



In questo numero:

Utilizzo di campionatori passivi in polietilene per la valutazione di inquinanti organici persistenti nei sedimenti e nelle acque di fiumi e laghi **2**

Analisi di fitofarmaci con sistemi automatizzati per la definizione dello stato chimico di qualità dei corpi idrici **12**

Determinazione di tensioattivi anionici e non ionici in matrici acquose mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e rivelazione UV-ELSD **23**

Applicazione della metodologia Design of Experiments all'analisi tossicologica con *Vibrio fischeri* **29**

In memoriam:

Un ricordo di Silvio Capri **35**

News:

Valutazione dei processi di bioaccumulo di ritardanti di fiamma bromurati (BFR) in matrici biologiche (Tesi di Dottorato) **37**

Editoriale

Il Notiziario dei Metodi Analitici pubblicato per la prima volta nel 1995, come diretta emanazione del più vecchio notiziario "Metodi analitici per le acque" (il primo numero risale al gennaio del 1981), continua la sua vita nella nuova veste di pubblicazione telematica con un titolo leggermente rivisto "Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA-News". Alla storica sezione dedicata all'Analitica nata con lo scopo di fornire un contributo alla divulgazione ed al trasferimento dei risultati di studi riguardanti l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi degli inquinanti nelle acque si affianca una sezione IRSA News che raccoglie contributi che testimoniano interessi ed attività attuali dell'Istituto che si ritiene opportuno divulgare. Nella prima sezione continueranno ad essere ospitati metodi analitici sviluppati per diverse matrici ambientali (acque, fanghi, sedimenti, suolo), nella seconda troveranno spazio contributi riguardanti soluzioni tecnologiche innovative applicate ai trattamenti depurativi di acque e fanghi ed al biorisanamento, riflessioni e commenti su nuovi provvedimenti legislativi approvati o su ipotesi di modifica di normative vigenti a livello nazionale o comunitario, segnalazioni di lavori di particolare interesse usciti su riviste internazionali, review, descrizioni di attività di ricerca in corso anche attraverso la pubblicazione di una sintesi di tesi di laurea e/o di dottorato svolte all'interno dell'Istituto.

La nuova serie presenta un rinnovamento anche degli organi direttivi e del comitato editoriale. La figura di direttore responsabile della rivista sinora affidata al direttore dell'Istituto viene ora attribuita ad un ricercatore dell'Istituto fortemente impegnato nel settore analitico, il dott. Giuseppe Mascolo. Per quanto riguarda il comitato editoriale viene meno la figura del dott. Silvio Capri, prematuramente scomparso, che ha profuso sin dalla sua assunzione presso l'IRSA e per circa 30 anni molto del suo impegno per garantire un livello qualitativo della rivista adeguato.

La formalizzazione della nuova serie, avviata sotto la precedente direzione dell'Istituto, si è conclusa dopo un iter complesso e per giunta complicato da alcuni fattori esterni e vede la luce con questo primo numero che affronta tematiche di grande interesse. Tra queste: l'utilizzo di campionatori passivi per l'analisi di POPs, l'analisi di fitofarmaci e tensioattivi con metodiche innovative, l'analisi tossicologica in presenza di miscele di contaminanti, il bioaccumulo di ritardanti di fiamma organobromurati.

Maurizio Pettine
ex Direttore del Notiziario

Utilizzo di campionatori passivi in polietilene per la valutazione di inquinanti organici persistenti nei sedimenti e nelle acque di fiumi e laghi

a cura di

Giulia Poma, Claudio Roscioli, Licia Guzzella(*), *Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Brugherio, MB*

Raffaella Borrelli, Pietro Cesti, Fabio Vago, Alessandro Oldani, *Istituto Eni Donegani, Novara, NO*

Aldo Viarengo, Susanna Sforzini, *Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro”, Alessandria, AL*

Luciano Massimo Zaninetta, *Syndial, Milano*

Phil Gschwend, *Department of Civil and Environmental Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, U.S.A.*

RIASSUNTO

Nel presente lavoro è presentato l'impiego di campionatori passivi (PED, PolyEthylene Devices) realizzati in polietilene a bassa densità (PE) per caratterizzare le forme mobili e biodisponibili di contaminanti organici idrofobici nei sedimenti, attraverso la loro quantificazione nell'acqua interstiziale (pore water). Nella prima parte di questo lavoro, vengono dettagliatamente descritti i metodi di preparazione, esposizione e analisi dei campionatori passivi in PE. Nella seconda parte, è presentato un esempio di applicazione della procedura ad un caso di studio: la contaminazione da DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano), nei sedimenti del Lago Maggiore.

I campionatori passivi impiegati si sono dimostrati efficaci nel valutare la biodisponibilità nei sedimenti di inquinanti organici, quali i DDT, economicamente vantaggiosi e meno complessi rispetto ai metodi classici di monitoraggio. Per questo motivo, è corretto ritenere che i campionatori passivi in PE potrebbero essere utilizzati come sistemi di early warning durante interventi di bonifica di suoli o sedimenti per verificare l'eventuale rischio di rilascio di contaminanti nell'ambiente.

SUMMARY

In the present work, we described the effectiveness of using low-density polyethylene (PE) passive samplers to characterize the mobile and bioavailable forms of organic hydrophobic contaminants in sediments, by evaluating their concentrations in pore water. In the first part of this work, the methods for preparing, deploying, and analyzing polyethylene (PE) passive samplers are detailed. In the second part, the validation of this approach is provided in a real case of study: the contamination of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane) in the sediments of Lake Maggiore.

In particular, we demonstrated that the PE used in situ as passive samplers are efficient tools in evaluating the bioavailability of organic contaminants in sediments, such as DDT. They are economically convenient, and more appropriate than the standard tools for biomonitoring. For these reasons, we suggest that the PE passive samplers could be used as an early warning tool of organic compound contamination during monitoring investigation in reclaiming sediment or soil experiments.

1. INTRODUZIONE

Per decenni, le emissioni di contaminanti organici di origine antropogenica hanno interessato diversi comparti ambientali quali suoli, sedimenti e acque, rendendo necessario attivare programmi di monitoraggio che soddisfacessero i requisiti delle autorità di regolamentazione. Numerosi sforzi sono stati, quindi, focalizzati nello sviluppare e implementare nuovi metodi di campionamento e analisi, con l'obiettivo di ottenere protocolli affidabili, economici e semplici da usare. Il campionamento passivo soddisfa alcune di queste caratteristiche in quanto permette un campionamento integrato nel tempo e, rispetto agli indicatori biologici, ha una variabilità limitata e non richiede costosi manufatti per essere utilizzato rispetto ai campionatori attivi; caratteristiche che si traducono in un complesso beneficio in termini di costi, tempi e standardizzazione del metodo.

I primi campionatori passivi impiegati nella matrice

acquosa e utilizzati per il monitoraggio di composti non polari (Fig. 1) furono sviluppati verso la metà degli anni ottanta e consistevano in contenitori di cellulosa rigenerata riempiti di *n*-esano (Delcourt J e Sandino JP, 2001). Successivamente, furono sperimentati diversi altri sistemi quali contenitori in LDPE (*Low Density PolyEthylene*) riempiti di trimetilpentano o polisilossano, o le SPMD (*Semi Permeable Membrane Devices*), costituite da un involucro di polietilene semipermeabile, in grado di lasciar permeare i composti d'interesse, ma di non far fuoriuscire la fase lipidica (trioleina) in essa contenuta.

In questo studio, è stata sperimentata l'efficacia nell'uso di campionatori passivi che utilizzano come fase adsorbente solamente polietilene a bassa densità (PE) (i cui primi utilizzi in campo ambientale possono essere fatti risalire all'inizio degli anni 2000) per la determinazione della fase disciolta e biodisponibile di contaminanti idrofobici nei sedimenti e nell'acqua. Il polietilene, infatti, è un buon candidato per questo

* guzzella@irsa.cnr.it

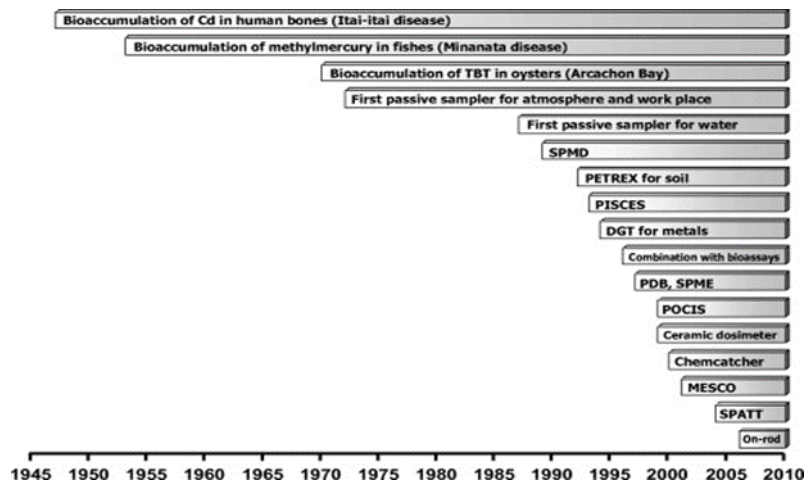


Fig. 1 - Tappe nello sviluppo dei campionatori passivi secondo Kot-Wasik et al., 2007

uso, dato il basso costo e la facilità di manipolazione.

Nel presente lavoro, che ha visto coinvolti il Centro di Ricerche per le Energie non Convenzionali - Istituto Eni-Donegani (Novara), il Massachusetts Institute of Technology (MIT, Boston, USA) e l'Istituto di Ricerca Sulle Acque del CNR (IRSA) (Unità Organizzativa di Brugherio), i PED (PED, *PolyEthylene Devices*) sono stati utilizzati per caratterizzare la forma mobile e biodisponibile di contaminanti idrofobici nei sedimenti, attraverso la loro quantificazione nell'acqua interstiziale (*pore water*), e nell'acqua. Successivamente viene descritto un esempio di applicazione della procedura, come caso di studio, esponendo i campionatori passivi in diverse stazioni del Lago Maggiore, il cui bacino è interessato da una contaminazione storica da 4,4'-DDT (*1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano*) e dai suoi metaboliti e/o prodotti di degradazione (DDD e DDE). Nello studio, sono stati comparati i dati di concentrazione nell'acqua sopra il sedimento e nell'acqua interstiziale, misurati nei campionatori esposti, con quelli stimati utilizzando modelli di ripartizione lineare e non lineare (Verginelli et al., 2013) a partire dalle concentrazioni nel sedimento e nell'acqua corrente. Sono state, inoltre, confrontate le concentrazioni misurate utilizzando molluschi bivalvi di *Unio Pictorum* esposti parallelamente ai campionatori passivi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il campionamento passivo è basato sul fenomeno della ripartizione tra la concentrazione di un dato analita in un comparto ambientale e quella della fase adsorbente utilizzata nel campionatore. La concentrazione del composto, inoltre, è espressa come media pesata durante un dato periodo di campionamento (*TWA, time-weighted average concentration*). In un mezzo acquoso, lo scambio tra il campionatore e l'acqua segue una cinetica di primo ordine in funzione del tempo di esposizione e dipende dalle costanti di adsorbimento e rilascio tra le due fasi. In particolare, all'equilibrio (Fig. 2.A) le concentrazioni nelle due fasi possono essere descritte attraverso la costante di ripartizione:

$$K_{pew} = \frac{C_{pew}}{C_w} \rightarrow C_w = \frac{C_{pew}}{K_{pew}} \quad (1)$$

dove K_{pew} è, nel presente caso, il coefficiente di ripartizione polietilene/acqua del composto d'interesse, C_{pew} (ng/Kg) è la concentrazione del composto nel polietilene all'equilibrio e C_w (ng/L) è la concentrazione del composto nel mezzo circostante. Alcuni coefficienti di ripartizione per composti quali PAH, PCB e pesticidi organoclorurati sono reperibili in letteratura (Adams et al. 2007; Fernandez et al. 2009a; Smedes

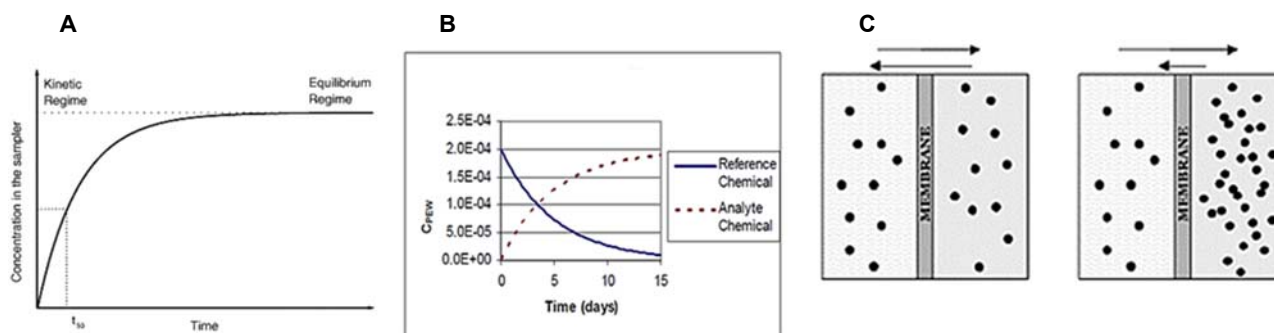


Fig. 2 - A) Curva di accumulo nella fase del campionatore passivo in funzione del tempo; (B) cinetica di scambio tra la fase del campionatore e il mezzo circostante per il PRC (linea continua, reference chemical = PRC) e composto target (linea tratteggiata, analyte chemical). C_{pew} = concentrazione dei composti nel polietilene; (C) Rappresentazione grafica dello stato di equilibrio (sx) e non-equilibrio (dx) in una fase di un campionatore passivo (qui rappresentato con una membrana di contenimento)

et al. 2009; Hale et al. 2010; Lohmann 2012, Choi et al. 2013); tuttavia, tali coefficienti sono soggetti a variazioni dovute a fattori ambientali sito specifici, quali presenza di *biofouling*, temperatura e salinità dell'acqua. Nel caso del polietilene esposto in acqua o nel sedimento, il raggiungimento della zona di equilibrio può richiedere settimane o mesi. Per la stima delle concentrazioni nel mezzo acquoso è, quindi, conveniente campionare nella zona di accumulo lineare della curva (Fig. 2.A, *kinetic regime*) e correggere successivamente il valore ottenuto, utilizzando uno o più PRC (*Performance Reference Compounds*) aggiunti al PE prima della sua esposizione. Il PRC è generalmente un composto con proprietà chimico-fisiche il più possibile simili a quelle dell'analita da misurare, così che le costanti di adsorbimento e rilascio si equivalgano (Fig. 2.B). Misurando la perdita di PRC a fine esposizione (e assumendola equivalente all'adsorbimento del composto dall'acqua circostante), è possibile, pertanto, ricavare le concentrazioni all'equilibrio, correggendo in questo modo fattori ambientali sito specifici, nel seguente modo:

$$PRC_{(frazione_persa)} = \frac{PRC_{i(iniziale)} - PRC_{i(fine_esposizione)}}{PRC_{i(iniziale)}} \quad (2)$$

$$C_{pe} = \frac{C_{pe}}{PRC_{(frazione_persa)}} \quad (3)$$

La concentrazione C_{pe} (all'equilibrio) può essere, infine, usata nell'equazione (1) per stimare la concentrazione nella fase acquosa.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile al monitoraggio della contaminazione da composti organici persistenti e bioaccumulabili ($K_{ow} > 5$) di acque dolci. Questo metodo potrebbe anche essere utilizzato come sistema di *early warning* durante interventi di bonifica di suoli o sedimenti per verificare l'eventuale rilascio di contaminanti nell'ecosistema acquatico.

4. CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Una volta ritirati i campionatori dopo l'esposizione questi vanno avvolti in un foglio di alluminio e trasportati sino al laboratorio. In laboratorio, i film di PE vanno recuperati dal campionatore, posti in contenitori a chiusura ermetica, preventivamente puliti con adeguato solvente e risciacquati in acqua distillata e conservati al riparo dalla luce e a una temperatura di 4-8°C. È necessario analizzare i campionatori preferibilmente entro 1 mese dal ritiro in campo.

5. INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Pulire accuratamente la superficie del polietilene per minimizzare l'estrazione di eventuale matrice interferente nella successiva analisi gascromatografica. La

purificazione dell'estratto secondo quanto indicato al punto 8.3 è sempre consigliata.

6. APPARECCHIATURE

- 6.1 Bilancia analitica;
- 6.2 Agitatore automatico;
- 6.3 Evaporatore in flusso d'azoto;
- 6.4 Gascromatografo;
- 6.5 Spettrometro di massa.

7. REATTIVI

- 7.1 Diclorometano per analisi microinquinanti in tracce;
- 7.2 Metanolo per analisi microinquinanti in tracce;
- 7.3 *n*-esano per analisi microinquinanti in tracce;
- 7.4 Acqua HPLC grade;
- 7.5 Toluene per analisi microinquinanti in tracce;
- 7.6 Florisil® attivato;
- 7.7 Standard analitici di DDX nativi (2,4'-DDE, 2,4'-DDD, 2,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT) e marcati ^{13}C ($[^{13}C_{12}]2,4'$ -DDE, $[^{13}C_{12}]2,4'$ -DDD, $[^{13}C_{12}]4,4'$ -DDD, $[^{13}C_{12}]2,4'$ -DDT, $[^{13}C_{12}]2,4'$ -DDT).

8 - METODO

8.1 Preparazione del polietilene e carico del PRC

Per le prove sperimentali è stato usato del polietilene a bassa densità (PE) in fogli di due diversi spessori: 10 µm fornito da Eni, e 25 µm di origine commerciale. L'uso di un PE più sottile diminuisce il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio durante la fase di carico, sebbene richieda maggiore cautela nella sua manipolazione, specialmente se usato nel monitoraggio di sedimenti. Il PE è stato inizialmente tagliato in strisce di dimensioni adatte al campionatore in uso e poi condizionato immergendolo durante la notte in diclorometano (DCM), metanolo, e infine acqua (cfr. 7.1, 7.2, 7.4).

Dopo il condizionamento, i fogli di PE sono stati caricati con il PRC. I fogli sono stati immersi in una soluzione metanolo:acqua 80:20 v/v (cfr. 7.2, 7.4) contenente il PRC ($[^{13}C_{12}]4,4'$ -DDE) (cfr. 7.7) e lasciati in agitazione per 7 giorni (shaker Edmund Bühler 7400 Tübingen-SM 25, Germania, 80 giri/min). La quantità di PRC da caricare sul PE è stata calcolata sulla base del valore di K_{pew} , K_{pe-wsc} (coefficiente di ripartizione PE/soluzione di carico per il PRC considerato) e della concentrazione stimata nel mezzo acquoso di esposizione (Booji et al., 2002), cercando di caricare il PE con una concentrazione di PRC pari a quella prevista all'equilibrio per il composto target nel PE esposto (N_m):

$$PRC_{tot} = N_m \frac{V_s + N \cdot m_m \cdot K_{pe-wsc}}{m_m \cdot K_{pe-wsc}} \quad (4)$$

dove:

PRC_{tot} (ng) = quantità di PRC necessaria da aggiungere al volume di soluzione caricante V_s (mL);

N_m (ng/g) = concentrazione iniziale stabilita di PRC nel polietilene;

N = numero di membrane di PE da caricare;

m_m (g) = massa di ogni membrana;

K_{pe-wsc} = coefficiente di ripartizione PE/soluzione di carico metanolo:acqua 80:20 v/v (stimato ~ 10).

