamente dalla soluzione, ha incontrato un crescente interesse. La successiva

eluizione delle specie metalliche trattenute dalla resina, consente di ottenere soluzioni analizzabili con tecniche spettroscopiche (GF-AAS, ICP-AES, ecc.).

I gruppi funzionali chelanti maggiormente studiati sono quelli della dimetilglossima (Sturgeon et al., 1981), dei ditiocarbammati (Miyazaki and Barnes, 1981), della 8-idrossochinolina (Sturgeon et al., 1981) e dell'imminodiacetato (Riley and Taylor, 1968; Florence and Batley, 1975; Batley and Florence, 1976; Pakanls et al., 1978; Kingston et al., 1978; Berman et al., 1980; Sturgeon et al., 1980; Danielsson et al., 1982; Bruland et al., 1985; Pay et al., 1990; Dupont et al., 1991).

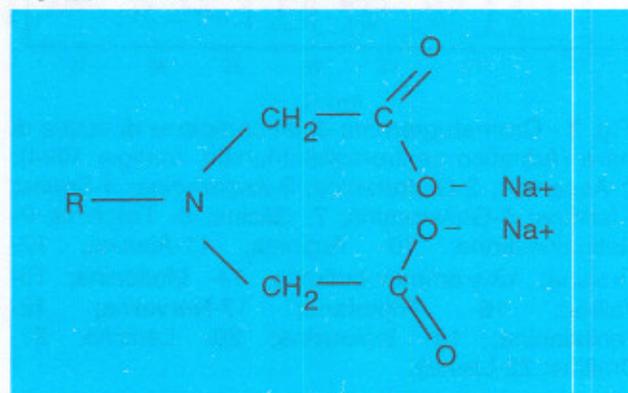
La caratteristica principale di questi gruppi funzionali è data dalla loro capacità di legare selettivamente i metalli di transizione a scapito di altre classi (ad es. metalli alcalini e/o alcalino-terrosi), rendendo possibile la preconcentrazione contemporanea di più metalli da un unico campione.

La possibilità di separare la matrice prima dell'analisi strumentale è di notevole importanza, soprattutto quando la determinazione deve essere effettuata mediante assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica o mediante attivazione neutronica. Nel primo caso la presenza di quantità significative di Ca e Mg interferirebbe diminuendo l'efficienza di atomizzazione per molti elementi (Kingston et al., 1978), mentre, nel secondo caso, la presenza di Na, Cl e Br produrrebbe un livello di radiazione di fondo così elevato da nascondere il segnale della maggior parte degli elementi di interesse, aventi tempi di dimezzamento confrontabili (Greenberg and Kingston, 1983). Per alcuni elementi (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn), tuttavia la possibilità di usare una tecnica meno soggetta ad effetti di matrice, come la spettrometria di emissione a plasma, costituisce una valida alternativa analitica (Maessen et al., 1982).

L'impiego analitico del gruppo funzionale imminodiacetico è stato proposto da Riley e Taylor (1968) ed in seguito, le sue potenzialità sono state studiate in maniera più o meno approfondita da vari ricercatori i quali ne hanno esteso l'applicazione a un maggior numero di elementi chimici. Tra questi i più frequentemente analizzati sono: Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn.

CARATTERISTICHE GENERALI

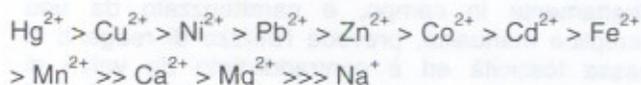
Il gruppo chelante imminodiacetico:



è solitamente fissato su un supporto organico di tipo polimerico costituito da stirene e divinilbenzene, e prende il nome commerciale di Chelex-100 (Bio-Rad Lab.), di Dowex A1 (Dow Chemical Co.) e di Amberlite IRC-718 (Rohm & Haas Co.).

Solitamente la resina chelante è fornita in forma Na^+ , tuttavia mediante opportuno trattamento è possibile convertirla in altre forme chimiche (ad es. Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+).

La principale caratteristica di questa resina è l'elevata selettività verso i metalli pesanti rispetto a quelli alcalini ed alcalino-terrosi. La selettività della resina Chelex-100 verso i vari elementi, intesa come la sua affinità per un catione rispetto al catione di riferimento (Zn^{2+}), è la seguente:



ma l'ordine degli elementi nella serie può variare in funzione del pH, della forza ionica e della presenza di specie complessanti.

Un'ulteriore peculiarità di tale resina chelante è la possibilità di eseguire la speciazione in soluzione di un elemento, allo scopo di operare una suddivisione operativa tra le varie forme chimiche (acqua ione, complessi inorganici ed organici, forme colloidali).

La ritenzione su Chelex-100 è stata ad esempio inserita da Florence (1982) in uno schema di speciazione mediante il quale, con l'ausilio di tecniche strumentali quali la voltammetria di stripping anodico e di metodiche di separazione (ultrafiltrazione e dialisi) e di ossidazione con radiazioni U.V., è stato possibile ottenere una distribuzione tra le diverse forme chimico-fisiche di alcuni elementi (Cu, Cd, Pb, Zn) presenti in acqua. Particolarmente interessante, dal punto di vista della speciazione, è l'approccio proposto da Figura e Mc Duffie (1980). Lo schema procedurale da essi proposto prevede l'impiego della resina Chelex-100 su diverse aliquote dello stesso campione di acqua, variando per ogni prova il tempo di contatto tra resina e fase acquosa. Impiegando sia la tecnica di percolazione in colonna che di equilibratura in discontinuo (batch) è stato possibile ottenere una serie di soluzioni il cui contenuto in metallo è funzione della lability della specie presente. Le forme termodinamicamente meno stabili del complesso Chelex-100/metallo e caratterizzate da cinetiche di dissociazione veloci (entro pochi secondi), risultano fissate su colonna, mentre le altre sono trattenute soltanto con il trattamento in discontinuo (batch) più o meno prolungato nel tempo. Infine, la frazione inerte (ad es. colloidale-metallo) non risulta in ogni caso scambiabile dalla Chelex-100 anche per tempi di contatto molto lunghi per cui è richiesto un trattamento chimico preliminare al fine di rendere disponibile il metallo alla resina chelante.

La capacità chelante di questa resina varia in funzione dei seguenti parametri:

a) pH

La quantità di elemento assorbito per quantità unitaria di resina varia notevolmente con il pH (Florence and Batley, 1975): la chelazione è trascurabile per valori di pH inferiori a 2 e cresce rapidamente tra pH 2 e 4. Tra pH 4 e 6 gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} non mostrano un incremento nel coefficiente di distribuzione contrariamente a quanto avviene per i metalli di transizione. Al di sopra di pH 6 l'affinità aumenta ancora per effetto dell'ulteriore dissociazione del gruppo imminodiacetico. Per alcuni elementi (Cu e Co) tuttavia, oltre pH 6 è stata verificata una diminuzione del coefficiente di distribuzione. La resina Chelex-100 può essere perciò impiegata per trattenere i metalli presenti in acqua di mare o in acque dolci a livello di traccia in un ristretto e ben definito intervallo di pH. In generale il limite inferiore di pH è 5, sotto questo valore la chelazione non risulta particolarmente efficace per effetto della scarsa dissociazione del gruppo imminodiacetico. Il limite superiore del pH è determinato, per l'acqua di mare, dall'inizio della precipitazione dell'idrossido di magnesio (circa a pH 9).

b) Forza ionica

Meno determinante del pH sembra essere l'effetto della forza ionica sulla chelazione dei metalli di transizione (Ni, Sides e Kenner, 1966; Co e Zn, Sturgeon et al., 1980), sebbene per alcuni (Mn e Fe, Sturgeon et al., 1980) si ha una marcata diminuzione all'aumentare della salinità.

Tuttavia, l'uso di adatte soluzioni tampone, ad esempio acetato o maleato d'ammonio (Pay et al., 1990), consente di limitare tali effetti negativi sulla ritenzione dei metalli di transizione.

c) Complessanti

La presenza in soluzione di sostanze complessanti può avere un effetto negativo sulle rese di trattenimento della resina.

L'influenza di un ampio spettro di tali sostanze complessanti (detergenti anionici, cationici e non ionici, sodiotripolifosfato ed acido nitrilotriacetico) è stata valutata da Pakalns et al. (1978). Una consistente diminuzione nella resa di trattenimento è stata osservata solo in presenza di acido nitrilotriacetico: sono sufficienti 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di tale complessante per ridurre la resa al 4% per il Ni, al 37% per lo Zn, al 48% per il Pb, al 55% per il Co, al 70% per il Cd; per il Mn e per il Cu le rese risultano soltanto leggermente inferiori (91% e 95%).

La frazione di metallo complessata risulta talmente stabile che, solo dopo un adeguato trattamento chimico del campione (Paulson, 1986), è possibile rendere disponibile il metallo per la ritenzione. Ciò comporta ovviamente una maggiore complessità della procedura di preconcentrazione, che risulta però indispensabile se è richiesta la determinazione del contenuto totale disciolto di un elemento.

d) Colloidi

I composti in forma colloidale, in grado di fissare gli elementi in traccia, aventi dimensioni maggiori di 1,5 nm, risultano esclusi dalla resina nella fase di ritenzione (Batley, 1989). Ciò comporta una sensibile riduzione delle rese di trattenimento (Kingston et al., 1978).

Come nel caso della presenza di complessanti il trattamento chimico del campione risulta necessario se è richiesta la determinazione del contenuto totale disciolto di un elemento.

PROCEDURE DI CONVERSIONE, RITENZIONE ED ELUIZIONE DELLA RESINA CHELANTE.

La preconcentrazione prevede: una eventuale fase di conversione della resina nella forma chimica più idonea, il passaggio sulla resina della soluzione contenente i metalli, un lavaggio per eliminare gli ioni alcalini ed alcalino-terrosi trattenuti ed infine l'eluizione dei metalli mediante opportuno eluente acido.