Ipotizzando una concentrazione ambientale di composto target (DDx) nel mezzo acquoso di ~ 1 ng/L e considerando un $\text{Log } K_{pe-w}$ ~ 6 (vedi tab. 2), secondo l'equazione (1) la concentrazione nel PE all'equilibrio sarà di ~ $1 \cdot 10^6$ ng/L ~ 1000 ng/g.

Nel protocollo applicato, stabilendo quindi di ottenere concentrazione di carico nel PE (N_m) di 1000 ng/g, l'equazione (3) per singola membrana di massa 1 g diventa:

$$PRC_{tot} = 1000 \frac{2000 + 1 \cdot 1 \cdot 10}{1 \cdot 10} = 201000$$

Sarà quindi necessario aggiungere 201.000 ng al volume della soluzione di carico V_s (2.000 mL), pari a una concentrazione di $[^{13}\text{C}_{12}]$ -4,4'-DDE di 100,5 ng/mL

Terminato il carico, il PE è stato lavato per 3 volte, immergendolo in acqua (cfr. 7.4) allo scopo di eliminare il metanolo residuo, quindi asciugato e conservato al riparo dalla luce fino al momento dell'utilizzo.

8.2 Assemblaggio ed esposizione dei PED

Il PED assemblato per l'esposizione in campo è mostrato in Fig. 3. È costituito da una struttura metallica (detta *frame*, in acciaio o alluminio, di dimensioni 50 x 20 cm), all'interno della quale il film di PE tagliato in strisce (A) è stato fissato mediante rivetti. Al frame sono stati saldati due angolari in metallo (B) che ne facilitano l'inserimento nel sedimento. Nella parte superiore i frame sono stati muniti di attacco filettato per il montaggio di un'asta in metallo telescopica, utilizzata per il posizionamento nel sedimento. Sempre nella parte superiore è stato saldato un cilindro cavo (C) usato per l'ancoraggio del PED mediante corda. Prima del montaggio, per ogni foglio di PE è stata tagliata una striscia di 5 cm che, conservata in vial, è stata utilizzata per la verifica sperimentale della concentrazione di PRC caricato (cfr. eq. 3). Infine, il campionatore è stato avvolto in un foglio di alluminio e conservato al riparo dalla luce fino al trasporto al sito di campionamento.

Una volta in campo, i PED sono stati inseriti nel sedimento del sito scelto per l'esposizione mediante un'asta telescopica filettata e i campionatori sono stati

messi in sicurezza ancorandoli a punti saldi presenti sulla riva mediante corda in nylon. Al termine dell'esposizione, i PED sono stati recuperati con lo stesso protocollo di posizionamento, avvolti in fogli di alluminio e conservati in laboratorio a temperatura ambiente fino al momento del disassemblaggio.

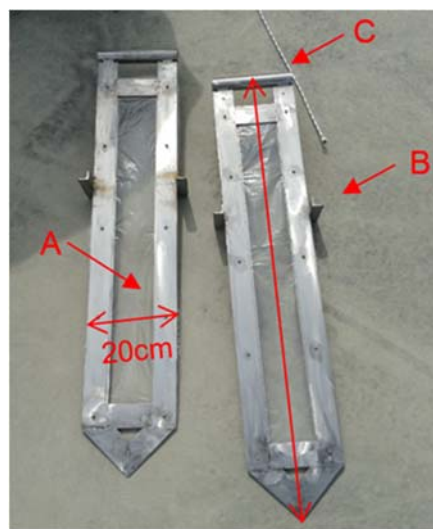


Fig. 3 - PED assemblati pronti per l'esposizione

8.3 Disassemblaggio e analisi dei PED

In laboratorio, i PED sono stati disassemblati e il film di PE preparato per l'estrazione. Allo scopo, è stato asportato dalla superficie l'eventuale biofilm o altro materiale adesivo alla superficie del PE, rimosso delicatamente prima con carta umida poi con carta imbevuta di *n*-esano. I fogli di PE sono stati poi sezionati in strisce, dividendo la parte a contatto con il sedimento da quella esposta in acqua al di sopra del sedimento. Le strisce così ottenute sono state poste in vial da 20 mL opportunamente etichettate.

I composti sono stati estratti con 20 mL di metanolo:diclorometano (1:9 v/v) aggiunti direttamente alla vial contenente la striscia di PE, insieme a 20 µL di soluzione di standard interno - INSTD - alla concentrazione di 500 µg L⁻¹, equivalenti a 10 ng per ciascun composto contenuto ($[^{13}\text{C}_{12}]$ 2,4'-DDE, $[^{13}\text{C}_{12}]$ 2,4'-DDD, $[^{13}\text{C}_{12}]$ 4,4'-DDD, $[^{13}\text{C}_{12}]$ 2,4'-DDT, $[^{13}\text{C}_{12}]$ 2,4'-DDT). Le vial sono state poi poste in agitazione per 24 ore su di un piano oscillante. Recuperato il solvente, ogni vial è stata lavata con altre 2 aliquote da 20 mL della stessa miscela metanolo:diclorometano.

I tre estratti sono stati combinati e ridotti a un volume di 1 mL. La purificazione è stata effettuata preparando una colonnina in vetro (1,5 x 15 cm) impaccata con 1 g di Florisil® attivato (650 °C per 8 ore). La colonnina è stata lavata prima con 10 mL di una soluzione *n*-esano-diclorometano 1:1, v/v, poi, caricato l'estratto, i composti sono stati eluiti raccogliendo nella vial altri 20 mL della stessa soluzione. L'eluato, infine, è stato ridotto a un volume di circa 0,1 mL sotto flusso di azoto e addizionato con 20 ng dello standard di iniezione 2,4,5,6-Tetracloro-meta-xilene per l'analisi mediante GC/MS (cfr. par. 8.4). Per permettere il calcolo sul PE estratto, le membrane sono state

lasciate essiccare all'aria e successivamente pesate. Ogni campione di estratto è stato analizzato insieme al suo solvente di estrazione come bianco (cfr. 7.1, 7.2).

È stata considerata sufficientemente precisa la correzione con il PRC se la differenza tra la concentrazione nel bianco e quella del campione esposto risultava superiore al 30%, indicando quindi una perdita significativa di PRC durante l'esposizione e quindi il buon funzionamento del campionatore. Per ogni campione esposto, la frazione di PRC persa è stata calcolata utilizzando l'equazione (2) e la concentrazione nel PE all'equilibrio l'equazione (3); infine le concentrazioni nel mezzo acquoso dei composti target sono state ricavate attraverso l'equazione (1).

8.4 Analisi gascromatografica

La separazione dei composti è stata ottenuta con un gascromatografo equipaggiato con iniettore PTV e colonna capillare Rxi-5MS, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek, Bellafonte, U.S.A.), accoppiato ad uno spettrometro di massa trappola ionica con acquisizione del segnale in modalità MS/MS. In caso di spettrometro di massa quadrupolare, l'acquisizione può essere effettuata anche in modalità SIM. Le condizioni strumentali sono riportate in Tab. 1 e un cromatogramma di esempio in Fig. 4.

8.5 Quantificazione

La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando i livelli di concentrazione 1, 2, 5, 50 e 80 ng/mL per i composti nativi (2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT). Le concentrazioni degli analiti nell'estratto sono state ottenute con il metodo dello standard interno (INSTD) riportato nell'equazione (5):

$$C_{analita}(\text{ng/g}) = \frac{\text{Area}_{composto} \cdot \text{ngINSTD}}{\text{Area}_{INSTD} \cdot \text{RR} \cdot \text{PesoPE}(\text{g})} \quad (5)$$

dove

$C_{analita}$ (ng/g) = concentrazione dell'analita nella membrana di PE;

$\text{Area}_{composto}$ = area del picco del composto considerato;

ng INSTD = quantità di INSTD aggiunta al campione; Area_{INSTD} = area del picco dello standard interno di riferimento associato al composto considerato;

Peso PE (g) = peso della membrana in PE estratta;

RR = fattore di risposta relativo medio tra il composto considerato e il suo INSTD, calcolato come di seguito:

$$\text{RR} = \frac{\text{Area}_{composto}}{\text{ng}_{composto}} \cdot \frac{\text{ngINSTD}}{\text{AreaINSTD}} \quad (6)$$

Tab. 1. Condizioni operative del gascromatografo e dello spettrometro di massa e parametri MS/MS e SIM per tutti i composti analizzati

GASCROMATOGRFO					
INIETTORE		FORNO			
Temperatura iniziale (°C)	90	Temperatura iniziale (°C)	50		
Tempo iniziale (s)	6	Tempo iniziale (min)	1,5		
Pressione iniziale (kPa)	131	Rampa 1 (°C/min)	30		
Pressione trasferimento (kPa)	160	Temperatura 1 (°C)	230		
Rampa (°C/s)	8	Tempo 1 (min)	0,1		
Temperatura finale (°C)	270	Rampa 2 (°C/min)	5		
Tempo finale (s)	120	Temperatura finale (°C)	270		
Tempo di splitless (s)	120	Tempo finale (min)	4		
Volume iniettato (µL)	1	He, flusso costante (mL/min)	1		
SPETTROMETRO DI MASSA					
Temperatura transfer line (°C)	270	Temperatura sorgente (°C)	250		
MS/MS				SIM	
COMPOSTO	PRECURSORE (M/Z)	ENERGIA DI FRAMMENTAZIONE (V)	FRAMMENTI (M/Z)	m/z target	QUALIFICATORI
2,4'-DDE	246	2,70	176+211	318	246-248-316
4,4'-DDE	246	2,70	176+211	246	248
2,4'-DDD	235	2,50	165+199+200	235	237
4,4'-DDD	235	2,50	165+199+200	235	237
2,4'-DDT	235	2,10	165+199+200	235	237
4,4'-DDT	235	2,10	165+199+200	235	237
[¹³ C ₁₂]2,4'-DDE	258	2,70	188+223	258	260
[¹³ C ₁₂]4,4'-DDE	258	2,70	177+211+212	243	245
[¹³ C ₁₂]2,4'-DDD	247	2,50	177+211+212	247	249
[¹³ C ₁₂]4,4'-DDD	247	2,50	177+211+212	247	249
[¹³ C ₁₂]2,4'-DDT	247	2,10	177+211+212	247	249
[¹³ C ₁₂]4,4'-DDT	247	2,10	177+211+212	247	249
2,4,5,6-tetracloro-meta-xilene	244	2.00	207+209	244	242-246

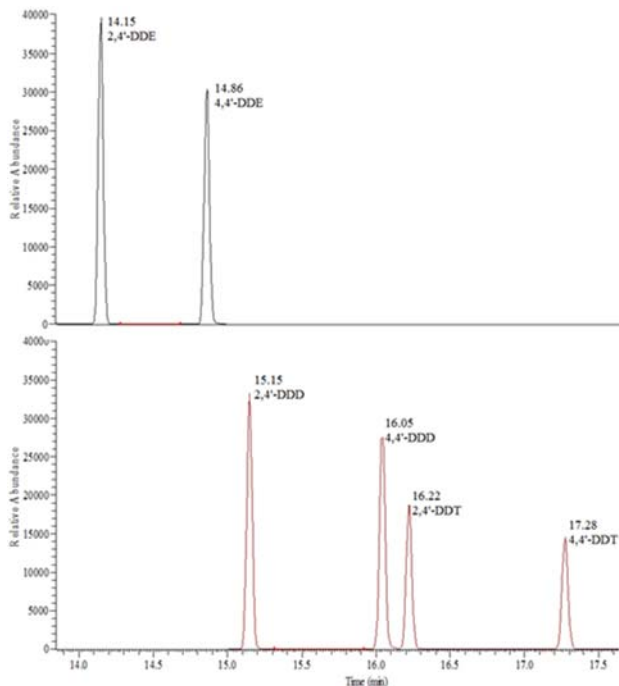


Fig. 4 - Separazione dei composti nelle condizioni cromatografiche indicate

Come INSTD, per ogni composto è stato utilizzato il corrispondente marcato $^{13}\text{C}_{12}$, tranne nel caso del 4,4'-DDE (essendo il corrispondente $^{13}\text{C}_{12}$ utilizzato come PRC) per il quale è stato utilizzato il $[^{13}\text{C}_{12}]2,4'$ -DDE. Utilizzando lo standard di iniezione 2,4,5,6-tetracloro-meta-xilene, sono stati, inoltre, calcolati i recuperi degli standard interni marcati (eq. 7), ripetendo l'analisi dei campioni il cui recupero medio fosse risultata $\leq 30\%$.

$$\%rec = \frac{Area\ INSTD \cdot ng\ injSTD}{Area\ injSTD \cdot RR \cdot ng\ INSTD} \cdot 100 \quad (7)$$

dove

% recupero = % di recupero dello INSTD ottenuto;

Area INSTD = area del picco dello standard interno;

ng injSTD = quantità di STD di iniezione aggiunta all'estratto (2,4,5,6-tetracloro-meta-xilene);

Area injSTD = area del picco dello standard di iniezione aggiunto all'estratto;

ng INSTD = quantità di INSTD aggiunta al campione;

RR = fattore di risposta relativo tra il injSTD e lo INSTD, calcolato come di seguito (8):

$$RR = \frac{Area\ INSTD}{ng\ INSTD} \cdot \frac{ng\ injSTD}{Area\ injSTD} \quad (8)$$

9 - VALIDAZIONE DEL METODO: UN CASO DI STUDIO

9.1 Esposizione dei PED in campo

La procedura è stata validata esponendo nel novembre 2011 i campionatori passivi in PE in quattro località nell'area del Lago Maggiore (Intra, Monvalle, Feriolo, Maccagno) (Fig. 5) interessata da una contaminazione storica da DDT e dai suoi metaboliti e/o prodotti di degradazione (DDD e DDE). Parallelamente all'esposizione dei campionatori passivi, negli stessi siti è stato effettuato il posizionamento di una gabbia contenente 10 molluschi bivalvi della specie *Unio Pictorum* da parte dell'Università del Piemonte Orientale.

Nel caso in cui i punti fossero accessibili da riva o con imbarcazione (profondità < 5 m), i PED sono stati posizionati mediante l'utilizzo di un'asta telescopica filettata direttamente dall'operatore. Si è quindi provveduto alla messa in sicurezza dei PED ancorandoli a dei punti saldi presenti sulla riva mediante corda in nylon. Nel caso in cui i punti di campionamento fossero a maggiore profondità (> 5 m), il posizionamento è stato effettuato manualmente da un sub e i PED ancorati alla superficie mediante corda. Una boa di sicurezza è stata posizionata in superficie per segnalarne la presenza. Per ogni sito è stato effettuato anche un bianco di "campo", consistente in un PED trasportato insieme al pool di esposizione, ma non utilizzato e riportato in laboratorio allo scopo di verificare eventuali interferenze nell'analisi dei contaminanti dovute al trasporto e alla manipolazione.

I PED preparati sono stati esposti su due linee parallele, inserendoli nel sedimento a profondità variabile tra i 10 e i 40 cm a seconda della compattezza del sedimento. Parallelamente, per ogni stazione, una gabbia contenente esemplari del mollusco bivalve *Unio pictorum*, precedentemente raccolti in una parte del lago considerata non interessata da contaminazione, è stata esposta a contatto del sedimento e in prossimità dei PED (Fig. 6), per valutarne il livello di bioaccumulo. Per ogni sito, infine, è stato campionato il sedimento superficiale mediante carotaggio manuale.

Dopo 30 giorni, al termine dell'esposizione, i PED e gli organismi sono stati recuperati con lo stesso protocollo di posizionamento. Per i PED è stato annotato lo stato di conservazione e la profondità di inserzione nel sedimento. Sono stati poi avvolti in fogli di alluminio e riportati nei laboratori Eni, dove sono stati disassemblati; i PE sono stati tagliati in strisce da 10 cm di lunghezza e successivamente suddivisi in tre sezioni da distribuire ai tre laboratori partecipanti. Nei rispettivi laboratori, infine, i fogli di PE sono stati conservati a temperatura ambiente fino al momento della loro estrazione.



Fig. 5 - Località di esposizione dei PED nel Lago Maggiore

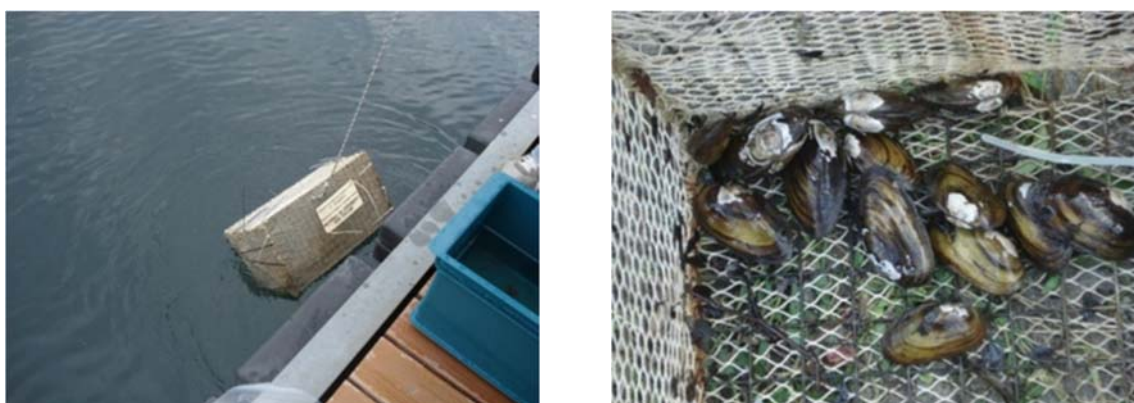


Fig. 6 - Posizionamento di una gabbia contenente 10 molluschi bivalvi (*Unio Pictorum*) in una stazione di esposizione dei PED

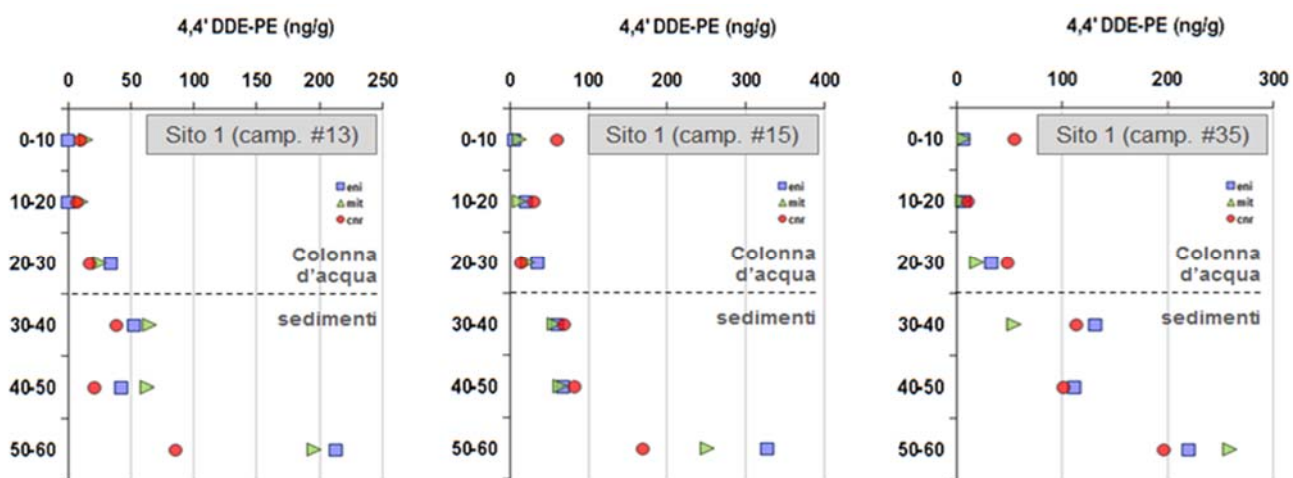


Fig. 7 - Confronto tra i profili verticali nella stazione di Intra per il 4,4'-DDE per i tre laboratori considerati. In blu, i risultati del laboratorio Eni, in rosso, quelli del laboratorio CNR-IRSA e in verde quelli del laboratorio del MIT. I campionatori 13 e 15 montavano membrane da 10 µm, mentre la numero 35 una membrana da 25 µm.