Come è già stato anticipato, la Chelex-100 può essere utilizzata in diverse forme chimiche mediante opportuni trattamenti di conversione. La scelta della più idonea forma chimica è operata sulla base di considerazioni che tengono conto di eventuali variazioni del pH durante il passaggio della soluzione, di effetti di variazioni del volume della resina e della purezza dei reagenti utilizzati.

La fase di ritenzione degli elementi può essere condotta sia utilizzando il passaggio diretto su colonna che in discontinuo (batch), ponendo in contatto la soluzione con la resina. Dopo tale fase, l'eliminazione pressochè quantitativa degli ioni alcalini ed alcalino-terrosi, trattenuti eventualmente dalla resina chelante, viene ottenuta per lavaggio con una soluzione tampone di acetato di ammonio a pH compreso tra 5,0 e 5,5.

Prove sperimentali (Kingston et al., 1978), eseguite controllando la concentrazione dei metalli nelle frazioni eluite, consentono di verificare che non si hanno perdite significative degli elementi di interesse durante le fasi di lavaggio precedenti alla eluizione con HNO₃ 2N. L'analisi del contenuto in elementi alcalini ed alcalino-terrosi nella frazione di eluito di HNO₃ 2N evidenzia peraltro l'effettiva assenza di questi elementi.

Per quanto riguarda la fase di eluizione, in genere, si sfrutta l'azione di acidi (es. HNO₃), che favoriscano il distacco dalla resina del metallo trattenuto. Volumi di acido pari a 10 mL vengono utilizzati per eluire quantitativamente i metalli da 6 mL di resina chelante.

Le dimensioni delle particelle della resina Chelex-100 variano in funzione del tipo di reagente con cui vengono a contatto. Durante la fase di eluizione per esempio l'utilizzo di acidi provoca una notevole contrazione di volume della resina, mentre nella successiva fase di condizionamento si verifica un marcato rigonfiamento. Tale effetto risulta critico per

la resina in forma NH₄⁺ soprattutto utilizzata in colonna.

Una conclusione di carattere generale che si può ricavare dai dati di letteratura, è che non esiste una procedura ottimale di preconcentrazione applicata universalmente, ma piuttosto, ogni gruppo di ricercatori utilizza una propria variante, a seconda della matrice da analizzare e degli elementi da determinare.

Riassumendo, il metodo di preconcentrazione con Chelex-100 presenta i seguenti vantaggi: consente di determinare contemporaneamente più elementi in un elevato numero di campioni, offre la possibilità di operare il trattamento di preconcentrazione direttamente in campo, è caratterizzato da una semplice manualità, prevede l'utilizzo di reagenti di bassa tossicità ed è contraddistinto da valori di "bianco" analitico relativamente contenuti (Boniforti et al., 1984; Bruland et al., 1985).

Nel seguito viene presentata la procedura del metodo in discontinuo (batch) utilizzato per la preconcentrazione di elementi in traccia in acque fluviali e marine ed un esempio di applicazione a campioni d'acqua del fiume Po.

1 - Principio del metodo

Il metodo si basa sulla chelazione di ioni metallici presenti nella fase disciolta di campioni acquosi, mediante resina Chelex-100 in forma NH₄⁺. Successivamente, i metalli trattenuti dalla resina sono eluiti per mezzo di una soluzione acida (HNO₃) di opportuna concentrazione.

2 - Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali superficiali (dolci e marine) e consente la rivelazione di bassi livelli di concentrazione di Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, ottenendo fattori di concentrazione pari a 100. Le determinazioni analitiche dei metalli considerati sono effettuate mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite (GF-AAS) o spettrofotometria di emissione a plasma (ICP-AES).

3 - Interferenze e cause d'errore

Non sono stati riscontrati significativi fenomeni di interferenza da parte delle principali specie chimiche presenti nell'acqua. La presenza di sostanze complessanti o colloidali può ridurre la resa di ritenzione sulla resina (punti c e d del paragrafo Caratteristiche generali).

4 - Apparecchiature

- Bottiglie di polietilene da 1 L.

- Imbuti separatori di polipropilene, con tappo e rubinetto da 1 L.
- Colonne di polipropilene da 10 mL graduate (0,8x4 cm), dotate di tappo e setto poroso (35 μ m) di polietilene.
- Pompa ad acqua.
- Matracci di polietilene da 10 mL.
- Colonna cromatografica (2,5x20 cm) di vetro e setto poroso (35 μ m) di polietilene.

Trattamento del materiale

Tutto il materiale in plastica utilizzato per le operazioni analitiche (bottiglie, imbuti separatori, colonne, matracci) deve essere condizionato prima dell'uso.

Il trattamento del materiale in plastica nuovo avviene mediante un lavaggio preliminare con detersivo liquido, abbondante risciacquo con acqua deionizzata e immersione per una giornata in una soluzione chelante (5.11) e successivo risciacquo con acqua deionizzata. Le bottiglie vanno lavate con acido nitrico diluito (1:10), conservate riempite di acido nitrico diluito (1:10) e, prima dell'uso, risciacquate con acqua deionizzata e poste ad asciugare.

Per le bottiglie e il materiale di plastica già utilizzati è sufficiente un lavaggio con acido nitrico diluito (1:10) e un risciacquo con acqua deionizzata.

5 - Reattivi

I reattivi utilizzati devono essere di grado ultrapuro; l'acqua utilizzata per il risciacquo finale della vetreria e la preparazione delle soluzioni deve essere di elevata purezza (18 μ S/cm).

5.1 - Resina Chelex -100 (200/400 mesh) in forma Na^+ .

5.2 - Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro (69%, $d=1,42$).

5.3 - Soluzione diluita di acido nitrico (HNO_3 2,5 N)
Diluire a 500 mL con acqua, 80 mL di acido nitrico concentrato.

5.4 - Acido cloridrico concentrato (37%, $d=1,18$)

5.5 - Soluzione di acido cloridrico diluito (HCl 6N)
Diluire a 1 L con acqua, 500 mL di acido cloridrico concentrato.

5.6 - Soluzione di ammoniaca concentrata (32%, $d=0,88$).

5.7 - Soluzione di ammoniaca diluita (NH_3 1,7 M)
Diluire a 1 L con acqua, 100 mL di ammoniaca concentrata.

5.8 - Soluzione di ammoniaca diluita (NH_3 2,5 M)
Diluire a 500 mL con acqua, 80 mL di ammoniaca concentrata.

5.9 - Acido acetico concentrato (100%, $d=1,05$)

5.10 - Soluzione tampone di acetato di ammonio 1 M purificata ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{pH}=6,0$).

In una bottiglia di polietilene da 1 L condizionata in precedenza (§ *Trattamento del materiale*), porre 400 mL di acqua, 60 mL di acido acetico concentrato. Aggiungere ammoniaca concentrata sino ad ottenere un pH pari a 6,0 unità. Portare a volume (1L) con acqua, raffreddando la soluzione mediante immersione in un bagno ad acqua e ghiaccio ed agitare per alcuni minuti. Aggiungere infine 6 mL di resina Chelex-100.

Filtrare la soluzione prima dell'uso, su un filtro a membrana in policarbonato (0,4 μ m) precedentemente lavato, in sequenza, con: 50 mL di HCl 6N, 50 mL di acqua, 10 mL di NH_3 1,7 M e 50 mL di acqua.

5.11 - Soluzione chelante.

In una bottiglia di polietilene da 10 L introdurre EDTA sale bisodico biidrato (50 g), ammonio cloruro (16 g), NH_3 concentrata (100 mL), nero eriocromo T (una spatolata) e acqua deionizzata (q.b. a 10L). La soluzione chelante può essere utilizzata per più lavaggi e ripreparata quando la colorazione passa dal celeste al rosa.

6 - Conversione della resina

Pesare 52 g ($d=0,65$, circa 80 mL) di Chelex-100 in forma Na^+ e porli con una spatola di plastica nell'apposita colonna cromatografica. Fare passare 250 mL di HNO_3 2,5 N senza lasciare andare a secco la resina (si noterà una diminuzione di volume dovuta alla sostituzione dei gruppi Na^+ con gruppi H^+). Lavare con 100 mL di acqua e successivamente aggiungere poco per volta 250 mL di NH_3 2,5 M (si noterà un aumento di volume, dovuto alla sostituzione dei gruppi H^+ con i gruppi NH_4^+). Dopo aver lasciato sedimentare la resina, lavare con 200 mL di acqua, lasciando nella colonna gli ultimi 20 mL. Chiudere con il tappo la colonna e agitare ogni volta per risospingere la resina prima del suo prelievo. La resina così preparata può essere conservata nella stessa colonna per diversi mesi.

7 - Procedimento

7.1 - Campionamento e conservazione del campione

Prelevare circa 1 L di campione d'acqua, precedentemente filtrato attraverso un filtro a membrana di policarbonato (0,4 μ m), e introdurlo in una bottiglia di polietilene da 1 L, preconditionata (§ *Trattamento del materiale*) e prepesata, contenente 6 mL di resina Chelex -100 (forma NH_4^+) e 10 mL di soluzione tampone di acetato di ammonio 1M. Dopo il prelievo, la bottiglia viene ripesata, registrando il relativo peso su una tabella per il calcolo della concentrazione finale. Conservare a 4°C in attesa

dell'estrazione dei metalli trattenuti (non oltre una settimana dal prelievo).

7.2 -Preconcentrazione dei metalli disciolti

Porre in agitazione su slitta per 24 ore le bottiglie contenenti i campioni, ad una velocità tale da permettere il completo mescolamento. Al termine delle 24 ore procedere all'eluizione dei metalli trattenuti dalla resina chelante. A tale scopo predisporre gli imbuto separatori e le colonne, collegandoli alla pompa ad acqua secondo lo schema riportato in Fig.1. Trasferire il contenuto delle bottiglie negli imbuto separatori, utilizzando la pompa ad acqua per la completa eliminazione della fase liquida ed il recupero della resina nella colonna.