9.2 Estrazione e analisi dei campioni raccolti

Le concentrazioni dei DDX nelle membrane di PE all'equilibrio con l'acqua sopra al sedimento e con l'acqua interstiziale sono state determinate correggendo la concentrazione determinata nei PE con la frazione di PRC persa dai campionatori durante l'esposizione in campo (3). I risultati sono quindi stati convertiti in concentrazione disciolta utilizzando i rispettivi valori di K_{pew} (1) (Tab. 2).

Tab. 2 Valori di Log K_{pew} utilizzati in questo studio (Lohmann, 2012).

	Log K_{pew}		Log K_{pew}		Log K_{pew}
2,4'-DDE	5,2	2,4'-DDD	5,1	2,4'-DDT	5,7
4,4'-DDE	5,5	4,4'-DDD	5,0	4,4'-DDT	5,8

Dopo essere stati recuperati, i molluschi bivalvi sono stati trasportati nei laboratori Eni dove sono stati inizialmente immersi in acqua pulita per una giornata per depurarsi e successivamente composti in pool e liofilizzati per le successive analisi. Circa 1 g di campione liofilizzato è stato immerso in un bagno a ultrasuoni e sonicato per 20 minuti in *n*-esano:acetone (1:1 v/v). Dopo aver ripetuto due volte tale procedura, l'estratto è stato riunito, concentrato fino a 3 mL, poi trattato con acido solforico al fine di eliminare i lipidi e infine centrifugato. Il solvente surnatante è stato rimosso e scambiato con toluene riducendolo a piccolo volume. L'estratto finale è stato infine analizzato in GC-MS. Parallelamente, è stata effettuata la misura della percentuale lipidica mediante determinazione gravimetrica su un'aliquota estratta con la stessa procedura, ma separatamente.

I sedimenti lacustri sono stati liofilizzati e setacciati al fine di analizzare solo la frazione fine (< 2 mm) del sedimento stesso e successivamente suddivisi tra i tre laboratori partecipanti. Una quantità di campione pari a circa 1 g è stata estratta mediante Soxhlet a caldo e l'estratto è stato successivamente purificato tramite passaggio su colonnina di vetro contenente silice acida (H₂SO₄ 30% p/p) e Florisil® attivato. Il campione è stato eluito con una soluzione di *n*-esano/DCM 1:1 v/v e l'eluato è stato poi ridotto di volume e analizzato in GC-MS.

9.3 Risultati ottenuti dal confronto tra laboratori

Sono stati analizzati i composti target DDX nei PED esposti (2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT). Per quanto riguarda il profilo verticale ricavato dai PE esposti nella stazione di Intra, dove è stato possibile analizzare il tutto in replicato sia per le membrane da 10 che per quelle da 25 µm, sono stati osservati profili di concentrazione molto simili tra i diversi PED esposti alle stesse profondità e nella stessa stazione. Inoltre, considerando il composto a concentrazioni più elevate (4,4'-DDE, PE da 10 e 25 µm), i tre laboratori hanno

osservato un profilo comparabile, con una gradiente di concentrazione del 4,4'-DDE decrescente a partire dalle membrane esposta nel sedimento verso quelle esposte in acqua (Fig. 7)

Per valutare l'accuratezza dei dati di concentrazione ricavati dall'analisi dei PE, è stato effettuato un confronto con la concentrazione determinata negli organismi bivalvi, *Unio pictorum*, esposti parallelamente ai PED. Allo scopo, sono quindi state utilizzate le concentrazioni in acqua ricavate dall'analisi dei PE da 25 µm, esposti nelle quattro stazioni per predire la concentrazione negli organismi, nel modo seguente (9):

$$C_{Unio} \sim K_{ow} * f_{lipidi} * C \rightarrow C_{Unio} \sim K_{ow} * f_{lipidi} * C_{pe} / K_{pew}$$

dove

C_{Unio} (ng/g peso secco) = concentrazione nei tessuti di *Unio Pictorum*;

K_{ow} = coefficiente di ripartizione ottano/acqua relativo al singolo DDX;

f_{lipidi} (g di lipidi/g di peso secco) = frazione lipidica degli organismi;

C_w (ng/mL) = concentrazione dei DDX disciolta in acqua;

C_{pe} (ng/g PE) = concentrazione nei PE all'equilibrio con l'acqua;

K_{pew} (mL/g PE) = coefficiente di ripartizione polietilene/acqua.

Partendo, quindi, dalle concentrazioni di DDX determinate attraverso i PE nell'acqua sopra i sedimenti e nell'acqua interstiziale, sono state stimate le concentrazioni potenzialmente presenti negli organismi e queste sono state confrontate con i valori di DDX misurati nei tessuti di *Unio pictorum*. Nella Fig. 8 sono riportati i risultati di questo confronto per valori relativi al 4,4'-DDD (gli altri DDX nei bivalvi sono risultati in concentrazioni inferiori al LOD). I valori nei tessuti dei molluschi risultano accuratamente stimati dai campioni passivi a Intra e Feriolo, mentre sono in generale sovrastimati di un fattore 3 a Maccagno e sottostimati di un fattore 7 a Monvalle. Nel complesso, comunque, i PED sono stati in grado di predire le concentrazioni nei tessuti dei molluschi nel range considerato. Fattori ambientali presenti nei due siti di Monvalle e Maccagno possono avere influenzato l'assorbimento di questi composti nei molluschi bivalvi.

Un'ulteriore elaborazione è stata condotta per valutare l'applicabilità di questi sistemi di campionamento passivo nello stimare la frazione biodisponibile di contaminante nei sedimenti. Dal momento che il destino e il trasporto dei contaminanti nel sedimento sono regolati da specifici processi chimico-fisici, le concentrazioni di DDX nell'acqua interstiziale misurate nelle membrane PE esposte nel sedimento sono state confrontate con quelle ricavate dall'applicazione di due modelli matematici di ripartizione.

Il primo è un modello classico lineare di ripartizione (equilibrium partitioning - EqP) che ha la forma della seguente equazione (10):

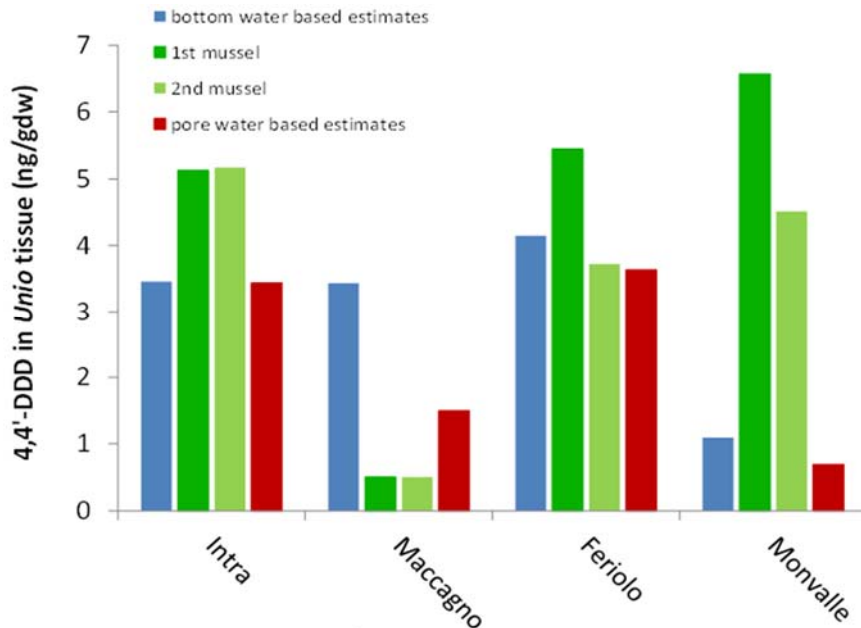


Fig. 8 - Comparazione tra le concentrazioni di 4,4'-DDD rilevate in *Unio pictorum* e quelle stimate dal valore di concentrazione nell'acqua interstiziale (bottom water: concentrazione stimata dal valore di 4,4'-DDD nell'acqua al di sopra dell'interfaccia sedimento/acqua; 1st e 2nd mussel: due pool di molluschi utilizzati per le analisi; pore water based estimates: concentrazione stimata dal valore di 4,4'-DDD nell'acqua interstiziale).

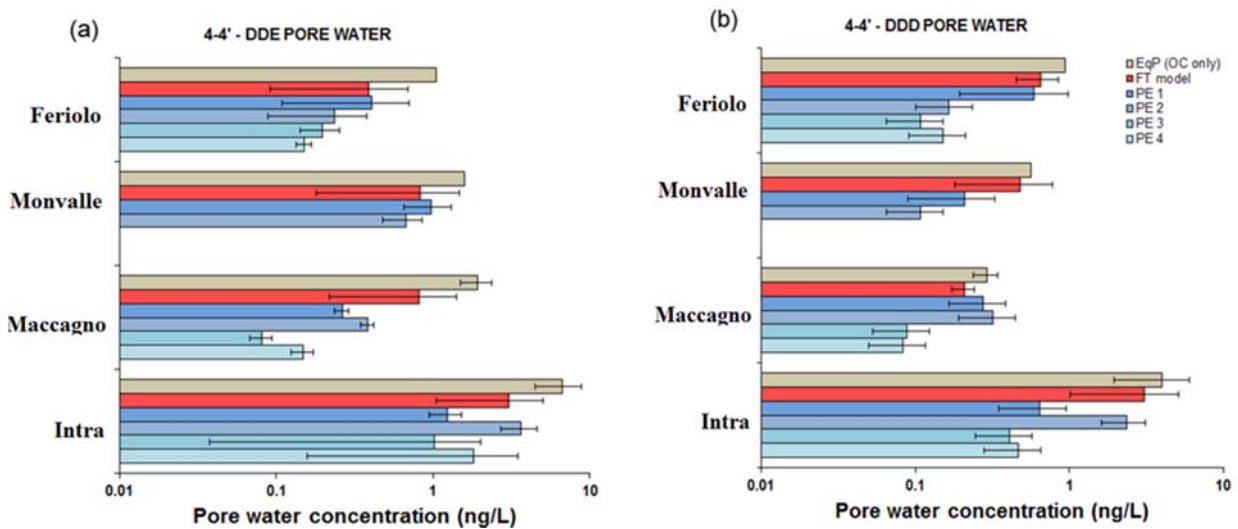


Fig. 9 - Concentrazioni di 4,4'-DDE e 4,4'-DDD nell'acqua interstiziale (a, b) calcolate con il modello di ripartizione classico lineare EqP (grigio) e non lineare FT (rosso) (Verginelli et al., 2013) e nei PE esposti nelle quattro stazioni considerate (gradazioni di blu).

$$C_s = K_{oc} * f_{oc} * C_{pw} \quad (10)$$

dove

C_s = concentrazione nel sedimento;

K_{oc} = coefficiente di ripartizione carbonio organico/acqua relativo al singolo DDX;

f_{oc} = frazione di carbonio organico del sedimento;

C_{pw} = concentrazione nei PE nell'acqua interstiziale.

Questo modello, però, è ormai ritenuto generalmente una stima semplificata dei fenomeni di ripartizione dei contaminanti nel sedimento, a causa dell'eterogeneità della materia organica presente nel sedimento stesso (Huang et al., 2003). Il sedimento, infatti, non conterrebbe solo carbonio organico di origi-

ne vegetale o animale, ma anche il black carbon (carbonio prodotto a seguito della combustione di biomasse e combustibili fossili che può accumularsi nei sedimenti) a varie concentrazioni che potrebbe favorire fenomeni di adsorbimento di tipo non-lineare (Huang et al., 2003). Per questo motivo, è stato considerato un secondo modello di ripartizione che tiene conto della presenza sia del carbonio organico classico che del black carbon (Accardi-Dey et al., 2002) (Fluctuation Theorems - FT) (11):

$$C_s = K_{oc} * f_{oc} * C_{pw} + K_{bc} * f_{bc} * C_{pw}^n \quad (11)$$

dove

C_s = concentrazione nel sedimento;

K_{oc} = coefficiente di ripartizione carbonio organico/acqua relativo al singolo DDx;

f_{oc} = frazione di carbonio organico del sedimento;

I risultati ottenuti dall'applicazione dei modelli lineare (EqP) e non lineare (FT) a partire dalle concentrazioni di DDx determinate nei sedimenti campionati sono stati confrontati con quelli determinati sui campioni di PE esposti nelle quattro stazioni del Lago Maggiore (Verginelli et al., 2013). Come da risultati attesi, i grafici in Fig. 9 mostrano che le concentrazioni di 4,4'-DDE e 4,4'-DDD nell'acqua interstiziale misurate nelle membrane PE esposte nel sedimento sono generalmente inferiori a quelle determinate applicando il modello classico lineare, ma in buon accordo con quanto previsto applicando il modello di ripartizione non lineare che tiene conto della presenza sia di carbonio organico che di black carbon.

10. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di verificare l'efficacia dei sistemi di campionamento passivo, costituiti da polietilene e caricati con il PRC, nel valutare la biodisponibilità nei sedimenti e nell'acqua appena sopra il sedimento di inquinanti organici, quali DDT ed i suoi prodotti di degradazione. La loro applicabilità in campo è risultata ottimale ed è stato anche verificato come la membrana di PE dello spessore di 10 μm , rispetto a quella da 25 μm , sia in grado di equilibrarsi più velocemente con l'ambiente circostante e di conservare una quantità di PRC ancora misurabile dopo 30 giorni di esposizione. I campionatori passivi in PE utilizzati sono risultati, infine, economicamente vantaggiosi e di utilizzo meno complesso rispetto ai metodi classici di monitoraggio. Per questo motivo, è corretto ritenere che i campionatori passivi in PE potrebbero essere utilizzati come sistemi di early warning durante interventi di bonifica di suoli o sedimenti per verificare l'eventuale rilascio di contaminanti nell'ambiente acquatico.

BIBLIOGRAFIA

- Accardi-Dey, A., Gschwend, P.M. Reinterpreting literature sorption data considering both absorption into organic carbon and adsorption onto black carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37: 99-106, 2003.
- Adams, R.G., R. Lohmann, L.A. Fernandez, J.K. MacFarlane, and P.M. Gschwend. Polyethylene devices: Passive samplers for measuring dissolved hydrophobic organic compounds in aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1317-1323, 2007.
- Booij, K., Smedes F., van Weerlee, E.M. Spiking of performance reference compounds in low-density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* 46: 1157-1161, 2002.
- Choi, Y., Y.M. Cho, and R.G. Luthy. Polyethylene-Water Partitioning Coefficients for Parent and Alkylated-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls. *Environ. Sci. Technol.* 47: 6943-6950, 2013.
- Delcourt, J., e Sandino, J.P. Performance assessment of a passive sampler in industrial atmospheres. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 49-54, 2001.
- Fernandez, L.A.; J.K. MacFarlane, A.P. Tcaciuc, and P.M. Gschwend. Measurement of freely dissolved PAH concentrations in sediment beds using passive sampling with low-density polyethylene strips. *Environ. Sci. Technol.*, 43: 1430-1436, 2009a.
- Kot-Wasik A., Zabiegala, B., Urbanowicz, M., Dominiak, E., Wasik, A., Namiesnik J. Advances in passive sampling in environmental studies, *Analytica Chimica Acta* 602: 141-163, 2007.
- Hale, S.E., T.J. Martin, K.U. Goss, H.P.H. Arp, and D. Werner. Partitioning of organochlorine pesticides from water to polyethylene samplers. *Environ. Poll.* 158: 2511-2517, 2010.
- Huang, W., Peng, P., Yu, Z., Fu, J. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry* 18: 955-972, 2003.
- Lohmann, R. Critical review of low-density polyethylene's partitioning and diffusion coefficients for trace organic contaminants and implications for its use as a passive sampler. *Environ Sci Technol* 46: 606-618, 2012.
- Smedes, F., R.W. Geertsma, T. van der Sande, and K. Booij. Polymer-water partition coefficients of hydrophobic compounds for passive sampling application of cosolvent models for validation. *Environ. Sci. Technol.* 43: 7047-7054, 2009.
- Verginelli, I., Baciocchi, R., Bianchi, E., Borrelli, R., Cesti, P., Pantini, S., Zaninetta, L. Modeling contaminant's flux from bed sediments to the water column: comparison with pore-water and passive sampler field data. Proceedings of the 12th FKZ/TNO Conference on Groundwater - Soil - System and Water Resource Management (Aquaconsoil 2013).

Analisi di fitofarmaci con sistemi automatizzati per la definizione dello stato chimico di qualità dei corpi idrici

a cura di

Fiorenzo Pozzoni e Licia Guzzella (*), *Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Brugherio, MB*

RIASSUNTO

La valutazione della contaminazione delle acque superficiali e sotterranee in particolare per la verifica degli standard di qualità (SQA) previsti dalla Direttiva 39/2013/EU e dal D.M. 56/2009 (rispettando i criteri indicati dalla Direttiva 2009/90/CE), necessita di un approccio analitico complesso. Nel presente lavoro si è indagata la possibilità di applicare una metodica di estrazione SPE automatizzata a elevati volumi (5 L) di acque superficiali per la determinazione di alcuni dei fitofarmaci più diffusi nell'ambiente e di alcuni loro metaboliti. Il metodo proposto consente di raggiungere i criteri minimi di prestazione richiesti dalla normativa per 9 fitofarmaci e 3 metaboliti per quanto riguarda il limite di quantificazione, inferiore al 30% dello Standard di Qualità, e relativamente all'incertezza di misura, inferiore al 50% del valore dello Standard di Qualità; le percentuali di recupero sono adeguate per 10 composti su 12. Con la metodica proposta i campioni di acque superficiali lacustri e fluviali indagati non richiedono alcun trattamento preventivo e vengono estratti insieme al particolato con una procedura di filtrazione ed estrazione completamente automatizzata.

SUMMARY

The assessment of groundwater and surficial water pollution requires elaborate analytical approaches to fulfil Quality Standard (SQA) provided for Italian and European guidelines (2013/39/UE, D.M. 56/2009). In this work we contemplated applying an automated SPE extraction method to high volumes (5 L) of surficial water to detect some of the most widespread herbicides and metabolites. The suggested method allows to satisfy the lowest standards for 9 herbicides and 3 metabolites as required by guidelines; it means that the limit of quantification (LOQ) has to be less than 30% of SQA and expanded uncertainty less than 50% of SQA. Recoveries are suitable for 10 compounds out of 12. Surficial samples collected from lake and rivers were extracted together with particulate without any previous treatment by means of an automated system of filtration and extraction.

INTRODUZIONE

Le tecniche di estrazione di fitofarmaci devono essere in grado di rispondere alle normative emanate in merito alla definizione dello stato chimico delle acque interne superficiali. In particolare, il Decreto Legislativo n. 260 del 8/11/2010, che recepisce la Direttiva 200/60/CE e modifica il Decreto Legislativo del 3/4/2006, definisce i criteri tecnici per la classificazione dei corpi idrici. La Direttiva 2013/39/UE introduce nuovi standard di qualità per 12 delle sostanze prioritarie indicate nelle precedenti normative. Per quanto riguarda lo stato chimico, le sostanze sono suddivise tra quelle appartenenti all'elenco delle sostanze prioritarie e quelle non vi appartengono. Le prime sono ulteriormente classificate in: sostanze prioritarie (P), sostanze pericolose prioritarie (PP) e rimanenti (E). Per ciascuno dei fitofarmaci appartenenti all'elenco di priorità si definiscono degli standard di qualità, definiti come SQA-MA (standard di qualità ambientale-media annua) e SQA-CMA (standard di qualità ambientale-concentrazione massima ammissibile), espressi in $\mu\text{g/L}$. Per le sostanze non appartenenti all'elenco di priorità, viene definito solamente un valore di SQA-MA, mentre per i pesticidi (e relativi metaboliti) non presenti in quest'ultima tabella si applica un valore cautelativo standard pari a $0,1 \mu\text{g/L}$ per ciascun composto.

I criteri minimi di prestazione per tutti i metodi di

analisi applicati sono basati su un'incertezza di misura del 50% o inferiore stimata ad un livello pari al valore degli Standard di Qualità Ambientale e su un limite di quantificazione uguale o inferiore al 30% dello SQA previsto.

In generale, le prestazioni di un metodo analitico possono essere incrementate:

- migliorando la sensibilità e selettività del metodo strumentale utilizzato per la quantificazione degli analiti;
- iniettando un volume di estratto maggiore;
- aumentando il volume totale di acqua estratta e diminuendo il volume finale dell'estratto cioè modificando i fattori di concentrazione.

In relazione a quest'ultimo punto, gli studi che fanno uso di elevati volumi di acqua, sono principalmente orientati alla ricerca dei composti presenti in corpi idrici e deposizioni atmosferiche (es. nevi) in aree remote. I primi lavori (Foster et al., 1993) fanno uso ancora dell'estrazione liquido-liquido, raggiungendo un limite di rilevabilità pari a $0,28 \text{ ng/L}$ per il Lindano, partendo da 120 L d'acqua. In seguito sono stati utilizzati metodi che si basano sulla estrazione in fase solida (SPE) che richiede tempi di esecuzione più contenuti, minor consumo di solventi e maggior semplicità nella manipolazione del campione, soprattutto per l'estrazione di volumi considerevoli. Alegria

* guzzella@irsa.cnr.it

e Shaw (1999) utilizzano una colonna SPE riempita con XAD-2 (10 g in una colonna di vetro) per estrarre fino a 76 L di acqua di mare con limiti di quantificazione che si spingono fino a 0,1 ng/L per il Trifluralin.

L'introduzione degli *Speedisk*, cartucce aventi la fase stazionaria disposta su una maggior superficie di assorbimento, ha consentito di aumentare il flusso del campione, raggiungendo i 200 mL/min. Con questa metodica, Usenko et al. (2005) hanno estratto fino a 50 L di campione d'acqua superficiale e di falda campionate in aree remote per la ricerca di diverse categorie di composti organici semivolatili (SOCs). Questi autori hanno riportato un recupero medio totale per i 75 composti indagati del 99% con una RSD del 4%. Tra i fitofarmaci ricercati i recuperi vanno da un minimo del 63% per la deisopropil-atrazina ad un massimo del 115% per il malathion. I limiti di rilevazione si spingono fino a valori dell'ordine dei 2 µg/L per l'endosulfan.

Le tecniche che prevedono una fase di estrazione e di eluizione con trasferimento automatizzato dell'estratto all'analizzatore partono da volumi di campione relativamente ridotti, tipicamente 10-50 mL, che devono comunque essere prima filtrati (Kuster et al., 2008; Köck et al., 2010). In queste condizioni si possono raggiungere, per quasi tutti i fitofarmaci, gli LOQ previsti dalla normativa, ma il dato analitico ottenuto è relativo alla sola componente disciolta, mentre l'applicazione degli standard di qualità ai fitofarmaci prevede che essi siano espressi come concentrazioni totali nell'intero campione d'acqua, quindi si riferi-

scono alla fase disciolta più quella adsorbita al particolato.

Obiettivo del presente lavoro è quello di proporre una metodologia analitica che consenta di raggiungere rapporti di concentrazione (fino a 10.000X) più elevati di quelli abituali (tipicamente 1000X) con una procedura completamente automatizzata e senza previo trattamento del campione.

1. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è stato messo a punto per la determinazione quantitativa di 9 erbicidi e 3 metaboliti in campioni di acque superficiali ai livelli di concentrazione previsti dalla normativa europea. L'estrazione dei campioni è effettuata mediante un sistema automatizzato SPE che utilizza cartucce discoidali contenenti la fase adsorbente. L'utilizzo di prefiltri in fibra di vetro consente l'estrazione di acque superficiali senza preventiva filtrazione nel rispetto della normativa che prevede la determinazione dei contaminanti sul campione in toto. L'impiego di elevati volumi (5 L) di campione consente di raggiungere fattori di concentrazione molto elevati (10000X).

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La selezione dei fitofarmaci da sottoporre alle prove di recupero è stata effettuata incrociando i risultati del Gruppo di lavoro ANPA - ARPA - APPA FITOFARMACI (Franchi, 2011) con quelli delle Agenzie per l'Am-

Tab. 1 Fitofarmaci selezionati per la sperimentazione

Sostanza attiva	Rif. Tab. Decreto n.260/10 ^a	CIRCA 2008 ^b	Indice Priorità Intrinseco ^c	Situazione ^d	SQA-MA ^e	SQA-CMA ^f
Alaclor	1/A - P	4	3,2	revocato	0,3	0,7
Atrazina	1/A - P	5	4	revocato	0,6	2,0
Atrazina, desetil		5				metabolita
Atrazina, desisopropil		4				metabolita
Metalaxil		5	4,5	autorizzato	0,1	
Metolaclor		5	4	revocato	0,1	
Metribuzin		5	5	autorizzato	0,1	
Oxadiazon		5	1,2	autorizzato	0,1	
Propanil		4	2,4	revocato	0,1	
Simazina	1/A - P	5	4,8	revocato	1	4
Terbutilazina	1/B	5	3	autor. 2011	0,5	
Terbutilazina, desetil		5				metabolita

a) Sono riportati nelle tabelle A o B del Decreto n. 260/10, P=sostanza prioritaria

b) Indice CIRCA per l'anno 2008

c) Indice elaborato sulla base di un punteggio di distribuzione ambientale, di un fattore di utilizzo e di un fattore di degradazione

d) Situazione rispetto alla possibilità di utilizzo al 30/9/2010

e) Standard di qualità ambientale espresso come valore medio annuo

f) Standard di qualità ambientale espresso come concentrazione massima ammissibile

biente del bacino del Po relativi ai dati di monitoraggio recenti (2009) e con la possibilità di sviluppare una metodica di estrazione e analisi comune ai fitofarmaci selezionati.

Il gruppo di lavoro "ANPA - ARPA - APPA FITOFARMACI" (Gruppo AAAF) è stato costituito per raggiungere diversi obiettivi nell'ambito delle problematiche ambientali legate all'utilizzo di prodotti fitosanitari in agricoltura. Tra questi obiettivi vi è quello di predisporre delle linee guida per la pianificazione delle attività di monitoraggio al fine di razionalizzare le indagini, selezionando le sostanze attive che possano rappresentare un rischio maggiore per la contaminazione delle acque. A tal fine ha definito delle liste di priorità che si basano su indici elaborati con differenti criteri che prendono in considerazione: le quantità applicate (sulla base dei dati di utilizzo o di vendita), il potenziale di contaminazione (sulla base delle proprietà chemiodinamiche), la frequenza di rilevamento (sulla base dei dati di monitoraggio), le proprietà ecotossicologiche e tossicologiche, la capacità di originare metaboliti rilevanti. I valori ottenuti dalla somma di cinque indicatori vengono raggruppati in 5 classi di rischio (CIRCA) in cui al valore CIRCA 1 viene attribuita la descrizione "non contaminante" e al valore 5 la descrizione "contaminante". La selezione dei fitofarmaci di interesse per questo studio è partita dalle sostanze aventi per il periodo 2000-2008 un valore CIRCA elevato.

Tra questi composti sono stati selezionati quelli che, dai dati di monitoraggio del 2009 realizzati su acque superficiali dall'ARPA Lombardia e dall'ARPA Emilia Romagna, sono stati rilevati più frequentemente.

Infine, sulla base del lavoro di Pasti et al. (2007), sono stati scelti i composti che possono essere concentrati da una matrice acquosa con un'unica procedura di estrazione in fase solida (SPE) ed analizzati con tecnica GC-MS (Tabella 1). Tra questi figurano alcuni principi attivi che non sono più in commercio da anni, ma che, essendo largamente presenti nelle acque, sono ancora compresi nei piani di monitoraggio.

3. INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La matrice degli estratti di acque superficiali, lacustri o fluviali, ha una composizione sicuramente complessa soprattutto in considerazione del fatto che il metodo proposto prevede un fattore di concentrazione 10.000X. Ciò produce un effetto matrice per molti dei composti studiati che può determinare una sovrastima del recupero atteso, se calcolato sulla base di una retta di taratura ottenuta da riferimenti preparati in solventi puri. La costruzione di una retta di taratura a partire da riferimenti aggiunti all'estratto finale dei campioni consente di migliorare questo problema di sovrastima.

La velocità di filtrazione può essere anche più elevata rispetto a quella proposta (25-30 mL/min) applicando un vuoto più spinto; ciò accorcia i tempi di estrazione, ma diminuisce il recupero degli analiti.

4. CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni per l'analisi degli erbicidi devono essere prelevati in modo da ottenere un campione omogeneo e rappresentativo del corpo idrico. Il metodo proposto ha richiesto per la sua validazione il campionamento di elevati volumi di campione, pari a circa 50L per punto di campionamento, nel caso di analisi di routine invece è sufficiente il campionamento di 10 L di campione, per permettere una eventuale replica dell'estrazione. I campioni dovrebbero essere prelevati da pontili e trasportati in bottiglie di vetro da 10 L lavate con acetone in laboratorio e risciacquate con campione durante il prelievo; i campioni vanno conservati a 4°C in cella frigorifera sino al momento dell'analisi che in ogni caso deve essere inferiore a una settimana.

5. APPARECCHIATURE

- 5.1 Sistema di estrazione SPE automatizzato;
- 5.2 Gascromatografo;
- 5.3 Spettrometro di massa a singolo quadrupolo;
- 5.4 Dischi con fase adsorbente DVB (stirene divinilbenzene; $\varnothing = 47$ mm);
- 5.5 Filtri in fibra di vetro di porosità nominale 1 e 5 μm ($\varnothing = 80$ mm);
- 5.6 Evaporatore in flusso d'azoto;
- 5.7 Pompa da vuoto;
- 5.8 Evaporatore rotante;

6. REATTIVI

- 6.1 Alaclor, atrazina, atrazina desetil, atrazina desopropil, metolaclor, metribuzin, metalaxil, oxadiazon, propanil, simazina, terbutilazina, terbutilazina desetil con grado di purezza maggiore del 97%;
- 6.2 Soluzioni di riferimento dei singoli composti in metanolo (100 mg/L);
- 6.3 Soluzione di riferimento multicomponente in etilacetato (2,5-10mg/L);
- 6.4 Soluzioni di riferimento per retta di taratura (5-2000 $\mu\text{g/L}$) ottenute diluendo opportunamente la soluzione (6.3) in etilacetato;
- 6.5 Soluzioni di riferimento per retta di taratura (5-2000 $\mu\text{g/L}$) ottenute diluendo opportunamente la soluzione (6.3) negli estratti di campioni di acque superficiali;
- 6.6 Solventi per "analisi di residui";
- 6.7 Acqua ultrapura (resistività > 18 M Ω *cm);
- 6.8 Terra di diatomee;

7 - METODO

7.1 Estrazione e concentrazione

È stato utilizzato un sistema di estrazione automatica (5.1) in fase solida che utilizza cartucce SPE (5.4). Sono stati estratti campioni di acque superficiali di volume pari a 5 L ciascuno. Il sistema prevede la possibilità di applicazione di prefiltri in fibra di vetro (5.5); per i campioni più ricchi di particolato sono stati utilizzati due filtri di porosità decrescente. Ciò consente di estrarre elevati volumi d'acqua senza previa filtrazione del campione. Il processo di estrazione è automatizzato e programmabile; la metodica utilizzata ha previsto le seguenti fasi:

- condizionamento delle cartucce con metanolo e acqua MilliQ;
- filtrazione sotto vuoto ad una pressione che ha generato un flusso intorno ai 25/30 mL/min; lavaggio con acqua MilliQ;
- asciugatura con flusso di aria di 10 min;
- estrazione con 4 successive aliquote di solvente: tre costituite da metanolo e una finale con metanolo/diclorometano (1:1 v/v). I solventi, prima di eluire la cartuccia, vengono spruzzati dall'apparato nel contenitore del campione assicurando l'estrazione anche del particolato che fosse rimasto adeso al vetro.

L'intera procedura ha richiesto un tempo complessivo di circa 4 ore. Le quantità di solventi utilizzate nelle diverse fasi sono programmate dal sistema.

Si ottiene un volume finale di eluato di circa 50 mL (metanolo, diclorometano e acqua) che è stato concentrato su evaporatore rotante (5.8) fino ad un volume di circa 1,5 mL, costituito prevalentemente da acqua. L'acqua è stata eliminata con passaggio su colonnine contenenti terra di diatomee (6.8) ed eluizione con 15 mL di etilacetato successivamente concentrato sotto flusso d'azoto (5.6) fino ad un volume finale di 0,5 mL. Il fattore di concentrazione risulta quindi essere pari a 10.000X v/v.

7.2 Estrazione e concentrazione

Le condizioni operative in GC-MS utilizzate per la validazione del metodo sono elencate nella Tabella 2. Lo spettrometro di massa ha operato in modalità EI. L'identificazione dei composti e dei relativi tempi

Tab. 2 Condizioni gascromatografiche per l'analisi dei fitofarmaci

Colonna		
Restek RTX™ -440, 30 mx 0,25 mm x 0,25 µm		
Iniettore split/splitless		
Temperatura	°C	280
Tempo di splitless	sec	60
Flow split	mL/min	10
Volume iniettato	µL	2
Forno		
Temperatura iniziale	°C	50
Tempo iniziale	min	3
Rampa 1	°C/min	25
Temperatura	°C	150
Rampa 2	°C/min	5
Temperatura	°C	280
CARRIER GAS		
He, flusso costante	mL/min	1,0
SPETTROMETRO DI MASSA		
Temperatura transfer line	°C	280
Temperatura sorgente	°C	250
Ionizzazione elettronica	eV	70

Tab. 3 Tempi di ritenzione relativi alla Terbutilazina e ioni utilizzati per la quantificazione

Nome composto	Sigla	Tempo di ritenzione relativo alla TER	Ioni acquisiti in modalità SIM
Atrazina, desisopropil	DIA	0,88	145,158,173
Atrazina, desetil	DEA	0,89	172,174,187
Terbutilazina, desetil	DET	0,90	186,188,201
Simazina	SIMA	0,97	186,201,203
Atrazina	ATRA	0,98	202,215
Terbutilazina	TER	1	214,216,229
Alaclor	ALA	1,13	160,188,238
Propanil	PROP	1,14	161,163
Metribuzin	METR	1,15	144,198
Metalaxil	META	1,15	146,206,220,234
Metolaclo	METO	1,22	162,238,240
Oxadiazon	OXA	1,45	175,177,258

di ritenzione è stata effettuata in full scan, mentre la calibrazione e la quantificazione dei fitofarmaci è avvenuta in modalità SIM (Selected Ion Monitoring), utilizzando gli ioni caratteristici elencati in Tabella 3. L'iniezione del campione è stata effettuata con auto-campionatore. Il segnale è stato acquisito e rielaborato tramite software dedicato.

8 - QUANTIFICAZIONE

La quantificazione degli analiti negli estratti è stata condotta per mezzo di una retta di taratura con standard esterno. Sono stati utilizzati 5 riferimenti in etilacetato aventi un intervallo di concentrazione variabile in funzione della risposta strumentale (Tabella 4). Le rette di regressione, calcolate tramite programma Excel e i relativi R² dimostrano che l'intervallo dinamico lineare è ampio con un fattore 100 tra le concentrazioni agli estremi della retta. Si è operato per la quantificazione a concentrazioni che ricadessero all'interno del cosiddetto intervallo analitico o di lavoro costituito dalla porzione di retta compresa tra i quattro punti superiori.