Il flusso di percolazione va regolato mediante opportuna apertura dei rubinetti ed evitando accuratamente che la resina vada a secco.

Lavare quindi la resina in sequenza con 10 mL di acqua e 25 mL di tampone acetato. Completato il lavaggio, staccare il sistema di aspirazione (pompa e relativi rubinetti) ed eluire con 10 mL di acido nitrico 2,5 N, raccogliendo quantitativamente per gravità l'eluato in matracci prepesati, posti sotto le colonne (Fig.1). Ripesare i matracci alla fine dell'eluizione.

7.3 -Preparazione dei "bianchi" analitici

Per ogni lotto di campioni (n= 4-8), preparare almeno tre "bianchi" analitici versando 6 mL di resina Chelex-100 e 10 mL di tampone acetato in una bottiglia di polietilene da 1L e sottoponendoli alla procedura prevista per i campioni.

8 - Determinazione analitica

Procedere alla determinazione analitica dei metalli negli eluati (campioni e relativi "bianchi") mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornello di grafite e/o spettrofotometria di emissione atomica in plasma.

8.1 - Calcoli

La concentrazione (C) del metallo presente in fase disciolta nel campione di partenza, espressa in µg/L, si ottiene applicando la seguente formula :

$$C (\mu\text{g/L}) = \frac{p_f \cdot C_c \cdot n - (\sum p_{bi} \cdot C_{bi})}{p_i \cdot n \cdot 1,074}$$

dove

C_c = concentrazione misurata nell'eluato (µg/L);

C_{bi} = concentrazione misurata nei "bianchi" analitici (µg/L);

p_f = peso netto finale dell'eluato (g);

p_i = peso netto del campione prelevato (g);

p_{bi} = peso netto dei "bianchi" analitici ($b_i=b_1, b_2, \dots$) (g);

n = numero dei "bianchi" analitici;

1,074 = densità della soluzione nitrica eluente (g/mL).

9 - Precisione ed accuratezza

Nella tabella 1 sono riportati i valori percentuali medi di resa di ritenzione (3 replicati) e i valori percentuali di resa di eluizione con HNO_3 2,5 N, ottenuti con il metodo in discontinuo e mediante radiotraccianti per alcuni elementi presenti a concentrazione nota, nella fase disciolta, in campioni di acqua di mare.

Tab.1 - Rese di ritenzione e di eluizione per alcuni elementi presenti in fase disciolta in campioni di acqua di mare.

Metallo	Resa di ritenzione (%)	Resa di eluizione (%)
Co	99,7 ± 0,5	92,8
Cd	98,4 ± 0,1	96,1
Fe	97,5 ± 0,3	89,7
Mn	89,8 ± 0,8	92,1
Ni	99,8 ± 0,1	94,9
Pb	99,5 ± 0,2	91,9
Zn	99,8 ± 0,2	91,2

A titolo di esempio si riportano i risultati sperimentali ottenuti da Boniforti et al. (1984), relativi alla determinazione di alcuni metalli pesanti in un campione di riferimento certificato (NASS-1, NRC Canada) (Tab.2) e all'efficienza di recupero di alcuni metalli aggiunti in quantità nota a campioni di acqua ultrapura (Milli-Q) e di acqua di mare con preconcentrazione in discontinuo mediante Chelex-100 (Tab. 3). I recuperi percentuali più elevati sono stati ottenuti con la prima matrice e i valori risultano superiori all'86%.

Tab.2- Valori sperimentali e certificati con materiale di riferimento NASS-1 (N.R.C. Canada).

Metallo	Me trovato (µg/L)	Me certificato (µg/L)
Co	0,0036 ± 0,0007	0,004 ± 0,001
Cu	0,122 ± 0,018	0,099 ± 0,010
Fe	0,19 ± 0,06	0,192 ± 0,036
Mn	0,025 ± 0,013	0,022 ± 0,007
Ni	0,233 ± 0,014	0,257 ± 0,027
Zn	0,170 ± 0,068	0,159 ± 0,027

Per la determinazione delle concentrazioni di metalli disciolti è stata utilizzata la procedura di preconcentrazione mediante Chelex-100 come riportata sopra nel testo. In tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti.

La tecnica di preconcentrazione con Chelex-100 ha consentito la rivelazione di bassi livelli di concentrazione, in certi casi inferiori al µg/L (es. Cd, Co, Pb). I valori di "bianco" analitici, comprensivi delle operazioni in campo, sono risultati sempre trascurabili, eccetto per Zn, Fe e Pb (Tab.5). Tale risultanza ha consentito l'ottenimento di limiti di rivelazione più che soddisfacenti che hanno consentito di rilevare le ampie fluttuazioni, in qualche caso di alcuni ordini di grandezza, dei livelli dei metalli considerati su un periodo temporale così esteso.

INDAGINI SPERIMENTALI SUL FIUME PO (PONTELAGOSCURO).

Nell'ambito di un ampio studio condotto da I.R.S.A.-C.N.R. in collaborazione con altri enti di ricerca, volto a valutare la qualità delle acque e il carico di sostanze tossiche convogliato dal fiume Po nel mare Adriatico, sono stati effettuati 35 campionamenti nel periodo compreso tra settembre 1988 e giugno 1990 alla stazione di Pontelagoscuro (FE), sezione di chiusura del bacino (Pettine et al., 1994).

CONCLUSIONI

Il metodo di preconcentrazione descritto, consente la determinazione contemporanea di più elementi in un numero elevato di campioni; è una procedura operativamente semplice e applicabile a tutte le acque superficiali. Consente l'esecuzione in campo delle operazioni di pretrattamento dei campioni, mantenendo trascurabili i livelli di contaminazione, e può anche essere applicato alla determinazione in continuo ed automatica di metalli in traccia, mediante spettroscopia atomica.

Tab.3 - Recupero (%) degli ioni di metalli (10 µg/L) aggiunti ad acqua di grado ultrapuro (Milli-Q) e ad acqua di mare mediante preconcentrazione con Chelex-100 (Boniforti et al., 1984).

Matrice	Co (II)	Cu (II)	Fe (III)	Mn (II)	Ni (II)	Zn (II)
Milli-Q	98 ± 3	100 ± 3	95 ± 5	95 ± 5	100 ± 4	100 ± 10
Acqua di mare	92 ± 2,5	88 ± 3	90 ± 15	86 ± 2,5	95 ± 6	100 ± 5

Tab.4 - Valori medi, minimi, massimi, mediani relativi alle concentrazioni di metalli disciolti (µg/L) in campioni raccolti a Pontelagoscuro (FE) nel periodo 1988 - 1990

Metallo	media ± d.s.	minimo	massimo	mediana
Cd	0,11 ± 0,12	0,01	0,59	0,07
Co	0,04 ± 0,025	0,004	0,147	0,033
Cu	2,07 ± 0,53	0,95	3,07	2,00
Fe	2,0 ± 2,5	0,1	11,6	1,0
Mn	4,2 ± 4,0	0,5	17,6	2,8
Ni	2,07 ± 1,12	0,44	4,32	1,81
Pb	0,28 ± 0,20	0,09	0,65	0,23
Zn	6,65 ± 9,07	0,45	46,5	4,10

Tab.5 - Valori dei "bianchi" analitici e dei limiti di rilevazione analitici.

Metalli	Bianco analitico	Limite di rilevazione analitico ^(a)
	µg/L	µg/L
Cd	<0,005	0,005
Co	<0,01	0,01
Cu	<0,02	0,02
Fe	0,21 ± 0,07	0,42
Mn	<0,01	0,01
Ni	<0,02	0,02
Pb	0,04 ± 0,03	0,14
Zn	2,89 ± 3,12	12,3

(a) = $x_b + 3 \text{ d.s.}_b$

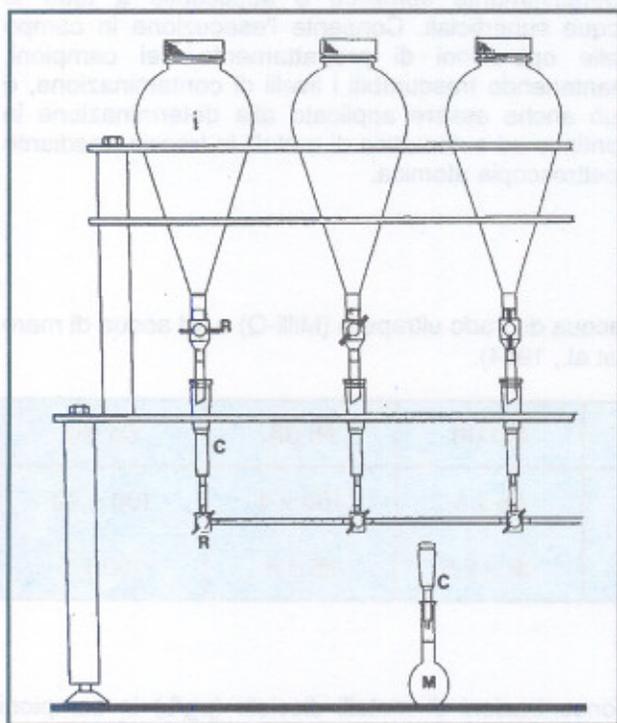


Fig. 1 - Rappresentazione dell'apparato sperimentale utilizzato per la preconcentrazione e l'eluizione dei metalli da campioni acquosi (I = imbuto separatore, C = colonna; M = matraccio; R = rubinetto).

BIBLIOGRAFIA

BATLEY G.E. (1989): "Physicochemical separation methods for trace element speciation in aquatic samples". In "Trace element speciation: analytical methods and problems", Ed. G.E. Batley, CRC Press, Inc, Florida.

BATLEY G.E. and FLORENCE T.M. (1976): "Determination of chemical forms of dissolved cadmium, lead and copper in seawater", *Mar. Chem.*, **4**, 347.

BERMAN S.S., McLAREN J.W. and WILLIE S.N. (1980): "Simultaneous determination of five trace metals in seawater by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization", *Anal. Chem.*, **52**, 488-492.

BONIFORTI R, FERRAROLI P., FRIGIERI P., HELTAI D. and QUEIRAZZA G. (1984): "Intercomparison of five methods for the determination of trace metals in sea water", *Anal. Chim. Acta*, **162**, 33-46.

BRULAND K.W., COALE K.H. and MART L. (1985): "Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: an intercomparison of voltammetric and atomic absorption methods", *Mar. Chem.*, **17**, 285-300.

BUCKLEY J.A. (1985): "Preparation of Chelex-100 resin for batch treatment of sewage and river water at ambient pH and alkalinity", *Anal. Chem.*, **57**, 1488-1490.

DANIELSON L.G., MAGNUSSON B. and ZHANG K. (1982): "Matrix interference in the determination of trace metals by graphite furnace AAS after Chelex-100 preconcentration", *Atomic Spectroscopy*, **3**, 39-40.

DUPONT V., AUGER Y., JEALDEN C. and WARTEL M. (1991): "Determination of vanadium in seawater by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using chelating resin column preconcentration", *Anal. Chem.*, **63**, 520-522.

FIGURA P. and McDUFFLE B. (1980): "Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and chelex column and batch methods", *Anal. Chem.*, **52**, 1433-1439.

FLORENCE T.M. and BATLEY G.E. (1975): "Removal of trace metals from seawater by a chelating resin", *Talanta*, **22**, 201.

FLORENCE T.M. (1982): "Development of physico-chemical speciation procedure to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium, and zinc towards aquatic biota", *Anal. Chim. Acta*, **141**, 73-94.

GREENBERG R.R. and KINGSTON H.M. (1983): "Trace element analysis of natural water sample by neutron activation analysis with chelating resin", *Anal. Chem.*, **55**, 1165-1168.

KINGSTON H.M., BARNES I.L., BRADY T.J., RAINS T.C. and CHAMP M.A. (1978): "Separation of eight transition elements in estuarine and seawater with chelating resin and their determination by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry", *Anal. Chem.*, **50**, 14, 2064-2070.

MAESSEN F.J.M.J., BALKE Y. and de BOER J.L.M. (1982): "Preservation of accuracy and precision in the analytical practice of low power ICP-AES", *Spectrochim. Acta*, **37B**, 517-526.

MIYAZAKY A. and BARNES R.M. (1981): "Complexation of some transition metals, rare earth elements, and thorium with a poly(dithiocarbamate) chelating resin", *Anal. Chem.*, **53**, 299-304.

MULLER F.L.L. and KESTER D.R. (1990): "A kinetic approach to trace metal complexation in seawater: application to zinc and cadmium", *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 234-242.

PAKANLS P., BATLEY G.E. and CAMERON A.J. (1978): "The effect of surfactants on the concentration of heavy metals from natural waters on Chelex-100 resin", *Anal. Chim. Acta*, **99**, 333-342.

PAULSON A. J. (1986): "Effects of flow rate and pretreatment on the extraction of trace metals from estuarine and coastal seawater by Chelex-100", *Anal. Chem.*, **58**, 183-187

PAY S.C., CHEN T.C. and WONG G.T.F. (1990): "Maleic acid/ammonium hydroxide buffer system for preconcentration of trace metals from seawater", *Anal. Chem.*, **62**, 774-777.

PETTINE M., CAMUSSO M., MARTINOTTI W., MARCHETTI R., PASSINO R. and QUEIRAZZA G. (1994): "Soluble and particulate metals in the Po River: factors affecting concentrations and partitioning", *Sci. Total Environ.*, **145**, 243-265.

RILEY J.P. and TAYLOR D. (1968): "Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta*, **40**, 479.

SIDES J.L. and KENNER C.T., (1966): "Effect of pH and ionic strength on the distribution coefficients of alkaline earth metals and nickel with chelating ion-exchange resins", *Anal. Chim. Acta*, **38**, 707.

STURGEON R.E., BERMAN S.S., DESAULNIERS J.A.H., MYKYTIUK A.P., McLAREN J.W. and RUSSELL D.S. (1980): "Preconcentration of trace metals from seawater for determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Talanta*, **27**, 85-94.

STURGEON R.E., BERMAN S.S., WILLIE S.N. and DESAULNIERS J.A.H. (1981): "Preconcentration of trace elements from seawater with silica-immobilized 8-hydroxyquinoline", *Anal. Chem.*, **53**, 2337-2340.

DETERMINAZIONE DI TENSOATTIVI NON IONICI NELLE ACQUE (BIAS).

Capri S.*, Zanette M.** , Marcomini A.** e Patrolecco L.*

*Istituto di Ricerca sulle Acque, Roma

**Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari, Venezia.

RIASSUNTO

Il metodo per la determinazione dei tensioattivi non ionici (BIAS) pubblicato nel manuale "Metodi Analitici per le Acque" (IRSA,1994), risulta sostanzialmente modificato rispetto alla precedente versione (Scheda IRSA E-013).

Il presente lavoro documenta come, attraverso il confronto di due procedure standardizzate (IRSA E-013 ed ISO 7875/2), le informazioni desunte dalla letteratura e l'esame dei risultati di una serie di prove tendenti a verificare i principali punti controversi del metodo suddetto, si sia arrivati a introdurre una versione profondamente revisionata di detto metodo.

SUMMARY

A series of experiments were carried out to solve the inconsistencies of the regulatory semispecific method for the determination of nonionic surfactants (BIAS) in aqueous samples and to evaluate precision, accuracy and applicability concentration range. Significant improvements of the protocol IRSA E-013 were introduced and the BIAS method was recently published, in revised form, in the IRSA Handbook of Water Analysis (Method 5160).

INTRODUZIONE

In Italia, il consumo di tensioattivi non ionici ammonta a circa 83.000 T/anno (Marcomini, 1991).

Sebbene questa classe di tensioattivi annoveri numerosi tipi di composti, quali gli alcoli alifatici polietossilati (AE), gli alchilfenoli polietossilati (APE), gli esteri polietossilici e le alcanolammidi degli acidi grassi (FAE, FAA) e i polimeri a blocco polietossilati-polipropossilati (EPE, pluronic block polymers), AE ed APE rappresentano più dell' 80% dei tensioattivi non ionici utilizzati nei prodotti detergenti.

AE ed APE, come qualsiasi altro tipo di tensioattivo, sono costituiti da miscele di omologhi, oligomeri ed isomeri la cui complessità è funzione della natura delle materie prime utilizzate e delle modalità di sintesi industriale. Tale complessità si ritrova nei formulati commerciali e di conseguenza anche nelle acque di scarico ed in quelle naturali che costituiscono il loro recapito naturale.

La determinazione analitica della composizione di queste miscele non è affatto agevole e ha favorito la messa a punto di metodi "cumulativi" di analisi. Tali metodi sono stati messi a punto durante gli anni '60-

'70 con lo scopo di verificare la biodegradabilità primaria dei tensioattivi commercializzati; successivamente, gli stessi metodi sono stati adottati per l'analisi di acque naturali e di scarico. Questa estensione ha creato non pochi problemi a causa della complessità delle matrici ambientali che si manifesta soprattutto attraverso la presenza di sostanze interferenti.

Sebbene nell'ultima decade le indagini ambientali abbiano dato un grande impulso allo sviluppo di metodi specifici, in grado di distinguere e quantificare i singoli composti di ciascun tipo di tensioattivo, quelli cumulativi rimangono i metodi previsti dalle varie normative nazionali ed internazionali.

CONFRONTO TRA LE SCHEDE IRSA E-013 ED ISO 7875/2

La scheda IRSA E-013, pubblicata nel febbraio del 1979, indicava le modalità per la determinazione dei tensioattivi non ionici polietossilati nelle acque naturali e di scarico. La scheda ISO 7875/2, pubblicata nel dicembre del 1984 dall'International Organization for Standardization, ha inteso normalizzare le metodiche per la determinazione del BIAS adottate dai diversi organismi nazionali aderenti all'ISO. Conseguentemente l'UNICHIM (Associazione per l'Unificazione nel settore dell'Industria Chimica) ha fatto proprio questo metodo.

Di seguito è riportato, in forma tabellare, il confronto tra le due schede.

Un attento esame comparativo delle procedure indicate dalle due schede rivela alcune differenze sostanziali per quanto riguarda la sensibilità e conseguente campo di applicabilità del metodo, le modalità di preconcentrazione/purificazione tramite sublazione, l'eliminazione degli interferenti, le modalità di filtrazione e lavaggio del precipitato, l'esecuzione della titolazione e della prova in bianco, la precisione e l'accuratezza.

Ciascuno di questi punti viene qui di seguito discusso criticamente ed approfondito sulla base del lavoro sperimentale da noi condotto o di risultati riportati in letteratura.

SENSIBILITÀ' E CAMPO DI APPLICABILITÀ'

Il limite di rivelabilità indicato dalla scheda IRSA (0,01 mg/L) è 5 volte inferiore rispetto a quello della scheda ISO (0,05 mg/L). Per quanto riguarda il range di applicabilità del metodo, la scheda IRSA indica l'intervallo 0,02-0,2 mg/L, mentre la scheda ISO suggerisce 0,25-0,8 mg/L. La scheda IRSA perciò considera possibile l'analisi di acque superficiali a partire da campioni di 1 L, mentre la scheda ISO consiglia per questi l'uso di almeno 5 L di campione. Poiché il BIAS è nato ed è stato sviluppato per l'analisi di influenti ed effluenti in impianti di trattamento di reflui civili e per l'utilizzo in test di biodegradazione come i test di screening e di conferma (OECD, 1972; EEC, 1982), la letteratura riporta in proposito intervalli di concentrazione ottimali

sovente più vicini a quelli riportati dalla scheda ISO. D'altra parte le analoghe schede DIN (Deutsches Institut für Normalisierung) e BSI (British Standard Institute), probabilmente basate su determinazioni in standard acquosi sintetici, sono pure concordi con il limite di rivelabilità e l'intervallo di lavoro ottimale fissati dalla scheda ISO.