Tab. 4 Parametri di regressione della retta $y=ax + b$; R² coefficiente di correlazione

	Intervallo di conc. (µg/L)	a	b	R ²
DIA	10-1000	260	-398	1
DEA	5-500	1077	106	0,9999
DET	5-500	1438	2457	1
SIMA	10-1000	1531	9570	0,9997
ATRA	10-1000	1034	7888	0,9998
TER	5-500	2430	7952	0,9999
ALA	10-1000	1036	7138	0,9998
PROP	10-1000	766	-3123	0,9999
METR	20-2000	1076	18842	0,9998
META	20-2000	1295	21570	0,9999
METO	10-1000	3058	41613	0,9998
OXA	5-500	1469	10362	0,9993

9 - VALIDAZIONE DEL METODO

Per la validazione del metodo proposto sono stati prelevati campioni di acque di lago (Como, comune di Cernobbio) e di fiume (Ticino emissario, comune di Golasecca (VA); Po, comune di Chignolo Po (PV) località Le Gabbiane a monte dell'immissione del fiume Lambro). I primi due siti sono stati scelti in quanto sono acque poco contaminate dagli analiti oggetto dell'indagine, mentre il terzo rappresenta una matrice con un livello di contaminazione più elevato e un maggior carico di particolato.

9.1 Determinazione LOD e LOQ

In letteratura vengono proposte differenti modalità di

determinazione di questi limiti (Taylor, 1989; Mac-Dougall e Crummett, 1980). Il LOD può essere determinato in funzione del rapporto segnale/rumore e definito come quella concentrazione che produce un segnale pari a 3-5 volte il rumore di fondo. In questo caso è stato stimato sulla base di un rapporto pari a 5. Il valore ottenuto fornisce un'indicazione delle possibilità strumentali di analisi.

Un altro metodo di determinazione del LOD si basa sulla stima dell'incertezza del bianco determinata per mezzo della retta di taratura. La relazione utilizzata è la seguente:

$$y_{LOD} = b + 3 S_{y/x}$$

dove y_{LOD} è il segnale generato dalla concentrazione limite x_{LOD} , b è l'intercetta sull'asse delle y , $S_{y/x}$ è l'errore standard della retta. Da questa deriva che la concentrazione limite è data da:

$$x_{LOD} = 3 S_{y/x}/a$$

dove a è il coefficiente angolare della retta. Anche il limite così determinato, è prevalentemente funzione delle caratteristiche strumentali del metodo.

Per ottenere un limite di rivelabilità che fosse anche funzione della matrice oggetto di questa indagine, l'acqua campionata sul Ticino è stata passata su colonnine C18 per trattenere i fitofarmaci presenti, mentre il campione filtrato è stato recuperato. Sette campioni così ottenuti, privi quindi di fitofarmaci, sono stati trattati secondo la procedura prima descritta, gli estratti finali sono stati fortificati con i fitofarmaci a concentrazioni superiori (2-5 volte) al limite stimato e quindi analizzati. Il valore trovato, MDL, è stato calcolato moltiplicando per 3,14 il valore dello scarto tipo dei risultati ottenuti, dove 3,14 è ricavato dalla distribuzione t per $7-1=6$ gradi di libertà con un livello di confidenza del 99% (American Public Health Association, 1992). Il limite così ricavato è stato generalmente superiore a quelli ricavati da stime puramente strumentali ed è stato utilizzato per calcolare il limite di quantificazione degli analiti nel campione (Tab. 5).

Anche per il limite di quantificazione esistono diverse definizioni basate sulla misura dell'incertezza dei bianchi, sulla retta di taratura o sulla determinazione del MDL. Convenzionalmente si assume come accettabile un LOQ il cui valore sia pari a circa 3 volte il limite di rivelabilità. Abbiamo, quindi, assunto come concentrazione minima per la quantificazione un valore pari a 3 volte il limite definito come MDL, che costituisce la concentrazione rilevabile più elevata tra quelle che si ottengono con i diversi metodi.

Il limite di quantificazione così ottenuto risponde ampiamente per tutti i composti al requisito minimo di essere uguale o inferiore al 30% dello Standard di Qualità Ambientale richiesto per quel dato composto. L'US-EPA (1979) suggerisce che un limite di rivelabilità del metodo che va da 1/10 a 1/5 del valore del campione è auspicabile e sufficiente. Considerando il valore più restrittivo dell'intervallo proposto (1/10 equivalente, quindi, ad un LOQ pari a 10 LOD), solo il Metribuzin non risponderebbe a questo requisito.

Tab. 5 Limiti di rivelabilità, limite di quantificazione e 30% dello standard di qualità ambientale

	LOD (S/N=5)	LOD (taratura)	MDL	MDL ^a	LOQ (3*MDL)	30 % di SOA
	µg/L(estratto)	µg/L(estratto)	µg/L(estratto)	ng/L (campione)	ng/L (campione)	ng/L
DIA	24	6	34	3	10	30
DEA	17	7	20	2	6	30
DET	8	4	9	1	3	30
SIMA	7	26	32	3	10	300
ATRA	16	16	27	3	8	200
TER	4	5	10	1	3	150
ALA	21	17	14	1	4	90
PROP	13	11	26	3	8	30
METR	6	40	43	4	13	30
META	6	35	33	3	10	30
METO	3	19	19	2	6	30
OXA	5	19	20	2	6	30

a) Limite di rivelazione nel campione per un fattore di concentrazione 10000X

Tab. 6 Prove di ripetibilità. SD: scarto tipo (espresso come µg/L nell'estratto); CV: coefficiente di variazione (%). *: non determinato

	Ripetibilità analisi		Ripetibilità del metodo			
	(n=6)		Como (n=7)		Ticino (n=6)	
	SD	CV	SD	CV	SD	CV
DIA	*	*	5,6	18,9	11,4	10,7
DEA	5,5	6,7	24,3	30,0	32,0	24,4
DET	13,1	5,6	51,0	14,1	13,4	2,9
SIMA	5,5	11,9	26,4	15,4	25,0	11,8
ATRA	2,3	3,4	37,3	18,8	7,8	3,2
TER	10,8	4,2	22,1	14,3	9,1	5,8
ALA	7,4	5,5	35,0	23,2	15,2	8,4
PROP	23,3	8,3	46,8	24,1	9,5	4,7
METR	2,1	16,6	8,7	18,3	32,2	24,2
META	8,6	7,8	70,6	17,3	43,7	10,7
METO	4,6	6,7	6,5	4,6	3,1	2,4
OXA	4,6	6,7	15,1	33,0	5,5	8,5

9.2 Accuratezza e precisione

E' stata determinata la ripetibilità del metodo sia su campioni fortificati che su campioni naturali nei quali fossero presenti gli analiti in concentrazioni quantificabili. In Tabella 6 sono riportati i risultati ottenuti da prove di ripetibilità (analisi ripetute dello stesso estratto del Lago di Como fortificato con una soluzione di riferimento multicomponente) e di ripetibilità del metodo su matrici acquose diverse a partire da 5 L di acque superficiali (Lago di Como, fiume Ticino) arricchite con 2 mL di una soluzione di riferimento in metanolo, contenente i composti indagati. Le concentrazioni nel campione arricchito variavano da un minimo di 8 ng/L per la Terbutilazina ad un massimo di 32 ng/L per la DIA. Il volume finale dell'estratto è

stato di 0,5 mL in etilacetato

I risultati riportati sono calcolati a partire dai valori di concentrazione che hanno superato il test statistico di Grubbs che consente di valutare se il risultato sia aberrante e vada quindi scartato, o debba essere incluso nel calcolo della media (Appendice 1). Il test non è stato applicato ai campioni del fiume Po, perché poco significativo, in quanto condotto su 2 sole prove.

I risultati che non hanno superato questo test sono stati rispettivamente il 7,5 % per la ripetibilità dell'analisi, il 7% dei campioni di Como e l'8% dei campioni del Ticino. I risultati evidenziano che anche l'analisi ripetuta su matrice genera una discreta dispersione dalla media, non trascurabile rispetto alla dispersione del metodo nel suo complesso. I risultati relati-

vi alle analisi dei campioni Ticino e Como forniscono una stima di quella che viene definita la ripetibilità intermedia poiché determinata usando lo stesso metodo, da parte dello stesso operatore sulla stessa matrice, ma in tempi differenti, in quanto l'intero processo di estrazione e analisi per i campioni prelevati dallo stesso sito si è sviluppato su un arco di tempo di circa 2-3 settimane. Il coefficiente di variazione massimo è del 33% (OXA) e minimo del 4,6% (METO) per il lago di Como mentre per il fiume Ticino il massimo è circa del 24% (DEA) e il minimo inferiore al 3% (METO).

La presenza di alcuni contaminanti nei campioni naturali ha consentito di determinare anche la ripetibilità del metodo ai livelli di concentrazione che si riscontrano nelle acque superficiali lombarde. In Tabella 7 sono riportate anche alcune stime di concentrazione benché inferiori ai limiti di quantificazione definiti in precedenza, per fornire comunque una indicazione della loro dispersione dalla media. I coef-

ficienti di variazione più elevati si sono riscontrati per DEA e Oxidiazon in linea, soprattutto per la DEA, con quanto ottenuto sui campioni arricchiti. Per gli altri composti, la metodica utilizzata ha generato degli scostamenti dai valori medi sostanzialmente contenuti anche in considerazione del fattore di concentrazione (10.000X) e delle concentrazioni ambientali abbondantemente inferiori ai limiti di legge. L'unica eccezione è data dal Propanil nel Po con una concentrazione di 133 ng/L che trova una spiegazione nel fatto che circa un mese prima del campionamento un decreto aveva autorizzato il suo uso di emergenza nelle risaie (Il Punto Coldiretti, 2012). Per questo composto e altri, quali la Terbutilazina, presenti a concentrazioni più elevate, l'acquisizione del segnale in modalità full scan ha permesso di confermare la loro presenza attraverso il confronto con le librerie di spettri presenti nel software.

I risultati delle prove di recupero sono rappresentati graficamente nella Figura 1 e in Tabella 8. I valori

Tab. 7 Prove di ripetibilità su campioni naturali. Media (ng/L nel campione); SD: scarto tipo (ng/L); CV: coefficiente di variazione (%). *: valori inferiori al limite di quantificazione

	Como (n=3)			Ticino (n=3)			Po (n=4)		
	Media	SD	CV (%)	Media	SD	CV (%)	Media	SD	CV (%)
DIA	< 3			< 3			< 3		
DEA	< 2			2,4*	0,6	22,6	6,1	1,3	20,6
DET	8,8	1,1	12,1	17,1	2,4	14,1	22,9	1,0	4,5
SIMA	< 3			< 3			3,6*	0,2	5,4
ATRA	< 3			< 3			7,0	0,5	7,8
TER	8,1	1,1	13,5	6,7	0,7	9,7	12,7	0,3	2,4
ALA	< 1			< 1			< 1		
PROP	< 3			< 3			133,6	8,3	6,2
METR	< 4			< 4			< 4		
META	< 3			< 3			< 3		
METO	2,2*	0,4	18,7	< 2			5,9	0,6	10,7
OXA	< 2			< 2			35,6	8,3	23,2

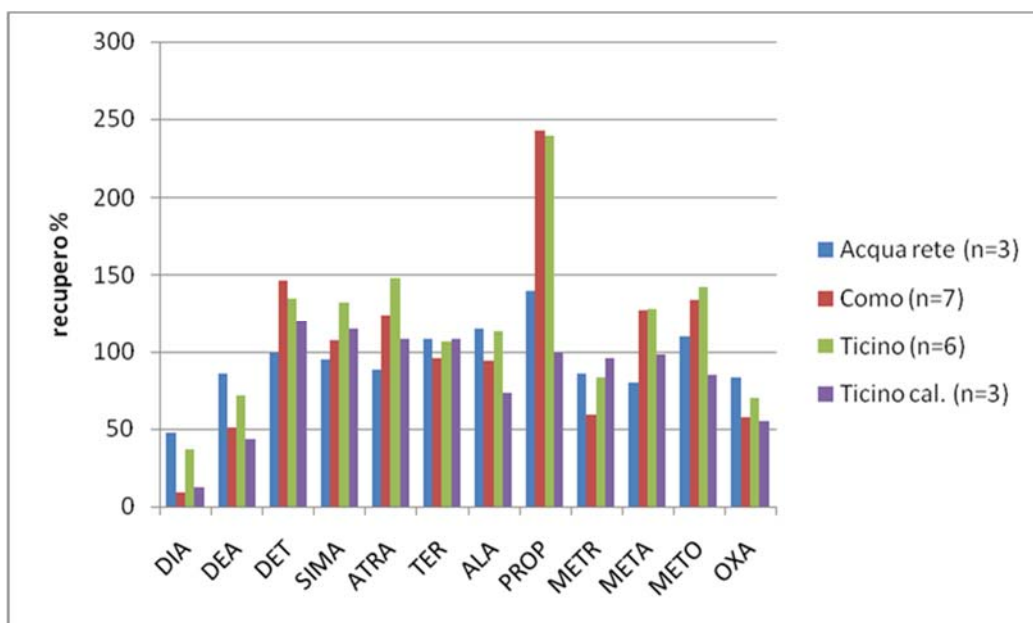


Fig. 1 Risultati delle prove di recupero espressi in %. n: numero delle prove

riportati sono stati determinati, stimando anche la concentrazione naturale dei fitofarmaci per cui il recupero è stato calcolato con la seguente formula:

$$\%R = \frac{C_b}{C_b + C_a} \cdot 100$$

dove:

C_b: concentrazione nel campione arricchito;

C_b: concentrazione nel campione tal quale;

C_a: concentrazione aggiunta.

Le prove forniscono risultati molto variabili; l'applicazione del test t (Appendice 2) di accettabilità dello scostamento del valore medio calcolato dal valore atteso per un livello di significatività del 5% indica che a partire dall'acqua di rete il recupero di 11 composti su 12 è statisticamente accettabile.

Tab. 8 Risultati prove di recupero(%). In grassetto i valori che hanno superato il test t

	Acqua rete (n=3)	Como (n=7)	Ticino (n=6)	Ticino cal. (n=3) ^a
DIA	47	9	36	12
DEA	86	51	71	43
DET	99	146	135	120
SIMA	95	107	133	115
ATRA	88	124	148	108
TER	108	96	106	108
ALA	115	94	113	74
PROP	139	242	239	99
METR	86	59	83	95
META	80	127	128	98
METO	109	133	142	85
OXA	83	57	70	55

Per quanto riguarda le acque superficiali, solo 2 e, rispettivamente, 3 analiti nella matrice Ticino e Como hanno superato il test t. È evidente, quindi, un effetto matrice per molti composti che produce una sovrastima anche notevole (vedi Propanil) del recupero atteso. La costruzione di una retta di taratura a partire da standard aggiunti all'estratto finale dei campioni del Ticino e la successiva quantificazione di 3 campioni fortificati del Ticino ha notevolmente migliorato i risultati dei recuperi con 10 analiti su 12 che hanno superato il test statistico. Rimangono molto bassi i recuperi dei due metaboliti dell'Atrazina, soprattutto della DIA, composto piuttosto apolare rispetto al quale quindi la metodica impiegata è decisamente inefficiente.

9.3 Incertezza di misura

Un metodo di calcolo dell'incertezza di misura che si basa dell'utilizzo dell'equazione di Horwitz/

Thompson permette di prevedere lo scarto di riproducibilità del metodo sulla base delle concentrazioni dell'analita (Horwitz, 1997; Horwitz e Albert, 2006) indipendentemente dalle caratteristiche fisico-chimiche, dalla natura della matrice e dal metodo utilizzato (Appendice 3). Nella Tabella 9 sono riportati i dati medi relativi alle prove di recupero nelle tre acque superficiali indagate (Lago di Como, fiumi Ticino e Po), i relativi scarti di ripetibilità intermedia (scarto tipo) e gli scarti di riproducibilità teorici secondo l'equazione di Thompson.

Il rapporto S_r/S_R (HorRat) è considerato un indice attendibile del grado di precisione del metodo impiegato, anche se in letteratura sono utilizzati limiti di accettabilità di questo rapporto piuttosto variabili. Quello più restrittivo prevede che l'indice HorRat debba essere compreso tra 0,5 e 0,66, mentre il più ampio considera accettabili valori minori di 2 (AOAC International, 2003).

Tab. 9 S_r : scarto tipo di ripetibilità; S_R : scarto tipo di riproducibilità; HorRat: rapporto S_r/S_R ; U: incertezza estesa

	media (ng/L)	S_r	$S_{R(TH)}$	Hor-Rat	U (ng/L)
DIA	6,8	0,9	1,5	0,57	3,0
DEA	12,0	3,8	2,6	1,46	5,3
DET	39,5	2,9	8,7	0,33	17,4
SIMA	19,4	2,0	4,3	0,47	8,6
ATRA	21,7	1,8	4,8	0,38	9,5
TER	16,1	1,8	3,5	0,50	7,1
ALA	15,3	2,4	3,4	0,70	6,7
PROP	19,7	2,8	4,3	0,65	8,7
METR	9,3	1,9	2,0	0,92	4,1
META	38,6	5,0	8,5	0,59	17,0
METO	13,4	0,8	2,9	0,27	5,9
OXA	5,6	1,0	1,2	0,84	2,5

Utilizzando i limiti definiti nell'Appendice 3 e rappresentati nella Figura 2, si può osservare che per quasi tutti i composti, esclusa la DEA, il rapporto calcolato rientra nei limiti previsti. Se si verifica questa condizione, lo scarto tipo di riproducibilità può essere assunto come incertezza tipo composta (u). L'incertezza estesa (U) è data da $k \cdot u$, dove il fattore di copertura k ha valore 2 per un intervallo di fiducia di circa il 95%. Quindi $U=2 \cdot SR$.

Utilizzando l'equazione di Thompson, si ricava uno scarto tipo percentuale del 22% e quindi una incertezza estesa pari al 44% del risultato della misura. Tra i requisiti minimi di prestazione per i metodi di analisi previsti nel D.L. del 10/12/2010, n.219, è richiesta un'incertezza estesa associata al risultato di misura non superiore al 50% dello standard di qualità determinata alle concentrazioni dello standard di qualità. Avendo ottenuto i valori di ripetibilità (Tabella10) a concentrazioni vicine o inferiori a quelle del 30% dello standard di qualità previsto per i

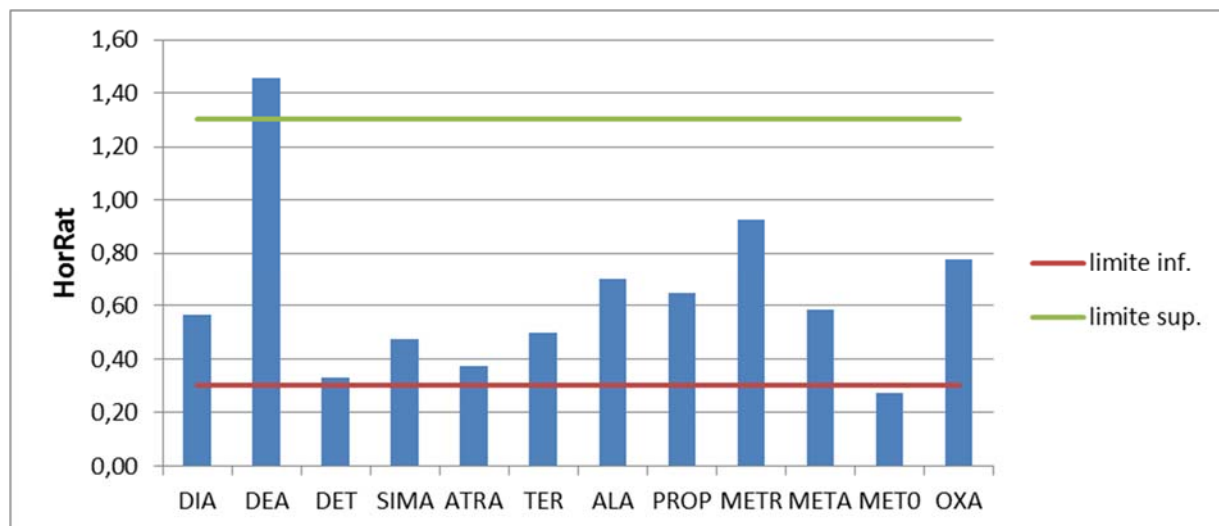


Fig. 2 Limiti di accettabilità del rapporto HorRat

Tab. 10 S_r : scarto tipo di ripetibilità; S_R : scarto tipo di riproducibilità; HorRat: rapporto S_r/S_R ; [C]: media \pm incertezza

	media (ng/L)	S_r	$S_{R(Th)}$	Hor- Rat	[C] (ng/L)
DIA	< 3				
DEA	6,1	1,3	1,3	0,94	6,1 \pm 2,7
DET	22,9	1,0	5,0	0,20	22,9 \pm 10,1
SIMA	3,6	0,2	0,8	0,25	3,6 \pm 1,6
ATRA	7,0	0,5	1,5	0,35	7,0 \pm 3,1
TER	12,7	0,3	2,8	0,11	12,7 \pm 5,6
ALA	< 1				
PROP	133,6	8,3	29,4	0,28	133,6 \pm 58,8
METR	< 4				
META	< 3				
METO	5,9	0,6	1,3	0,49	5,9 \pm 2,6
OXA	35,6	8,3	7,8	1,06	35,6 \pm 15,7

diversi analiti, il metodo utilizzato ha dimostrato di poter rispondere a questo requisito.

In Tabella 10 sono riportate le medie delle misure ($n=4$) e le relative incertezze determinate sui campioni del fiume Po, non fortificati e concentrati 10000X v/v. I valori ottenuti non sono stati corretti per il fattore di recupero.

CONCLUSIONI

Il metodo proposto consente di raggiungere i criteri minimi di prestazione richiesti (supplemento ordinario n° 31/L alla Gazzetta Ufficiale di 7/2/2011) per 9 fitofarmaci e 3 metaboliti per quanto riguarda il limite di quantificazione, inferiore al 30% dello Standard di Qualità e l'incertezza di misura, inferiore al 50% del valore dello Standard di Qualità; le percentuali di recupero sono adeguate per 10 composti su 12. Con la metodica proposta i campioni di acque superficiali lacustri e fluviali indagati non richiedono alcun trattamento preventivo e vengono estratti in-

sieme al particolato con una procedura di filtrazione ed estrazione completamente automatizzata.

La procedura di estrazione di elevati volumi (5 L) richiede comunque tempi notevoli; la velocità di flusso del campione attraverso le cartucce può essere notevolmente superiore a quella utilizzata nella metodica, ma prove preventive hanno dimostrato che i recuperi risultano in questo caso inadeguati, per cui l'intera fase automatizzata di estrazione richiede tempi dell'ordine delle 4 ore per 5 L di acqua. A fattori di concentrazione così elevati (10000X) le interferenze da matrice aumentano, generando un rischio di sovrastima della concentrazione dell'analita, come si deduce da alcuni dei risultati delle prove di recupero. La quantificazione per mezzo di una retta di taratura realizzata con la matrice può costituire un metodo per diminuire questo rischio. Si potrebbero, inoltre, verificare le possibilità di adottare ulteriori modalità di purificazione del campione.

Ringraziamenti

Il presente progetto è stato realizzato nel 2011- 2012 grazie al supporto finanziario dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) di Roma, essendo una delle attività previste dal Contratto di ricerca per studi specialistici relativi a metodologie di classificazione, controllo, monitoraggio delle acque interne e degli aspetti connessi alla gestione delle risorse idriche.

BIBLIOGRAFIA

ALEGRIA H.A., SHAW T.J.(1999): "Rain Deposition of Pesticides in Coastal Waters of the South Atlantic Bight", Environ. Sci. Technol., 33, 850-856.

American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, 1992.

AOAC International (2003). Guidelines for single laboratory validation of chemical method for dietary supplements and botanicals. AOAC International, Maryland

FOSTER G.D., GATES P.M., FOREMAN W.T., MCKENZIE S.W., RINELLA F.A.(1993): "Determination of dissolved-phase pesticides in surface water from the Yakima River Basin, Washington, using the Goulden large-sample extractor and gas chromatography/mass spectrometry", Environ. Sci. Technol., 27, 1911-1917.

FRANCHI A. url: www.arpat.toscana.it/eventi/2011/...di...le...di.../intervento-franchi.pdf

HORWITZ W. (1997): "A Heuristic Derivation of the Horwitz Curve", Anal. Chem., 69 (4), 789-790.

HORWITZ W., ALBERT R. (2006): "The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision", Journal of AOAC International, 89 (4), 1095-1109.

Il Punto Coldiretti, settimanale di informazione per le imprese del sistema agroalimentare; n. 23, 12-18 giugno 2012, p. 4.

KÖCK M., FARRÉ M., MARTINEZ E., GAJDA-SCHRANTZ K., GINEBRED A., NAVARRO A., LÓPEZ DE ALDA M., BARCELÓ D.(2010): "Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain)", J. of Hydrology, 383, 73-82.

KUSTER M., LÓPEZ DE ALDA M.J.L., BARATA C., RALDUA D., BARCELÓ D. (2008): "Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro River delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Talanta, 75 (2), 390-401.

MACDOUGALL D., CRUMMETT W.B.(1980): "Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry", Anal. Chem., 52, 2242-49.

PASTI L., NAVA E., MORELLI M., BIGNAMI S., DONDI F. (2007): "GC/MS analysis of pesticides in the Ferrara area (Italy) surface water: a chemometric study", Annali di Chimica, 97, 359-372.

TAYLOR J.K. (1989): "Quality assurance of chemical measurements", sixth edition, Lewis Publishers, ISBN 0-87371-097-5, page 79.

U.S. Environmental Protection Agency (1979): "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes", Publ. 600/4-79-020, rev. March 1983. Environmental Monitoring and Support Lab., U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

USENKO S., HAGEMAN K.J., SCHEMEDDING D.W., WILSON G.R., SIMONICH S.L.(2005): "Trace Analysis of Semivolatile Organic Compounds in Large Volume Samples of Snow, Lake Water, and Groundwater", Environ. Sci. Technol., 39, 6006-6015.

Appendice 1 - Test di Grubbs

L'ipotesi nulla è: il valore sospetto non è da escludere dalle elaborazioni dei dati.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale il valore sospetto è da escludere. Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza T come rapporto tra la differenza della misura e della media e la deviazione standard.

La media e la deviazione standard sono calcolate considerando tutti i valori.

Si confronta il valore di T calcolato con il valore tabulato (per n dati e per 1- α). Se esso è inferiore al valore tabulato l'ipotesi nulla è accettabile e quindi il valore deve essere accettato, in caso contrario scartato.

Appendice 2 - Confronto di un valore medio con un valore vero

Per valutare se il valore medio ottenuto da un'analisi di un campione a concentrazione nota differisce dal valore atteso solo a causa di fluttuazioni statistiche, o se invece esistono errori sistematici, si può applicare il test t. L'ipotesi nulla è: la differenza tra i due valori non è significativa, cioè è dovuta solo a fluttuazioni statistiche. Quindi

$$\mu = \bar{x}$$

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale

$$\mu \neq \bar{x}$$

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza t:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \times \sqrt{n}$$

Dove:

\bar{x} : valore medio calcolato ; μ : valore atteso ; s: deviazione standard; n: numero delle prove

Si confronta il valore di t calcolato con il valore tabulato (per 1- $\alpha/2$ e n-1 gradi di libertà). I valori di t sono riportati in tabelle. Se t calcolato è minore di t tabulato l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che il valore medio è diverso dal valore atteso.

Appendice 3 - Determinazione dell'incertezza di misura per mezzo dell'equazione di Horwitz/Thompson

Si basa su una relazione empirica ricavata da moltissime misure ottenute da esercizi di confronto interlaboratorio. L'equazione fornisce una stima dello variazione percentuale di riproducibilità in funzione esclusivamente della concentrazione:

$$CV\% = 2 C^{-0.1505}$$

Dove

C: concentrazione espressa come frazione di massa. (Es: se la concentrazione è 1 mg/kg, $C=10^{-6}$)

Dal valore di CV% si può ricavare lo scarto tipo di riproducibilità:

$$S_R = CV\% \times c / 100$$

Dove

C: concentrazione

Per concentrazioni inferiori a 0,1 mg/L ($C=10^{-7}$), l'equazione di Horwitz fornisce degli scarti troppo elevati e si introduce la correzione di Thompson:

$$S_R = 0,22 \times c$$

Il rapporto tra lo scarto tipo di riproducibilità (risultati interlaboratorio) ottenuto sperimentalmente e quello calcolato con le equazioni sopra descritte, conosciuto anche come indice HorRat, fornisce un'indicazione del grado di precisione del metodo utilizzato. Si considera accettabile uno scarto tipo di riproducibilità sperimentale tale per cui il rapporto sia compreso tra 0,5 e 2.

Per la ripetibilità (risultati intralaboratorio), si considerano accettabili valori minimi che siano la metà del limite inferiore ($0,5 \times 0,5 = 0,3$) e valori massimi che siano i due terzi del limite superiore ($0,67 \times 2 = 1,3$). Quindi possono essere considerati accettabili rapporti tra scarti tipo di ripetibilità (S_r) sperimentali e scarti tipo di riproducibilità calcolati compresi tra 0,3 e 1,3.

Nel caso in cui si realizzino queste condizioni, si può assumere come incertezza composta del metodo il valore S_R ottenuto con le equazioni proposte e come incertezza estesa il prodotto $2 \times S_R$.

Determinazione di tensioattivi anionici e non ionici in matrici acquose mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e rivelazione UV-ELSD

a cura di

Mariani D., Trimigno E., Pallotti G., *Innovhub-SSI, Milano*

Polesello S. (*), *Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Brugherio, MB*

Capri S., *Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Monterotondo St., RM*

RIASSUNTO

Il metodo descrive una procedura analitica per determinare tensioattivi anionici e non ionici in campioni acquosi mediante HPLC accoppiata a rivelatori UV ed evaporativi previo arricchimento degli analiti mediante estrazione liquido-liquido (LLE) o in fase solida (SPE). L'utilizzo di un sistema di rivelatori in serie consente di determinare gli analiti in miscele anche complesse.

SUMMARY

An analytical procedure for the determination of anionic and non-ionic surfactants in aqueous samples by HPLC with UV and evaporative detectors is described. The procedure is based on a Liquid-Liquid (LLE) or a Solid Phase Extraction (SPE). A system of serially connected detectors allows to determine the analytes even in complex mixtures.

INTRODUZIONE

I tensioattivi sono composti organici costituiti da un gruppo funzionale lipofilo, solitamente una catena idrocarburica (R) e da gruppi funzionali idrofili. Sono solubili in acqua e in grado di abbassare la tensione superficiale di un liquido (tensione all'interfaccia tra due liquidi o tra un solido e un liquido). In base alle caratteristiche del gruppo idrofilo i tensioattivi si suddividono in anionici (carica negativa), non ionici (senza carica), cationici (carica positiva), anfoteri (carica sia positiva che negativa), e in sottoclassi per affinità chimica nell'ambito della stessa classe (Fig. 1).

L'identificazione e la quantificazione di tensioattivi commerciali in campioni ambientali è operazione complessa in quanto si tratta di composti con caratteristiche chimiche diverse, presenti sotto forma di miscele di decine-centinaia di omologhi, oligomeri e isomeri. Ciò ha determinato, sia a livello nazionale che internazionale, la diffusione di metodi ufficiali per la determinazione routinaria di tensioattivi basati su tecniche colorimetriche o potenziometriche, precedute da estrazioni più o meno selettive. Detti metodi, oltre ad essere poco affidabili, specie nel caso di matrici complesse, non forniscono alcuna informazione sulla presenza di più tensioattivi appartenenti alla stessa classe, né sulla composizione di omologhi od oligomeri o sulla lunghezza della catena idrofobica.

Questa limitazione dei metodi ufficiali è riconosciuta anche a livello normativo dall'Unione Europea che, nel Regolamento n. 648/2004 relativo ai detersivi (CE 648/2004), afferma che per i tensioattivi che non reagiscono ai metodi colorimetrici "o qualora

sembri più opportuno per ragioni di efficienza e di esattezza si applicano adeguate analisi strumentali specifiche, quali la cromatografia in fase liquida ad alta pressione (HPLC) o la cromatografia in fase gassosa (GC)".

Essendo notoriamente i metodi chimici citati (MBAS per i tensioattivi anionici e BIAS per i non ionici) potenzialmente interferiti da molte sostanze e non essendo possibile, con accettabile approssimazione, essere a conoscenza delle eventuali interferenze presenti nelle matrici da analizzare, la procedura tramite HPLC risulta più affidabile ed efficace in caso di determinazione di tensioattivi in matrice dalla composizione poco nota e più completa in quanto in grado di evidenziare la presenza contemporanea di molteplici specie di tensioattivi (non solo anionici e non ionici) qualora presenti nella matrice analizzata.

Nel seguito viene riportata una proposta di metodo per la determinazione di tensioattivi anionici e non ionici in campioni acquosi mediante HPLC accoppiata a rivelatori UV ed evaporativi, previo arricchimento degli analiti mediante estrazione liquido-liquido (LLE) o in fase solida (SPE). L'utilizzo di un sistema di rivelatori in serie consente di determinare gli analiti in miscele anche complesse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede la determinazione di tensioattivi anionici e non ionici nelle acque mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad opportuni rivelatori (UV, fluorescenza, "Evaporative Light Scattering Detector" ELSD, o "Charged Aerosol Detector" CAD), anche disposti in serie. La colonna cromatografica utilizzata è composta da catene alchi-

* polesello@irsa.cnr.it

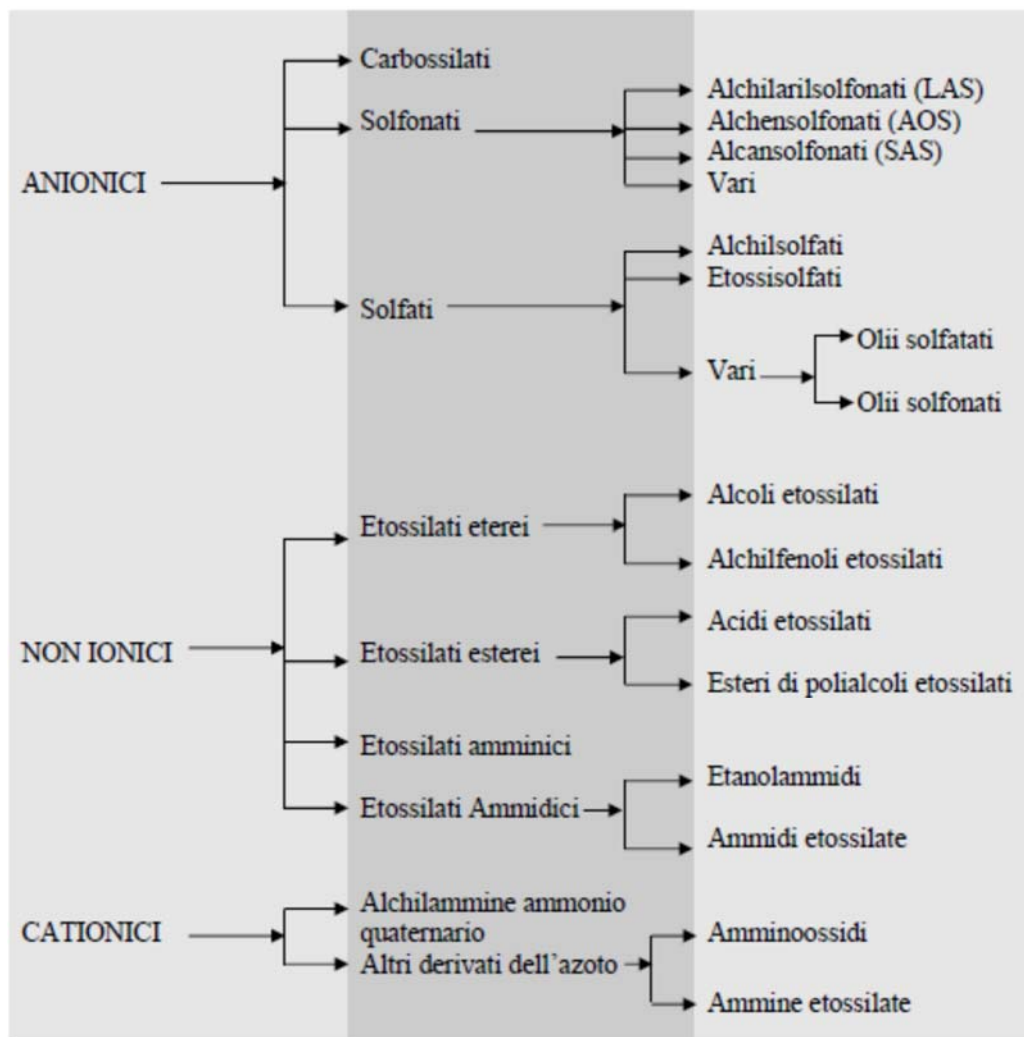


Figura 1. Principali classi e sottoclassi di tensioattivi

liche, gruppi amminici terziari e gruppi ammidici polari che consentono differenti meccanismi di separazione degli analiti: fase inversa, scambio anionico e interazioni dipolo-dipolo. I tensioattivi anionici vengono ritenuti principalmente grazie ad interazioni di scambio ionico e ripartizioni idrofobiche, mentre i tensioattivi non-ionici vengono separati grazie ad interazioni idrofobiche e dipolo-dipolo.