MODALITÀ' DI SUBLAZIONE

Le schede prevedono due sublezioni basiche del campione acquoso della durata di 10' (IRSA) e due sublezioni basiche di 5' (ISO), rispettivamente. Uno studio metodologico condotto su campioni provenienti da impianti di trattamento (Waters et al., 1986) ha evidenziato che il recupero dei tensioattivi non ionici polietossilati è proporzionale al numero delle sublezioni e alla durata di ciascuno step sublativo ed è legato alle modalità di pretrattamento del campione (filtrazione, centrifugazione, nessun pretrattamento), alla percentuale di solidi sospesi presenti e alla concentrazione del campione.

Tuttavia i fattori "pretrattamento del campione" e "quantità di solidi sospesi", assieme alla concentrazione di BIAS, appaiono come predominanti nel determinare l'entità del recupero rispetto al numero (purchè > 2) di sublezioni e alla durata (purchè > 5') delle medesime. Il passaggio delle sublezioni da 2 a 4 e dei tempi di sublazione da 5' a 10' possono portare ciascuno a recuperi ulteriori di circa il 5%. Poichè l'aumento del numero di sublezioni è molto più oneroso, in termini di tempo, manualità e consumo di reagenti, di quanto non sia l'aumento della durata dello step sublativo, le condizioni di sublazione della scheda IRSA (due sublezioni della durata di 10' ciascuna) sono da preferirsi.

ELIMINAZIONE DEGLI INTERFERENTI

La scelta della scheda IRSA di ricorrere alla eliminazione dei tensioattivi cationici solo quando è positivo il saggio al blu di disulfine non tiene conto del fatto che, in presenza di tensioattivi anionici nei campioni ambientali, il saggio può risultare negativo anche in presenza di tensioattivi cationici. Per evitare una sovrastima del BIAS è necessario procedere comunque al passaggio dell'estratto su resina cationica per eliminare i tensioattivi cationici eventualmente presenti. Inoltre, anche se nessuna delle due schede prevede il passaggio anche su resine anioniche, escludendo interferenze dei tensioattivi anionici per concentrazioni fino a 20 volte superiori a quelle dei non ionici, è stata verificata una diminuzione apprezzabile del BIAS, in seguito a tale operazione, in campioni di influenti ed effluenti di impianti di trattamento (Waters et al., 1986). Alcuni dati da noi raccolti nel corso dell'indagine preliminare (riportati più avanti) indicano che in campioni d'acqua superficiale a bassa concentrazione di BIAS, la variazione di BIAS ottenuta purificando gli estratti è paragonabile alla deviazione standard dei valori

stessi. Nel contempo, gli step di purificazione possono portare ad una diminuzione della precisione del metodo. Si propone pertanto di omettere la purificazione su resine per le acque superficiali (BIAS < 0,05 mg/L) e di effettuare il passaggio su entrambe le resine per influenti ed effluenti di impianti di trattamento.

MODALITÀ DI FILTRAZIONE E LAVAGGIO DEL PRECIPITATO

E' uno step cruciale poichè, soprattutto per campioni di acque superficiali, si può avere a che fare con poche decine di microgrammi di precipitato che devono essere trattiene e lavati dal grande eccesso di Bi presente nella soluzione reagente. E' importante trattenere gran parte del precipitato microcristallino su di un filtro di fibra di vetro da 0,8 µm (come consigliato dalla scheda ISO) per favorirne il lavaggio senza perdite ed il facile recupero. Fondamentale è poi l'accurato lavaggio con acido acetico glaciale del precipitato e del filtro. Di tale operazione non viene fatta menzione nella scheda ISO.

ESECUZIONE DELLA TITOLAZIONE

La scheda IRSA è generica in proposito. La scheda ISO, invece, fornisce dettagliate indicazioni sulle modalità di esecuzione della titolazione. La soluzione di NaPDC 0,0005N (il cui titolo deve essere controllato settimanalmente con soluzione standard di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) deve essere addizionata di alcool n-amilico che ne diminuisce la viscosità, favorendone il flusso regolare dalla punta della buretta. Quest'ultima deve inoltre essere immersa nella soluzione da titolare per consentire il dosaggio preciso di volumi molto piccoli (poche centinaia di µL). La disponibilità di una buretta automatica o di un titolatore automatico può aumentare la precisione e ridurre i tempi dell'analisi. Poichè il potenziale impiega un certo tempo per stabilizzarsi dopo ogni aggiunta, è necessario attendere qualche istante prima della lettura del potenziale. E' inoltre necessario utilizzare flussi di titolante molto ridotti quando le concentrazioni di tensioattivo (e di Bi-equivalente) sono molto piccole (acque superficiali). Ha molta importanza infine la frequente pulitura dell'elettrodo di Pt allo scopo di ridurre la deriva di potenziale durante le titolazioni. Questa operazione si esegue con apposita carta-smeriglio.

Si deve infine enfatizzare come, nel caso di acque superficiali a bassa concentrazione di BIAS, si debbano titolare soluzioni di Bi a concentrazioni circa 10^{-7} M. Tali concentrazioni si trovano all'estremo inferiore del range di applicabilità delle tecniche potenziometriche. Opportune modifiche della metodica potranno essere introdotte in futuro per ridurre il volume della soluzione da titolare e migliorare così il profilo della curva di titolazione.

Tab. 1. Confronto tra le schede IRSA E-013 ed ISO 7875/2.

	IRSA E-013 (1979)	ISO 7875/2 (1984)
Sostanze determinabili	APE-AE con catena polietossilica compresa tra 6 e 30 unità etossiliche.	APE-AE con catena polietossilica di circa 5-30 unità etossiliche.
Campi di Applicazione	Acque naturali e di scarico.	Influenti ed effluenti di impianti di trattamento. Per acque superficiali sono consigliati campioni di 5 L.
Limite di Rivelabilità	0,01 mg/L.	0,05 mg/L.
Intervallo ottimale di applicazione	0,02-0,2 mg/L.	0,25-0,8 mg/L.
Interferenze	Tutte le sostanze polietossilate non tensioattive. Tensioattivi cationici.	come IRSA. I tensioattivi anionici non interferiscono fino a concentrazioni 20 volte superiori a quelle dei tensioattivi non ionici.
Campionamento e conservazione del campione	Come da manuale IRSA "Metodi analitici per le acque". Conservazione a 4°C e analisi entro 24h.	Come da schede ISO 5667/2 e ISO 5667/3. Campioni conservati in bottiglie di vetro preventivamente lavate con metanolo. Conservazione a 4°C per l'analisi entro 24h dal prelievo. Aggiunta dell'1% (V/V) di formalina (40%V/V) per la conservazione fino a 4 gg. Saturazione con CHCl ₃ per la conservazione fino a 8 gg.
Sublazione in condizioni basiche	Due sublazioni successive in 100 mL di acetato di etile, ciascuna della durata di 10'.	Due sublazioni successive in 100 mL di acetato di etile, ciascuna della durata di 5'. E' consigliata la centrifugazione dei campioni con un contenuto di solidi sospesi > 0,3 g/L.
Recupero dell'estratto	Evaporazione dell'acetato di etile in corrente di azoto.	Evaporazione dell'acetato di etile in corrente di aria, accelerata dal riscaldamento a bagnomaria.
Eliminazione (eventuale) dei tensioattivi cationici	Se è positivo il saggio con blu di disulfine si procede al passaggio dell'estratto, sciolto in 200 mL di metanolo, su resina Dowex 50WX2 (cationica forte). La resina viene lavata con 50-60 mL di metanolo e l'estratto viene recuperato per evaporazione.	In caso di presenza di tensioattivi cationici, l'estratto viene sciolto in 20 mL di metanolo e fatto percolare su resina cationica forte in modo analogo a quello indicato nella scheda IRSA. Non viene però indicato come verificare la presenza di tensioattivi cationici.
Preparazione dell'estratto per la precipitazione	Estratto ripreso con 2 mL di metanolo e 50 mL di acqua. Acidificazione della soluzione con HCl 1% fino al viraggio al verde del porpora di bromocresolo.	Estratto ripreso con 5 mL di metanolo e 40 mL di acqua. Soluzione acidificata con 0,5 mL di HCl 0,01M.
Precipitazione	Soluzione precipitante: miscela di due parti di "soluzione A" (da conservare in bottiglia scura, durata massima: 1 settimana) ed una parte di soluzione B. L'aggiunta della soluzione precipitante (30 mL) deve essere fatta sotto agitazione in un tempo di 10'. Successivamente si devono attendere altri 10' prima di procedere alla filtrazione.	Come scheda IRSA. L'attesa per la filtrazione dopo l'aggiunta della soluzione precipitante è di 5'.

segue Tab. 1

segue Tab. 1

Recupero del precipitato	Filtrazione sottovuoto su crogiolo filtrante di vetro (porosità 3-15 µm).	Filtrazione sottovuoto su crogiolo filtrante (porosità classe 4), eventualmente aiutata con filtro in fibra di vetro.
Lavaggio del precipitato	Lavaggio con 5 porzioni di acido acetico glaciale da 30 mL ciascuna.	Non menzionato.
Ridissoluzione del precipitato	Tramite lavaggio del crogiolo filtrante dapprima con 50 mL di soluzione (20 g/L) di tartrato ammonico caldo (80°C) e poi con 150 mL di acqua.	Tramite lavaggio del crogiolo filtrante con 3 aliquote da 10 mL di soluzione calda (80°C) di tartrato d'ammonio (20 g/L), seguito dal lavaggio dell'apparecchiatura di filtrazione con ulteriori 40 mL della stessa soluzione e con 100-150 mL d'acqua.
Regolazione del pH della soluzione	Aggiunta di soluzione acquosa di NH ₃ al 16% fino al viraggio del porpora di bromocresolo. Ulteriore aggiunta di 10 mL di soluzione tampone (acido acetico-acetato sodico).	Come scheda IRSA.
Titolazione potenziometrica	Sol. titolante: NaPDC 0,0005 N in acqua, addiz. di 0,5 g/L di idrogeno carbonato sodico (controllo settimanale del titolo) titolazione seguita con titolatore potenziom. (sensibilità ±1mV, elettrodo di riferimento: calomelano, elettrodo campione: platino) fino ad un apprezzabile salto di potenziale.	Sol. titolante: come IRSA ma addizionata di 10 mL/L di alcool amilico. Titolazione seguita potenziometricamente, con la punta della buretta immersa nella soluzione da titolare. Velocità di aggiunta del titolante: 2mL/min. Velocità del registratore 4 cm/mL. E' consigliata la pulitura dell'elettrodo di platino in presenza di deriva del potenziale.
Quantificazioni alternative del bismuto presente	nessuna.	Per via AAS direttamente sul precipitato disciolto in tartrato ammonico o in acido nitrico. Quantificazione con retta di taratura esterna. Per via spettrofotometrica sfruttando la formazione di un complesso Bi-EDTA (misura dell'assorbimento UV a 263,5 nm).
Bianco	Prevede l'esecuzione di un bianco, ma non è chiaro da quale step della procedura (sublazione, precipitazione o titolazione) si deve partire.	Prevede l'esecuzione della prova in bianco a partire dallo step di precipitazione.
Precisione	Deviazione standard relativa inferiore al 12% per BIAS compresi tra 0,01 e 1 mg/L.	Deviazione standard relativa entro il 10 % per concentrazioni comprese tra 0,5 e 1 mg/L.

PROVA IN BIANCO

La scheda IRSA non indica chiaramente da quale step della procedura partire per l'esecuzione del bianco. La scheda ISO contempla l'esecuzione del bianco a partire dallo step di precipitazione. L'esecuzione di una prova in bianco che contempli il passaggio di un campione di acqua distillata (di volume pari a quello del campione reale) attraverso ciascuno step della procedura analitica è di fondamentale importanza, tanto più quanto è ridotta la concentrazione di BIAS nel campione reale. Per acque superficiali il volume di titolante utilizzato per il bianco è dello stesso ordine di grandezza di quello per il campione. Dal punto di vista operativo, è

consigliabile utilizzare un sistema di sublazione esclusivamente per l'esecuzione del bianco, in modo da evitare un effetto memoria dell'apparecchiatura tale da incrementare il BIAS del bianco stesso.

PRECISIONE E ACCURATEZZA

La scheda IRSA indica una deviazione standard relativa inferiore al 12% per concentrazioni fino a 0,01 mg/L. La scheda ISO prevede la stessa precisione solo per concentrazioni 50 volte superiori. I valori da noi trovati sembrano confermare deviazioni standard relative del 10-20% riportate dalla scheda IRSA alle concentrazioni più basse. Va però enfatizzato come,

per titolare quantità di Bi così ridotte, sia necessario mettere a punto in maniera ottimale l'apparecchiatura di titolazione in ogni sua parte. Si rimarca inoltre come la precisione dell'analisi sia strettamente legata alla esatta riproduzione di ciascuno step analitico ed all'utilizzo di reagenti di purezza costante e di recente preparazione (quando questo è richiesto).

VERIFICHE SPERIMENTALI

E' stato intrapreso un lavoro sperimentale allo scopo di chiarire alcune controversie fra le due schede. In particolare sono stati esaminati il limite di rivelabilità, l'intervallo di applicabilità, l'opportunità di usare le resine a scambio ionico per l'eliminazione delle interferenze, l'accuratezza e la precisione del metodo. Gli estratti sono sempre stati purificati tramite passaggio su resine a scambio cationico ad eccezione delle prove eseguite su acque superficiali allo scopo di saggiare diverse modalità di purificazione (nessuna resina, resina cationica, resina cationica + resina anionica). In primo luogo sono stati analizzati campioni di acque di scarico trattate

(effluenti), non trattate (influenti) ed acque fluviali per determinare la riproducibilità del metodo a livelli di concentrazione medi e bassi. I risultati sono riportati in Tab. 2.

Dopo passaggio dell'estratto su resina cationica, la precisione, espressa come scostamento dal valor medio, è risultata, indipendentemente dal tipo di campione esaminato, inferiore al 6% per concentrazioni superiori a 130 µg/L e pari a circa il 10% per concentrazioni inferiori.

Successivamente un campione di acqua superficiale contenente una concentrazione di BIAS prossima al limite di rivelabilità indicato dalla scheda IRSA (0,01 mg/L) è stato analizzato seguendo diverse procedure di purificazione dell'estratto allo scopo di verificare quali di queste procedure influissero significativamente sulla concentrazione trovata. In Tab. 3 sono riportate sia le modalità di purificazione dell'estratto dopo sublazione che i risultati ottenuti. Questi ultimi indicano che per le acque superficiali a basso tenore di BIAS (10-20 µg/L), i passaggi su resine sia cationica che anionica non influiscono significativamente sul valore finale di BIAS e quindi si possono considerare superflui.

Tab. 2. Valori medi di BIAS e deviazioni standard relative di alcuni campioni acquosi (influenti ed effluenti da impianti di trattamento ed acque superficiali) sottoposti a determinazioni in replicato seguendo la metodica proposta.

TIPO DI CAMPIONE	NUMERO DI DETERMINAZIONI	BIAS		MODALITÀ DI PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO		
		valore medio µg/L	dev. st.d % o scostamento % dal valore medio	nessuna	resina cationica	resina cationica+ anionica
Effluente da impianto di trattamento dil. 1:25 (Prato-FI)	3	57±6	10		*	
Effluente da impianto di trattamento (Campalto-VE)	2	480±28	5,8		*	
Influente di impianto di trattamento dil. 1:10 (Campalto-VE)	2	330±12	3,8		*	
Fiume Po (Occhiobello-FE)	2	131,5±5	3,8		*	
Fiume Adige (Badia Polesine-RO)	2	15,7±1,6	10		*	

Tab. 3. Determinazioni di BIAS in un campione di acqua superficiale a bassa concentrazione di tensioattivi non ionici, eseguite utilizzando diverse procedure di purificazione dell' estratto proveniente dalla sublimazione.

TIPO DI CAMPIONE	NUMERO DI DETERMINAZIONI	BIAS		MODALITÀ DI PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO		
		valore medio $\mu\text{g/L}$	scostamento % dal valore medio	nessuna	resina cationica	resina cationica+ anionica
Acqua superficiale	2	14,7 \pm 0,9	6,1	*		
Acqua superficiale	2	15,7 \pm 1,6	10		*	
Acqua superficiale	2	11,7 \pm 2,4	20			*

Tra i problemi più frequentemente segnalati dagli utilizzatori della metodica BIAS vi sono l'incongruità di valori particolarmente elevati ottenuti nelle prove in bianco e le difficoltà di titolazione ed identificazione dei punti di fine titolazione in campioni a basso tenore di BIAS. A questo proposito si sono condotti alcuni esperimenti riguardanti la riproducibilità sia della procedura di bianco che dello step finale di titolazione. In Fig. 1 sono riportate una tipica curva di titolazione potenziometrica relativa ad una prova in bianco (Fig. 1A) ed il corrispondente grafico di individuazione del punto di fine titolazione tramite il metodo dei rapporti incrementali $\Delta E/\Delta \text{vol.}$ (variazione di potenziale/incremento del volume di titolante aggiunto) in funzione del volume di titolante aggiunto (Fig. 1B). Si è verificato che, utilizzando per l'esecuzione della prova in bianco vetreria adibita esclusivamente a questo scopo ed acqua adeguatamente purificata (nel nostro caso acqua milliQ), si ottengono consumi di soluzione titolante sistematicamente inferiori a 50 μL . Per quanto riguarda l'influenza dello step di titolazione sulla precisione della misura finale, la titolazione in triplicato di porzioni di uno stesso estratto di effluente da impianto di trattamento (diluito 1:10, BIAS: 48 \pm 2,8 $\mu\text{g/L}$) ha evidenziato una deviazione standard del 6%. In Fig. 2 è riportata una tipica curva di titolazione potenziometrica di un effluente da impianto di trattamento (Fig. 2A) assieme al corrispondente andamento dei rapporti incrementali $\Delta E/\Delta \text{vol.}$ in funzione del volume di titolante aggiunto (Fig. 2B). Un aspetto importante che non viene menzionato nè dalla scheda IRSA, nè dalla scheda ISO è quello dell'accuratezza del metodo. Determinazioni eseguite su soluzioni di standard a composizione chimica nota ed esenti da ogni possibile interferente, hanno evidenziato una sistematica sovrastima della concentrazione effettiva. I valori riportati in Tab. 5, unitamente a dati ottenuti da altri laboratori (Cavalli, 1993, Comunicazione personale) consentono di quantificare tale sovrastima in circa il 20% per concentrazioni inferiori a 100 $\mu\text{g/L}$, nel 5-10% per concentrazioni comprese tra 100 e 200 $\mu\text{g/L}$ e nel 5% per concentrazioni superiori a 200 $\mu\text{g/L}$. Nel caso di campioni ambientali la valutazione dell'accuratezza di questo metodo, così come di