I campioni acquosi vengono preventivamente sottoposti ad estrazione liquido-liquido (LLE) o liquido-solido su cartucce per estrazione a fase solida (SPE) e gli estratti ottenuti, concentrati di volume, sono analizzati mediante HPLC. Il riconoscimento dei picchi nei cromatogrammi degli estratti si effettua confrontando il loro tempo di ritenzione con quello dei picchi di una soluzione di riferimento multicomponente.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è in grado di determinare ciascuna singola specie di tensioattivo eventualmente presente in campioni di acque di scarico urbane ed industriali, in acque superficiali e sotterranee e, in generale, in qualsiasi soluzione acquosa di interesse.

Il campione, ove non già disponibile in adeguata concentrazione di tensioattivi, deve essere avviato alla

fase di concentrazione prima della determinazione mediante HPLC. Tale fase mira all'ottenimento di una soluzione contenente almeno 100 mg/kg di ciascuna specie tensioattiva che si desidera determinare. Pertanto il limite inferiore di determinazione (LOD) è dipendente dal fattore di concentrazione che viene applicato in fase di preparazione del campione.

3. INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

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

Solventi, reattivi, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione del tracciato cromatografico. Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate, è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acquoso acqua ultrapura.

Nel caso di evidenza di interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Data la diffusione quasi ubiquitaria dei tensioattivi si richiede una particolare cautela nella scelta dei reattivi e dei solventi, con continue verifiche di bianchi.

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

4. CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

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

5. APPARECCHIATURE

- 5.1 Normale vetreria da laboratorio;
- 5.2 Apparecchiature per estrazione liquido-liquido (LLE):
 - 5.2.1 Cilindri graduati (250-1000mL)
 - 5.2.2 Imbuti separatori (500-1000 mL)
 - 5.2.3 Cilindro da 25 mL
 - 5.2.4 Micropipetta a stantuffo (da 100 a 1000 µL)
 - 5.2.5 Omogeneizzatore meccanico per provette o di massa a singolo quadrupolo;
- 5.3 Apparecchiature per estrazione (SPE):
 - 5.3.1 Cartucce per estrazione in fase solida SPE (es. "C₁₈ endcapped")

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

La C₁₈ è una fase adsorbente apolare, in grado di trattenere soprattutto composti apolari o debolmente polari, costituita da catene idrocarburiche con il gruppo ottadecilico legato al gel di silice, e disattivazione per "endcapping" dei silanoli residui. Scegliere una quantità di fase sufficiente per trattenere gli analiti.
 - 5.3.2 Sistema di filtrazione per cartucce SPE (SPE work station)

È possibile effettuare l'estrazione mediante SPE anche senza l'utilizzo di un sistema automatico usando lo stesso

protocollo indicato di seguito. La strumentazione automatica, tuttavia, garantisce un risparmio di tempo e assicura prestazioni elevate per quanto riguarda il recupero.

- 5.4 Membrane filtranti in fibra di vetro, 0,7 mm di porosità nominale;
- 5.5 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g ;
- 5.6 Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg ;
- 5.7 Dispositivo per l'erogazione di azoto gassoso, purezza 5.0;
- 5.8 HPLC con pompa a gradiente (0,2-10 mL/min) dotato di autocampionatore o valvola di iniezione manuale e di forno per il riscaldamento della colonna analitica. L'HPLC è equipaggiato con un rivelatore UV ed un rivelatore ELSD ("Evaporative Light Scattering Detector") o un CAD ("Charged Aerosol Detector"). ;
- 5.9 Colonna a fase stazionaria inversa con gruppo polare incorporato. Si consiglia l'uso di una colonna cromatografica, la cui superficie di scambio sia composta da catene alchiliche, gruppi amminici terziari e gruppi amidici polari (tipo "Acclaim Surfactant Plus" 3 µm, 4,6 x 150 mm). Se disponibile, si consiglia l'uso della rispettiva precolonna. Cambiando natura o dimensioni della colonna analitica utilizzata dovranno essere modificati i parametri analitici adottati secondo specifiche indicazioni fornite dalla ditta produttrice ;

6. REATTIVI

- 6.1 Acqua ultrapura
- 6.2 Acetone per residui di pesticidi.
- 6.3 Cloroformio (CHCl₃)
- 6.4 Metanolo (MeOH) per HPLC grado gradiente.
- 6.5 Acetonitrile per HPLC grado gradiente.
- 6.6 Formaldeide al 37%
- 6.7 Acido cloridrico concentrato (d=1,2 g/mL)
- 6.8 Ammonio acetato (CH₃CO₂NH₄) di grado standard per cromatografia.
- 6.9 Soluzione concentrata di ammonio acetato (1M). Pesare 77,08 g di ammonio acetato, essiccato per 2 ore a 100°C; sciogliere in acqua e diluire a 1 litro con acqua in matraccio tarato. La soluzione è stabile per sei mesi in bottiglia di polietilene, polipropilene o vetro.
- 6.10 Soluzione di ammonio acetato 100 mM, pH 5: Diluire 10 volte la soluzione concentrata (100 mL in 1 L) in un matraccio tarato. Portare il pH di questa soluzione a 5 con acido acetico concentrato.
- 6.11 - Soluzioni di riferimento: Preparare in acqua cromatografica soluzioni di riferimento concentrate (0,5-1 g/L) di tensioattivo anionico e non

ionico. Le soluzioni multicomponente aventi concentrazioni comprese nell'intervallo 0-500 mg/l sono ottenute per diluizioni successive in acqua cromatografica delle soluzioni concentrate. Le soluzioni vanno conservate a 4 °C.

7 - PROCEDIMENTO

7.1 Trattamento preliminare

La filtrazione dei campioni d'acqua è condotta nel caso si ricorra all'estrazione in fase solida (SPE) per rimuovere i solidi sospesi che andrebbero a otturare la fase della cartuccia SPE. Questa operazione viene condotta solo quando la concentrazione di solidi sospesi risulta maggiore di 50 mg/L. Impiegare membrane filtranti in fibra di vetro (5.4) e verificare con l'uso di bianchi l'assenza di contaminanti.

7.2 Estrazione liquido-liquido (LLE)

Trasferire almeno 200 mL di campione tal quale nell'imbuto separatore e procedere all'estrazione liquido-liquido in almeno due fasi successive, utilizzando aliquote minime da 25 mL ciascuna di CHCl₃ ed unendo le fasi cloroformiche in un beacker.

Concentrare l'estratto cloroformico con debole riscaldamento in corrente d'azoto fino raggiungere un quantità di pochi mL; trasferire quantitativamente in una provetta e procedere con la concentrazione dell'estratto.

Lavare il beacker con due aliquote da 5 mL di cloroformio e trasferire in provetta.

Portare a secco, riprendere il residuo con 1 mL di acqua ultrapura e agitare vigorosamente utilizzando un agitatore per provette se disponibile. Iniettare quindi il campione nel minor tempo possibile in HPLC.

7.3 Estrazione SPE

Qualora si utilizzi un sistema automatico di estrazione SPE, seguendo le istruzioni del manuale fornito a corredo dell'apparecchiatura, posizionare la cartuccia per SPE, condizionare la stessa con MeOH ed in seguito con acqua ultrapura (25 mL di ciascun solvente, velocità di flusso 5 mL/min).

Caricare sulla cartuccia utilizzata una quantità di campione tale da consentire l'ottenimento di una soluzione finale di concentrazione adeguata. Impostare i parametri dell'apparecchiatura affinché la fase di caricamento sia eseguita ad una velocità compresa fra i 5 ed i 10 mL/min, di seguito far eseguire una fase di essiccazione della cartuccia in corrente di azoto per almeno 5 minuti. Eluire con 8 mL di MeOH alla velocità di 1 mL/min raccogliendo l'estratto in una provetta a fondo conico. Evaporare il solvente, riprendere il residuo con 1 mL di acqua ultrapura ed iniettare il campione nel minor tempo possibile in HPLC.

7.4 - Analisi

A titolo esemplificativo si riportano di seguito le condizioni cromatografiche adottate nell'analisi di estratti di campioni reali (Tabb. 1-2). I relativi cromatogrammi sono riportati in Figg 1 e 2

Tabella 1. Condizioni operative utilizzate per l'analisi in HPLC

Fase stazionaria	Colonna Acclaim Surfactant Plus 3 mm (4,6 x 150 mm)
Eluente	Miscela binaria acetonitrile/ammonio acetato 100 mM, pH=5
"Loop"	5 µL
Flusso eluente	0,6 mL/min
Volume di iniezione	5 mL
Rivelatore	UV (225 nm) ELSD: Temperatura di nebulizzazione: 30° C Temperatura di evaporazione: 90° C Gas di trasporto: 0,90 litro standard/ min (slm) <i>oppure</i> CAD Controllo della temperatura di nebulizzazione: ON Temperatura di nebulizzazione: 30°C Frequenza di acquisizione dei dati: 2Hz Filtro: non inserito

Tabella 2. Caratteristiche del gradiente utilizzato per l'analisi in HPLC

Tempo (minuti)	Acetonitrile (%)	Ammonio acetato (%)
0	35	65
1.0	35	65
8.0	85	15
15.0	85	15
15.1	35	65
23.0	35	65

Sia il pH della soluzione di ammonio acetato sia il gradiente sopra riportato sono puramente indicativi e possono essere modificati in funzione delle diverse caratteristiche del sistema cromatografico utilizzato e della eventuale presenza di picchi interferenti. Si deve comunque mantenere una sufficiente risoluzione tra i picchi (si può tollerare una sovrapposizione tra i picchi che non superi il 10 % dell'altezza misurata dalla base del picco)(*).

(*) Ciascun picco è costituito da un insieme di isomeri più o meno risolti. Per questo motivo non si può ottenere un picco cromatografico di forma gaussiana

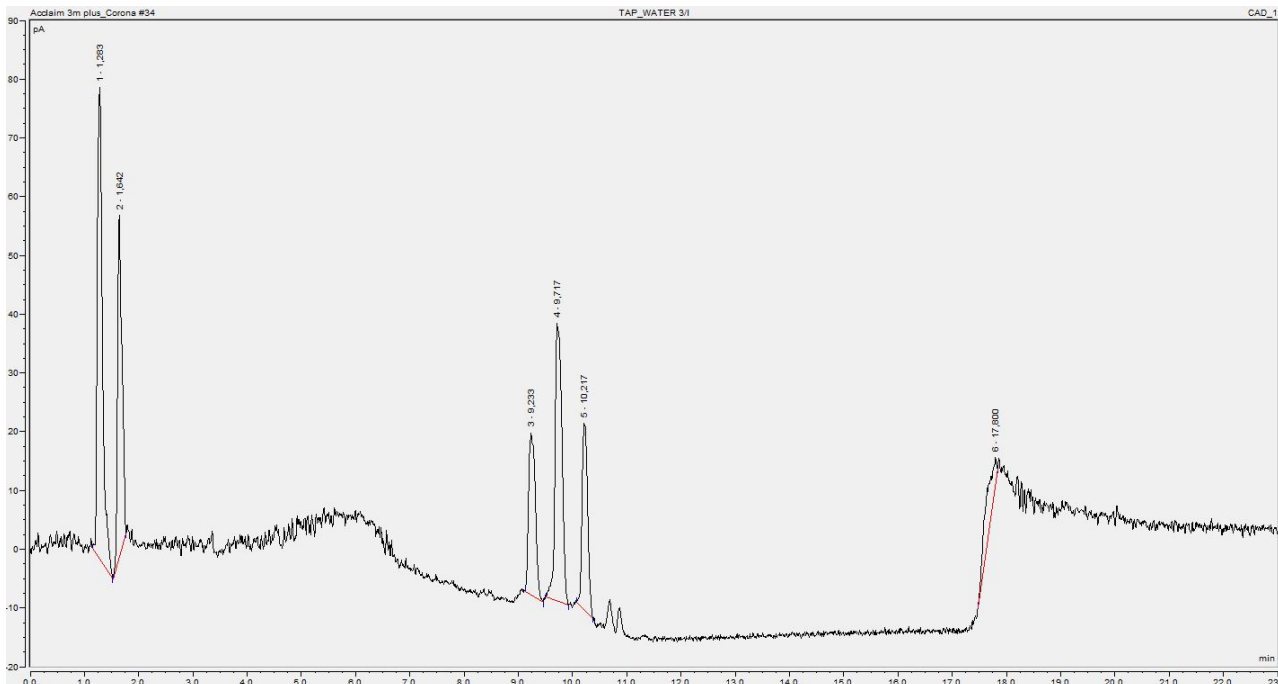


Figura 1. Cromatogramma di una miscela di 4 LAS di sodio (tensioattivo anionico), ottenuto nelle condizioni di Tabella 1 con rivelatore CAD

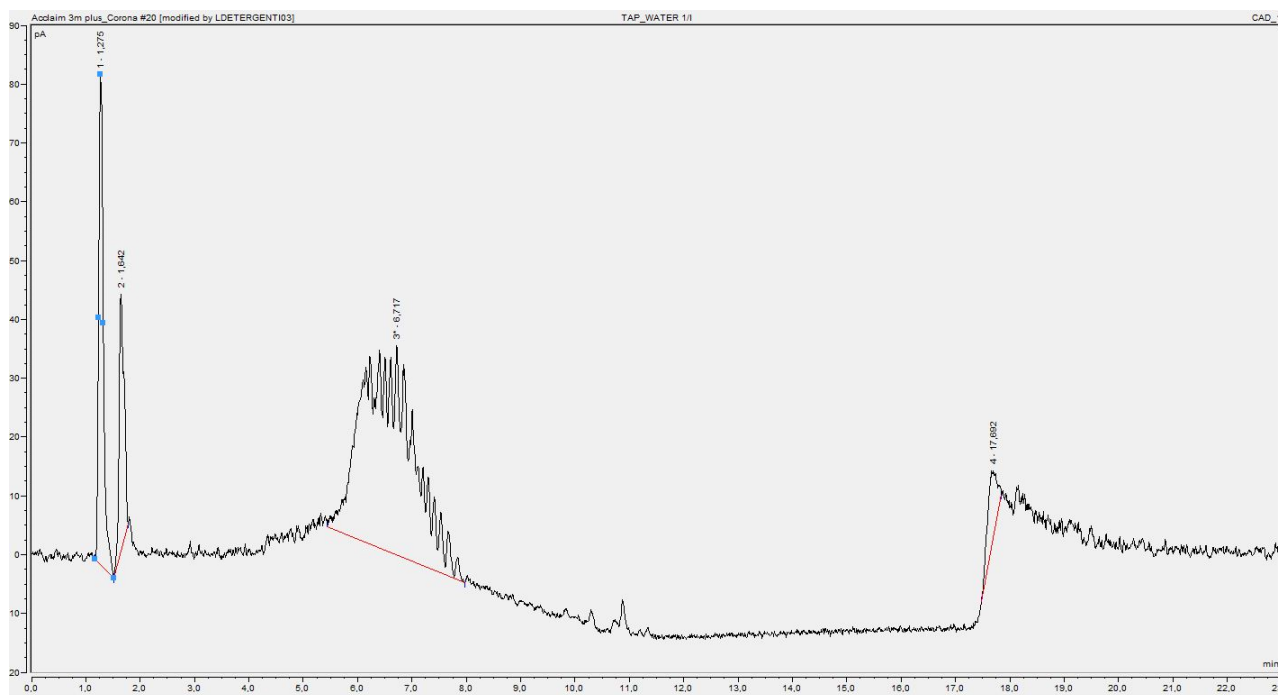


Figura 1. Cromatogramma di una miscela di alcool etossilato C13-C15 10 EO (tensioattivo non ionico) ottenuto nelle condizioni di Tabella 1 con rivelatore CAD

Il campione di acqua opportunamente concentrato, come descritto ai paragrafi 7.2 o 7.3, viene iniettato nel sistema cromatografico.

8. CALCOLI

Qualora i tensioattivi rilevati siano identificabili con uno degli standard di riferimento, la loro quantificazione è da esprimere utilizzando tale riferimento.

Se invece non fosse possibile eseguire questo passaggio, perché i picchi rilevati hanno distribuzione

diversa dal riferimento, il risultato andrà espresso utilizzando un riferimento appartenente alla stessa classe di tensioattivi e che appaia più confacente alla risposta analitica qualitativa individuata.

Per le sostanze che rispondono all'UV l'analisi quantitativa viene effettuata sulla base di opportune curve di taratura, area-concentrazione, ottenute riportando in ascissa la concentrazione della soluzione di riferimento e in ordinata la media delle aree dei picchi delle soluzioni di riferimento.

Per quanto riguarda l'utilizzo del rivelatore

“Evaporative Light Scattering Detector” (ELSD), a causa della risposta non lineare di molte delle molecole tensioattive, potenziali analiti, si consiglia di effettuare la determinazione quantitativa iniettando, in coda all’analisi del campione, uno o più soluzioni di riferimento in grado di dare un segnale il più possibile simile a quello dell’analita di interesse.

L’uso, in alternativa, di un rivelatore CAD (“Charged Aerosol Detector”) permette di ovviare alla limitazione nell’intervallo dinamico, intrinseca alla tecnica ELSD

9. QUALITA' DEL DATO

9.1 - Accuratezza

Soluzioni sintetiche preparate miscelando un tensioattivo non ionico (alcol etossilato C11-7EO) ed uno anionico (Sodio alchilbenzensolfonato) alla concentrazione di circa 1 mg/L ciascuno, in acqua di rete, sottoposte ad estrazione in fase solida, hanno fornito dati di recupero medio del 94,6% per l’anionico e del 100,1 % per il non ionico.

Campioni reali di acque di scarico o di processo, esenti da tensioattivi, dopo aggiunta di tensioattivi anionici e/o non ionici nella misura di 1-2 mg/L hanno fornito dati di recupero non superiori all’85% applicando entrambe le procedure di preconcentrazione (LLE ed SPE).

9.2 - Precisione

La precisione associata alla sola determinazione cromatografica, senza la variabilità dovuta all’omogeneità del campione o alla tecnica di estrazione, è stata valutata dal coefficiente di variazione, $CV = (\text{scarto tipo/valore medio}) \times 100$, di una serie di ripetizioni di soluzioni di riferimento effettuate in giorni diversi. Per diversi tensioattivi e con i due metodi di rivelazione il CV non è mai superiore al 3%.

Nota:

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

BIBLIOGRAFIA

CAPRI S., DE ANGELIS S., PATROLECCO L., POLESELLO S., VALSECCHI S. (2004): “Determinazione del nonilfenolo e nonilfenoli mono- e di-etossilati in acque superficiali”, Notiziario IRSA dei Metodi Analitici, aprile, 2-8.

IRSA (1986): “Criteri e limiti per il controllo dell’inquinamento delle acque”, Quad. Ist. Ric. Acque, 75, 385-407.

KNEPPER T., BARCELO D., VOOGT P. (2003): “Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment”, Comprehensive Analytical Chemistry, XL, Elsevier, Amsterdam.