qualsiasi altro metodo cumulativo, richiede la disponibilità di metodi specifici in grado di quantificare i vari componenti (omologhi, oligomeri, isomeri) di ciascun tipo di tensioattivo appartenente ad una determinata classe. Come già menzionato nell'introduzione, gli alcoli alifatici polietossilati (AE) e i nonilfenoli polietossilati (NPE) rappresentano la quasi totalità dei tensioattivi non ionici presenti sul mercato. Per determinare l'accuratezza del BIAS nei campioni reali occorre pertanto determinare sia AE che NPE. Mentre gli NPE possono essere agevolmente determinati per mezzo della cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa e normale con rivelazione in fluorescenza (Marcomini et al., 1987; Marcomini e Giger, 1987; Ahel e Giger, 1985 a e b; Marcomini et al., 1993), ad eccezione di alcune procedure basate sull'impiego del fenilisocianato come reattivo derivatizzante (Cavalli et al., 1993) non esistono metodiche sufficientemente selettive per la determinazione degli AE in campioni ambientali e ciò non rende agevole la determinazione specifica complessiva dei tensioattivi non ionici ed il paragone con il dato di BIAS. Nonostante che il rapporto di mercato AE/NPE sia mediamente 3/1, esistono realtà in cui l'utilizzo industriale di NPE fa diminuire sensibilmente tale rapporto. Una di queste è quella di Prato, dove, a causa dell'elevato impiego nell'industria tessile, NPE rappresenta circa l'85% dei tensioattivi non ionici nelle acque di scarico convogliate nell'impianto di depurazione consorziale. Sulla base di questa circostanza, la determinazione specifica dei tensioattivi non ionici in queste acque di scarico si può ridurre a quella degli NPE. Pertanto, in un certo numero di campioni di influenti ed effluenti finali dell'impianto di depurazione di Prato si sono condotte sia la determinazione del BIAS che quella specifica di NPE. I risultati, riportati in Tab. 5 indicano che le concentrazioni di tensioattivi non ionici determinate per via specifica sono inferiori a quelle dei corrispondenti BIAS. In particolare, il rapporto BIAS/NPE è significativamente più elevato negli effluenti finali rispetto agli influenti, come già peraltro documentato parzialmente in letteratura (Brown et al., 1986; Brown et al., 1987). Quindi la depurazione delle acque negli appositi impianti meccanico-biologici

determina un aumento apprezzabile del rapporto interferenti/tensioattivi non ionici.

CONCLUSIONI

Il lavoro di revisione del metodo BIAS ha confermato come esso risulti laborioso e richieda lunghi tempi di esecuzione. Al fine di ridurre sia l'imprecisione che i tempi di analisi, è raccomandabile l'uso di più apparecchi di sublazione, uno dei quali dedicato solamente all'esecuzione delle prove in bianco ed uno ciascuno per i diversi tipi di campione (influenti, effluenti di impianti di trattamento, acque superficiali ecc.), nonché l'utilizzo di un titolatore automatico per l'esecuzione della titolazione finale. I miglioramenti più significativi introdotti riguardano:

- a) il passaggio dell'estratto proveniente dalla sublazione attraverso resine a scambio ionico allo scopo di eliminare le interferenze dovute ai tensioattivi cationici (in particolare) ed anionici,
- b) le modalità di recupero e ridissoluzione del precipitato ottenuto trattando l'estratto con il reattivo di Dragendorff ;
- c) le modalità di esecuzione della titolazione potenziometrica del bismuto.

Si è confermato l'attuale limite inferiore dell'intervallo di applicabilità del BIAS proposto dalla scheda IRSA e corrispondente a 0,010 mg/L.

Si è infine valutata sia la precisione che l'accuratezza del metodo BIAS rivisto. La precisione, espressa come deviazione standard relativa, è risultata intorno al 10% per concentrazioni fino a 0,10 mg/L e di circa il 5% per concentrazioni superiori a 0,15 mg/L.

Per quanto riguarda l'accuratezza del BIAS, i dati da noi ottenuti per campioni di acque di scarico (influenti ed effluenti di impianti di depurazione), come pure quelli di letteratura, dimostrano che essa risulta poco soddisfacente e che non esiste nessuna correlazione tra dati semispecifici e specifici relativi ad influenti ed effluenti finali di uno stesso impianto di depurazione.

Alla luce della inaccuratezza rilevata del metodo BIAS, come pure degli altri metodi semispecifici attualmente disponibili per la determinazione dei tensioattivi non ionici in campioni reali, si impone sempre più fortemente la necessità di affiancare ai metodi cumulativi metodi specifici che consentano una determinazione accurata dei principali tensioattivi non ionici impiegati nei detersivi.

BIBLIOGRAFIA

AHEL M., GIGER W. (1985a): "Determination of Nonionic Surfactant of the Alkylphenol Polyethoxylate Type by High Performance Liquid Chromatography" *Anal. Chem.*, **57**, 2584-2590.

AHEL M., GIGER W. (1985b): "Determination of Alkylphenols and Alkylphenol Mono and Diethoxylates In Environmental Samples by High Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, **57**, 1577-1583.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J. T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS E., WATERS J., WATKINSON R. J. (1986): "Removal of Nonionics in a Sewage Treatment Plant", *Tenside deterg.*, **23**, 190-195.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J. T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS E., WATERS J. WATKINSON R. J. (1987): "Removal of Nonionics in Sewage Treatment Plant II", *Tenside Deterg.*, **24**, 14-19.

CAVALLI L., GELLERA A., CASSANI A., LAZZARIN C., MARASCHIN., NUCCI G. (1993): "Analysis of non-ionics and alcohol ethoxylates. Application to confirmatory biodegradation test effluents", *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **70**, 447-451.

EEC (1982): Direttiva No. 4311/82, Annex Cap. 3, Brussels.

IRSA (1994): "Metodi Analitici per le Acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, Roma

MARCOMINI A. (1991): "Evoluzione dei metodi di analisi dei tensioattivi in campioni ambientali e prescrizioni normative", *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **68**, 339-343.

MARCOMINI A., CAPRI S., GIGER W. (1987): "Determination of Linear Alkylbenzenesulphonates, Alkylphenolpolyethoxylate and Nonylphenol in Wastewater by High Performance Liquid Chromatography after Enrichment on Octadecylsilica", *J. Chromatography*, **403**, 243-252.

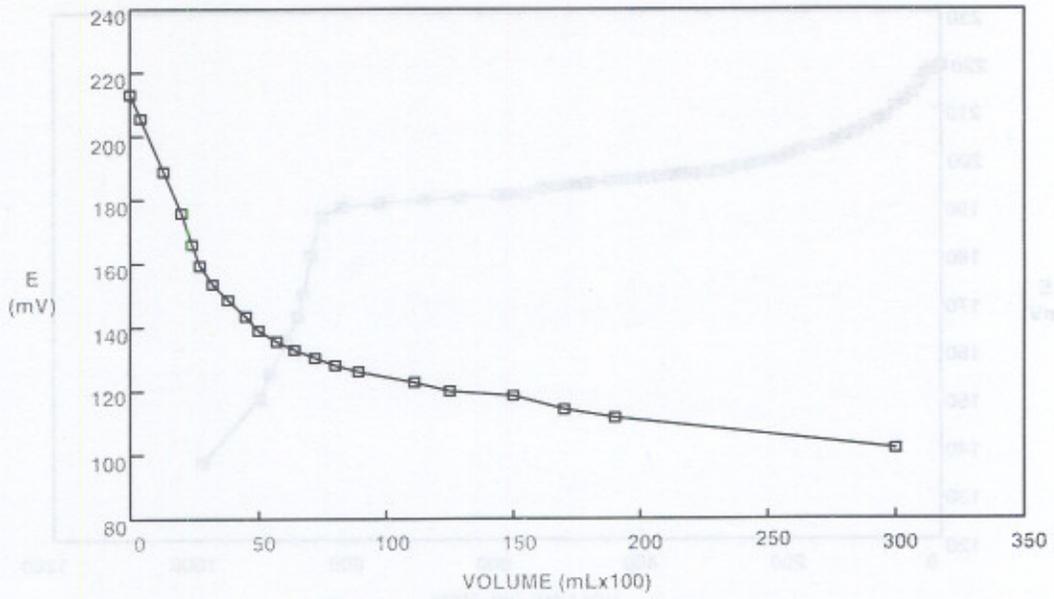
MARCOMINI A., DI CORCIA A., SAMPERI R., CAPRI S. (1993): "Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products", *J. Chromatography*, **644**, 59-71

MARCOMINI A., GIGER W. (1987): "Simultaneous Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates, Alkylphenol Polyethoxylates and Nonylphenol by High Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, **59**, 1709-1715.

OECD (1972): "Pollution by detergent. Determination of the biodegradability of anionic synthetic surface-active agents", Paris.

WATERS J., GARRIGAN J. T., POULSON A. M. (1986): "Investigation into the scope and limitations of the bismuth active substances procedure (Wickbold) for the determination of nonionic surfactants in environmental samples", *Wat. Res.*, **20**, 247-253.

A



B

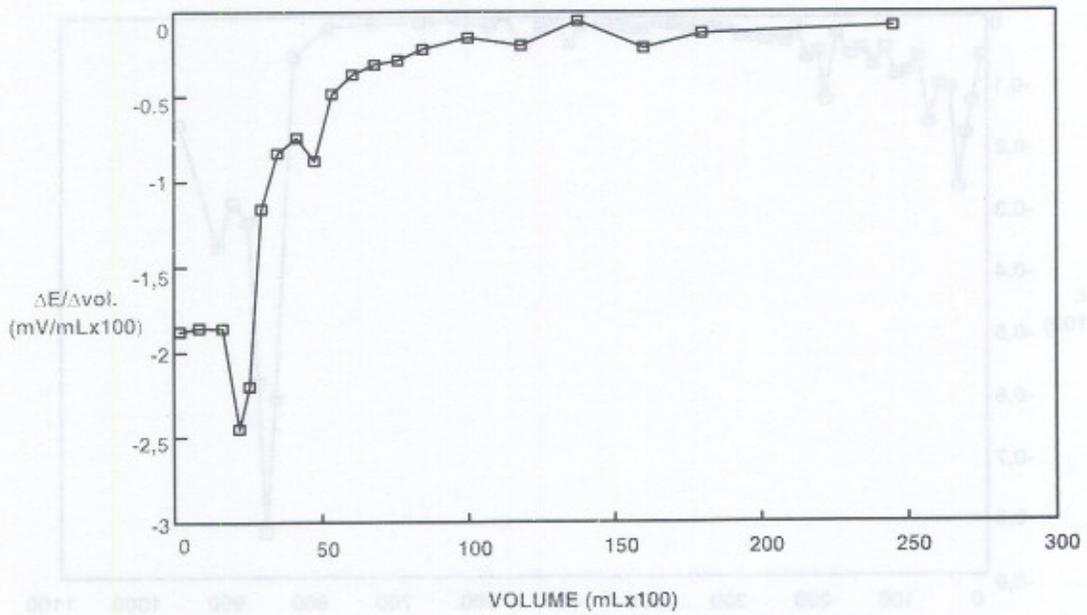
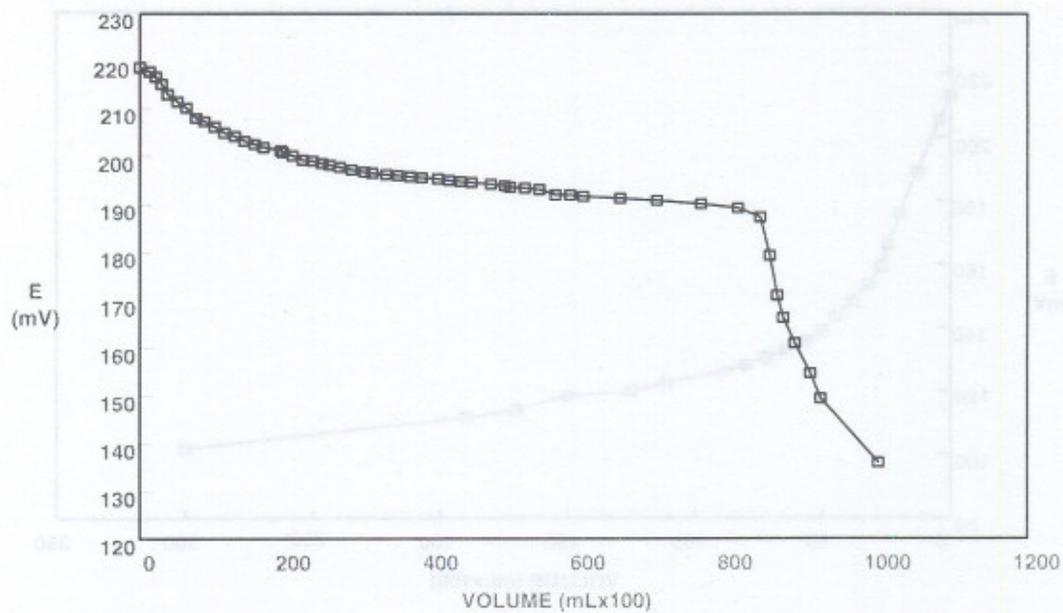


Fig. 1. Curva di titolazione potenziometrica (A) e corrispondente diagramma dei rapporti incrementali $\Delta V/\Delta vol.$ di titolante in funzione del volume di titolante aggiunto (B), relativi ad una prova in bianco.

A



B

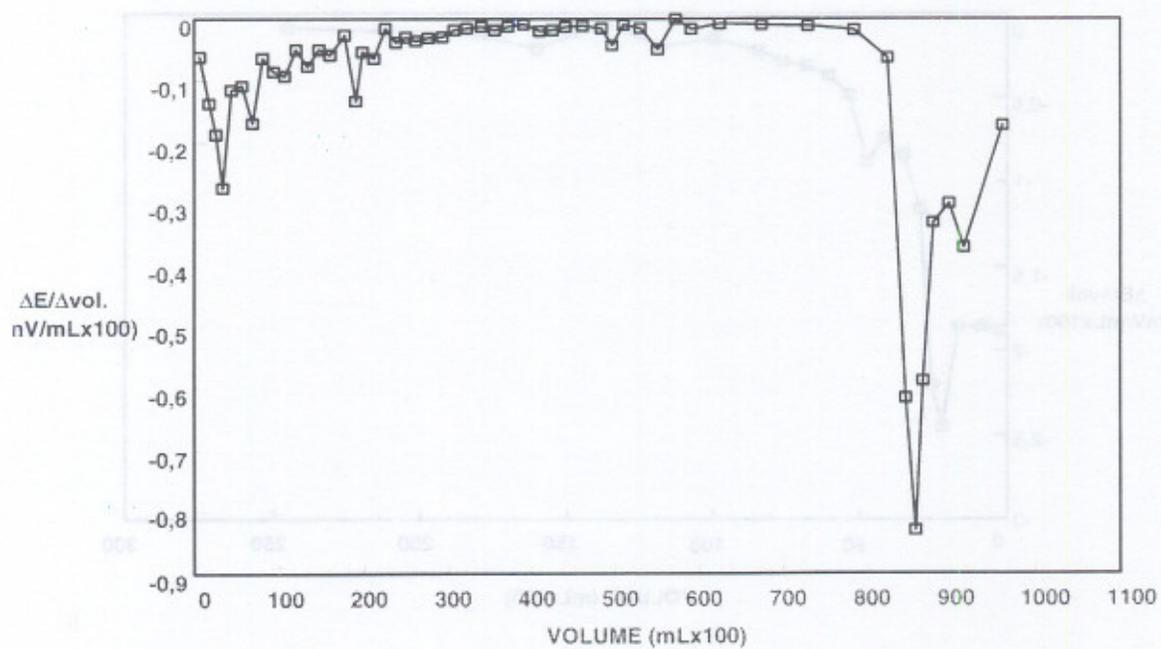


Fig. 2. Curva di titolazione potenziometrica (A) e corrispondente diagramma dei rapporti incrementali $\Delta V / \Delta \text{vol.}$ di titolante in funzione del volume di titolante aggiunto (B), relativi ad un effluente da impianto di trattamento (Campalto VE).

Tab. 4. Determinazione dell'accuratezza globale del metodo attraverso la misurazione in replicato del BIAS di campioni acquosi a titolo noto di Dehydol LT7 (miscela di alcoli grassi polietossilati).

Tipo di campione	numero det.	BIAS ($\mu\text{g/L}$ di NP10EO)		
		teorico	trovato	variazione %
Dehydol LT7	2	54	66 \pm 5,1	+22%
Dehydol LT7	2	108	114 \pm 8,6	+5,5%

Tab. 5. Confronto tra i valori di BIAS e le concentrazioni di tensioattivi non ionici determinate con metodi specifici in campioni ambientali.

Campione	BIAS (mg/L di NP10EO)	NP10EO (mg/L, dato specifico)	% di BIAS corrispondente a NPE
influyente ¹ (9/4/92)	25,0	13,3	53,2
influyente ¹ (10/4/92)	32,0	13,9	43,4
influyente ¹ (10/7/92)	19,0	5,7	30,0
influyente ¹ (11/7/92)	16,0	9,0	56,3
effluente ¹ (9/4/92)	1,94	0,42	21,6
effluente ² (9/4/92)	1,91	0,62	32,5
effluente ¹ (10/4/92)	1,65	0,53	32,1
effluente ² (10/4/92)	2,40	1,13	47,1
effluente ¹ (10/7/92)	1,20	0,40	33,3
effluente ² (10/7/92)	2,90	0,28	9,7
effluente ¹ (11/7/92)	1,60	0,48	30,0
effluente ² (11/7/92)	2,20	0,48	21,8

1) campioni mediati sulle 24 h;

2) campioni istantanei.

Supplemento a Quaderni 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)
 Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche
 Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma
 Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861
 Direttore responsabile: R. Passino
 Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta
 Segreteria di redazione: C. M. Blundo
 Grafica ed elaborazione su computer: P. Fusco
 Allestimento e stampa: C. Pastore

NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI
Istituto di ricerca sulle acque - CNR

Il presente sommario indica (1) le unità di misura utilizzate

Parametro	Unità di misura	Simbolo	Abbr. IUPAC
Temperatura	Gradi Celsius	°C	temp
Pressione	Bar	bar	pres
Volume	Litri	l	vol
Area	Centimetri quadrati	cm ²	area
Massa	Grammi	g	mass
Concentrazione	Grammi per litro	g/l	conc
Concentrazione	Milligrammi per litro	mg/l	conc
Concentrazione	Microgrammi per litro	µg/l	conc
Concentrazione	Nanogrammi per litro	ng/l	conc
Concentrazione	Picogrammi per litro	pg/l	conc
Concentrazione	Femtometri per litro	fg/l	conc
Concentrazione	Attometri per litro	ag/l	conc
Concentrazione	Zettometri per litro	zg/l	conc
Concentrazione	Yottometri per litro	yg/l	conc
Concentrazione	Ricambi di unità		

(1) Le unità di misura riportate in questo sommario sono quelle utilizzate nel presente lavoro. Le unità di misura riportate in grassetto sono quelle utilizzate nei rapporti di ricerca.

Parametro	Unità di misura	Simbolo	Abbr. IUPAC
Temperatura	Gradi Celsius	°C	temp
Pressione	Bar	bar	pres
Volume	Litri	l	vol
Area	Centimetri quadrati	cm ²	area
Massa	Grammi	g	mass
Concentrazione	Grammi per litro	g/l	conc
Concentrazione	Milligrammi per litro	mg/l	conc
Concentrazione	Microgrammi per litro	µg/l	conc
Concentrazione	Nanogrammi per litro	ng/l	conc
Concentrazione	Picogrammi per litro	pg/l	conc
Concentrazione	Femtometri per litro	fg/l	conc
Concentrazione	Attometri per litro	ag/l	conc
Concentrazione	Zettometri per litro	zg/l	conc
Concentrazione	Yottometri per litro	yg/l	conc

Il presente sommario indica (1) le unità di misura utilizzate nel presente lavoro. Le unità di misura riportate in grassetto sono quelle utilizzate nei rapporti di ricerca.