LIU X., POHL C. A., WEISS J. (2006): “New polar-embedded stationary phase for surfactant analysis”, J. Chromatogr. A, 1118, 29-34.

POLESELLO S., POLESELLO A., GUENZI S., ROSCIOLI C. (2007): “Strumenti per il laboratorio chimico-biologico – Vol. II Le tecniche separative”, Editore: Tecniche Nuove, Milano, pp 280, ISBN 978-88-481-1943-6.

Regolamento (CE) N. 648/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 relativo ai detersivi, Gazzetta ufficiale dell’Unione europea, 8.4.2004 L 104/1.

VALSECCHI S., LIETTI E., POLESELLO S. (2008): “Determinazione di nonilfenolo (4-NP) e di alchilbenzene solfonati lineari (LAS) in acque e matrici solide ambientali”, Notiziario IRSA dei Metodi Analitici, agosto, 2-9.

Applicazione della metodologia *Design of Experiments* all'analisi tossicologica con *Vibrio fischeri*

a cura di

V.G. Muzzini, E. Galli (*), *Istituto di Biologia Agro Forestale – CNR, Monterotondo, RM*

C. Polcaro, E. Donati, *Istituto Metodologie Chimiche – CNR, Monterotondo, RM*

D. Mirabile, T. Beone, S. Zanlucchi, *Centro Sviluppo Materiali*

INTRODUZIONE

Per saggiare la tossicità di una sostanza o di una miscela di sostanze nei confronti degli organismi e dell'ambiente sono disponibili diversi test che utilizzano differenti organismi dai batteri, alle alghe, fino ai vertebrati stessi. Indubbiamente i test sui batteri sono quelli più semplici e in particolare il test con *Vibrio fischeri* è stato ampiamente studiato nel corso degli anni. La metodologia di analisi tossicologica con *Vibrio fischeri* su singole sostanze che prevede la determinazione dell'EC₅₀ (effettiva concentrazione della sostanza che provoca una risposta del 50% rispetto alla risposta massima) come valore di riferimento per stimare la tossicità della sostanza stessa è una metodologia consolidata (Guzzella, 1996; IRSA-APAT, 2003), ma quando si deve valutare la tossicità di miscele l'analisi della risposta tossicologica si complica in quanto le singole sostanze possono interagire tra loro aumentando (sinergia) oppure diminuendo (antagonismo) la tossicità risultante rispetto a quella che si avrebbe aggiungendo semplicemente le tossicità relative delle sostanze presenti nella miscela (additività). Vari approcci e diverse procedure sperimentali possono essere applicate (Kortenkamp et al., 2009) noi useremo l'addizione di concentrazione (AC) come approccio per predire la tossicità delle miscele e valutare eventuali aumenti o diminuzioni di tossicità e il *Design of Experiments* (DOE) come procedura sperimentale e di analisi dati permettendo di determinare simultaneamente gli effetti individuali e interattivi dei diversi fattori relativamente alla tossicità delle miscele sotto analisi.

Il *Design of Experiments* è stato sviluppato nel 1920 dallo scienziato inglese, R.A. Fisher, come metodo per massimizzare le informazioni derivanti da dati sperimentali (Fisher, 1935). Tale metodo si è evoluto nei decenni seguenti fino a diventare una delle tecniche statistiche per la progettazione degli esperimenti più conosciute.

Ci sono tre principi base che caratterizzano il *Design of Experiments* indicati da Fisher:

- *randomizzazione delle prove* - assegnazione dei soggetti a gruppi o a gruppi diversi in un esperimento in modo casuale.
- *blocco* - disposizione delle unità sperimentali in gruppi (blocchi) formati da unità che sono simili tra loro. Tale somiglianza deve essere maggiore tra le unità all'interno di un blocco che tra unità di blocchi differenti (omogeneità). Questa modalità

riduce le fonti di variazione tra le unità e consente così una maggiore precisione nella stima della sorgente di variazione sotto test.

- *replicazione delle misure* - le misure sono di solito soggette a variazioni e incertezze, quindi ripetere le misure e replicare gli esperimenti completi permette di identificare le fonti di variazione, valutando meglio gli effetti dei trattamenti, e rafforzando ulteriormente la validità e l'affidabilità dei test (Cochran & Cox, 1957).

Nella sua forma più generale è indicato come *Surface Design* e prevede di descrivere l'intero iperpiano definito dalle n sostanze che compongono la miscela con un numero k di test di concentrazioni per composto. Noi useremo tale procedura nella sua forma più semplice quella a due livelli (2ⁿ), quindi utilizzando due livelli di concentrazioni e tre sostanze chimiche di cui due organiche e una formata da una soluzione di quattro metalli.

Molto frequentemente le miscele che vengono sintetizzate in laboratorio, al fine di studiare interazioni di particolari sostanze chimiche, vengono formate con concentrazioni, per le varie sostanze, simili ai valori di EC₅₀ di riferimento per poter osservare gli effetti nella parte maggiormente dinamica del range di misura. Nell'ambiente però vengono rilasciate miscele di sostanze (reflui) da vari tipi di attività (industriali, chimiche, farmaceutiche e agricole), con concentrazioni casuali, molto distanti alle volte dalle concentrazioni EC₅₀ di riferimento e i processi di abbattimento degli inquinanti hanno bisogno di informazioni sulla loro efficacia per poter essere modificati in funzione di una azione incisiva nella diminuzione della tossicità. Per tale ragione in questo lavoro ci siamo proposti di studiare un metodo che potesse dare informazioni su miscele di sostanze con concentrazioni lontane da quelle caratteristiche di EC₅₀ cercando di limitare il numero di esperimenti per poter valutare l'efficacia dell'informazione ottenuta.

Precedenti studi hanno messo in evidenza un effetto stimolatorio sul metabolismo dei batteri fotoluminescenti da parte di basse dosi di metalli (Fulladosa et al., 2005a; Fulladosa et al., 2005b) oltre alla possibile formazione di complessi tra metalli e fenoli che può attenuare la tossicità complessiva (Kim et al., 2006; Su et al., 2012).

In questo lavoro quindi ci proponiamo di eseguire delle analisi tossicologiche mediante test con *Vibrio fischeri* su miscele di metalli (cromo, arsenico, cadmio e vanadio) a basse concentrazioni e di sostanze orga-

* emanuela.galli@ibaf.cnr.it

niche (fenolo e naftalene) ad alte concentrazioni per verificare le possibili interazioni, applicando la metodologia Design of Experiments sia nel progettare la procedura di misura che nell'analisi dei risultati.

METODI

Test con *Vibrio fischeri* e range di applicabilità

Il test con *Vibrio fischeri* è un test standard ecotossicologico di tossicità acuta ampiamente utilizzato come test di tossicità a breve termine di campioni ambientali di acqua, sedimento e suolo, ed utilizzato anche per saggiare la tossicità delle sostanze in soluzione acquosa (Guzzella, 1996; IRSA-APAT, 2003). La procedura utilizza come organismo il batterio marino bioluminescente *Vibrio fischeri* ed in particolare il ceppo NRRL-B-11177 commercializzato anche come *Photobacterium phosphoreum*. L'utilizzo di questo saggio di bioluminescenza è stato standardizzato (UNI EN ISO 11348-3:2009) a scopi regolatori grazie alla sua sensibilità e breve tempo di conduzione del test. I batteri vengono esposti per 15-30 minuti a concentrazioni crescenti del materiale da testare. La riduzione dell'intensità della luce emessa dai batteri è correlata alla tossicità della soluzione e viene comparata a campioni di controllo. La variazione della concentrazione di sostanza tossica e della relativa intensità luminosa produce una relazione dose/risposta. I risultati ottenuti vengono normalizzati e viene calcolato il corrispondente valore di EC₅₀, e EC₂₀ (la concentrazione della sostanza testata che produce una riduzione rispettivamente del 50% e del 20% della luminescenza batterica), e la diluizione di non effetto (Guzzella, 2006).

Il limiti di utilizzo del test Microtox® sono strettamente associati ai limiti di sopravvivenza dei batteri *Vibrio fischeri*. I batteri, in quanto organismi, sono sensibili alle condizioni ambientali e se queste non sono ottimali possono andare in sofferenza o addirittura morire. Le variabili ambientali più importanti sono la temperatura, il pH, e la pressione osmotica, in quanto i batteri sono organismi marini. L'analizzatore Microtox® model 500, in dotazione all'istituto IMC - CNR, imposta automaticamente una temperatura di 15 ± 2 °C per le cuvette in esame, che quindi sarà la temperatura di riferimento a cui verranno effettuati i test e le letture ottiche. Lo strumento attraverso un fotometro misura la quantità di luce emessa dai batteri contenuti nelle cuvette. Completa il sistema un software per pc (MicrotoxOmni® software) che si occupa di registrare i dati dal dispositivo, calcolare le attenuazioni, generare i grafici ed elaborare i report con i valori di EC₅₀.

Il pH è stato portato nel range 6 - 8, e la salinità tra il 2% e il 5% (Soto et al., 2009). Per la descrizione sulla metodologia del test si rimanda al quaderno dell'IRSA APAT-IRSA n.29 del 2003.

Miscela

Soluzioni standard sono state utilizzate per la preparazione delle miscele, in particolare per il fenolo e

naftalene sono state utilizzate soluzioni della Ultra Scientific e per i metalli Cr (IV), As (V), Cd (II), e V (V) sono stati utilizzati reagenti della Carlo Erba, 1 g/L in 3% HNO₃.

La soluzione di metalli è stata preparata con la stessa quantità di ciascun metallo (1 mg/L) e il pH è stato regolato a 7 con NaOH (0,1 M - reagenti Carlo Erba). La soluzione è stata lasciata riposare per 30 minuti, prima dell'analisi, al fine di controllare la possibile formazione di precipitati. Poi, questa soluzione è stata utilizzata per la preparazione delle miscele in combinazione con fenolo e naftalene.

Metodologia Design of Experiments

La tecnica di multianalisi prevede esperimenti fattoriali in cui ad ogni variabile viene associato un valore alto e uno basso, in questo modo se il numero di variabili inerenti al processo è uguale a n il numero di test da effettuare è 2ⁿ (Tab.1).

Tabella 1. Tabella Doe per processo a 3 variabili

Test	Fattore A	Fattore B	Fattore C	Effetto
1	+1	+1	+1	e1
2	+1	+1	-1	e2
3	+1	-1	+1	e3
4	+1	-1	-1	e4
5	-1	+1	+1	e5
6	-1	+1	-1	e6
7	-1	-1	+1	e7
8	-1	-1	-1	e8

Successivamente viene calcolata la media tra tutti gli effetti ottenuti con il valore alto della variabile e la corrispondente media degli effetti ottenuti con il valore basso per ogni fattore e interazione.

$$\text{Effetto Fattore } X = \left(\sum_i e_i \right) * m^{-1} \quad (1)$$

con X = {A, B, C, AB, AC, BC, ABC}; m = 2ⁿ⁻¹

Per ogni fattore ci sono quattro test e quindi quattro effetti ottenuti con valore alto di concentrazione e quattro con valore basso. Si effettua la media di questi quattro valori, sia per il valore alto che per quello basso, e si fa la differenza. Si analizza infine la differenza tra le due medie per ogni variabile.

$$\Delta \text{Effetto}_{\text{Fattore } X} = (\text{Effetto}_{\text{Fattore } X \text{ media max}} - \text{Effetto}_{\text{Fattore } X \text{ media min}}) \quad (2)$$

con X = {A, B, C, AB, AC, BC, ABC}

Tale variazione può essere sia positiva che negativa. In questo modo è possibile valutare quali siano gli effetti più importanti, relativamente alle variabili e alle rispettive interazioni all'interno del sistema considerato.

E' possibile determinare un modello lineare mediante regressione codificando i valori di concentrazione in modo che il valore basso sia uguale a -1 e quello alto a +1 (3).

$$C_n = \frac{C - (C_H + C_L)/2}{(C_H + C_L)/2} \quad (3)$$

dove C è la concentrazione reale, C_H è la concentrazione corrispondente al valore alto e C_L è la concentrazione relativa al valore basso e C_n è la concentrazione normalizzata (Ren et al., 2004).

I coefficienti del modello lineare (4) sono rispettivamente la metà della differenza delle medie degli effetti ottenuti con la formula (2), cioè media dei quattro effetti ottenuti con il livello di concentrazione alto meno media dei quattro effetti ottenuti con il livello di concentrazione basso, diviso due, per ogni fattore.

$$\text{Effetto} = a + b * C_{N,A} + c * C_{N,B} + d * C_{N,C} + e * C_{N,A} * C_{N,B} + f * C_{N,A} * C_{N,C} + g * C_{N,B} * C_{N,C} + h * C_{N,A} * C_{N,B} * C_{N,C} \quad (4)$$

Il modello così trovato permette di calcolare gli effetti delle miscele nel range di concentrazioni tra il valore alto e quello basso. Affinchè la soluzione trovata possa essere applicata con successo è necessaria la condizione di linearità degli effetti di tossicità nel range considerato.

La tossicità delle miscele di fenolo, naftalene e metalli (fattori) è stata quindi studiata mediante i due livelli di concentrazione rispettivamente alto livello (+1) con 200mg/l per il fenolo, 5mg/l per il naftalene, e 0.50 mg/l per ciascuno dei 4 metalli e basso (-1) con 100mg/l per il fenolo, 1mg/l per il naftalene, e 0.25

mg/l sempre per ciascuno dei 4 metalli.

Tossicità delle miscele ed effetti di interazione tra composti

Ogni sostanza tossica ha un proprio specifico EC50 a parità di temperatura, pH e salinità. Quando si mischiano sostanze diverse la tossicità complessiva è più difficile da prevedere, in quanto tra le varie sostanze possono formarsi composti diversi che avranno una loro specifica tossicità. Il test con *Vibrio fisheri* non distingue tra i vari effetti tossici delle sostanze disciolte ma fornisce una risposta complessiva. Cambiando le concentrazioni relative o le condizioni di preparazione della miscela potremo avere delle risposte differenti di tossicità da parte dei batteri.

Benché non sia possibile conoscere a priori la tossicità di una soluzione così composta è altresì possibile stimare la tossicità di una soluzione contenente diverse sostanze tossiche non interagenti tra loro secondo la formula (Kortenkamp et al., 2009):

$$EC_{50\ teo} (\%) = 100 * \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i}{EC_{50\ i}} \right)} \right) \quad (6)$$

La tossicità teorica, ossia quella che si avrebbe se le sostanze non interagissero tra loro, potrebbe essere diversa da quella effettivamente osservata. L' EC₅₀OSS della soluzione, misurato nel test, potrà quindi essere uguale a quello stimato, indicando scarsa interazione tra i composti tossici che fanno parte della miscela, oppure essere maggiore o minore segnalando rispettivamente una minore tossicità (antagonismo) o maggiore tossicità (sinergia).

Le variazioni possono quindi essere evidenziate confrontando EC₅₀OSS con il corrispondente valore di EC₅₀teo. Per confrontare i dati è quindi utile sottrarre i valori di EC₅₀ osservati della miscela con i rispettivi valori teorici.

Tabella 2. Formule esplicite per esperimento fattoriale completo 2n con n=3 (ei con i={1,8} - Tab.1)

Effetto Fattore A		Effetto Fattore B		Effetto Fattore C	
max	min	max	min	max	min
$\frac{(e1+e2+e3+e4)}{4}$	$\frac{(e5+e6+e7+e8)}{4}$	$\frac{(e1+e2+e5+e6)}{4}$	$\frac{(e3+e4+e7+e8)}{4}$	$\frac{(e1+e3+e5+e7)}{4}$	$\frac{(e2+e4+e6+e8)}{4}$
Effetto Interazione AB		Effetto Interazione AC		Effetto Interazione BC	
max	min	max	min	max	min
$\frac{(e1+e2+e7+e8)}{4}$	$\frac{(e3+e4+e5+e6)}{4}$	$\frac{(e1+e3+e6+e8)}{4}$	$\frac{(e2+e4+e5+e7)}{4}$	$\frac{(e1+e4+e5+e8)}{4}$	$\frac{(e2+e3+e6+e7)}{4}$
Effetto Interazione ABC					
max			min		
$\frac{(e2+e3+e5+e8)}{4}$			$\frac{(e1+e4+e6+e7)}{4}$		

$$EC_{50\text{resi}} = EC_{50\text{oss}} - EC_{50\text{teo}} \quad (7)$$

L'analisi dei residui fornisce quindi indicazioni sulle interazioni tra le diverse sostanze presenti in soluzione. Con residui positivi $resi > 0$ le interazioni saranno positive indicando una minore tossicità della miscela reale rispetto a quella teorica, viceversa con residui negativi $resi < 0$, segnalando una maggiore tossicità della miscela reale.

Una volta formata una miscela è possibile considerarla dal punto di vista tossicologico come una simil-sostanza in quanto se non vengono modificate le concentrazioni o le altre condizioni in cui è stata formata, la miscela si comporterà sempre nello stesso modo. In tal caso benché sia corretto calcolare l' EC_{50} teorico e confrontarlo con quello osservato è possibile considerare l' EC_{50} osservato come EC_{50} di riferimento specifico per quella miscela e applicare tutte le considerazioni fatte precedentemente.

Analisi dei risultati

Si sono quindi eseguiti dei test per determinare gli EC_{50} del fenolo, naftalene e della miscela di metalli (Cr, As, Cd, V). Per la miscela di metalli si sono usate concentrazioni di 0,5mg/l per ciascun metallo. Le stime di riferimento relative alle concentrazioni di EC_{50} per le diverse sostanze sono le seguenti (Tab. 3):

Tabella 3. Stime di riferimento delle concentrazioni di EC_{50} delle sostanze sotto test

Fenolo (mg/L)	Naftalene (mg/L)	Metalli (mg/L)
21,5	0,6	0,8

Si è eseguito quindi il test con *Vibrio fisheri* miscelando opportunamente le sostanze e applicando la metodologia DOE (Tab. 4).

Applicando la metodologia DOE ai risultati con *Vibrio*

Tabella 4. Risultati Microtox®

Campione	Soluzioni sintetiche (mg/L)			Risultati		
	Fenolo	Naftalene	Metalli	EC_{50} 30min	95% range di confidenza	
1	200	5	0,50	8,38	7,71	9,10
2	200	5	0,25	8,05	7,00	9,25
3	200	1	0,50	13,61	12,24	15,13
4	200	1	0,25	16,38	13,36	20,09
5	100	5	0,50	12,29	11,40	13,25
6	100	5	0,25	13,60	11,91	15,52
7	100	1	0,50	19,02	15,89	22,77
8	100	1	0,25	24,90	19,71	31,45

fisheri, otteniamo i seguenti risultati DOE (Fig. 2). Sono state considerate le misure con tempi di 30 minuti perché i metalli hanno degli effetti che si manifestano in un tempo maggiore.

Come è possibile vedere le sostanze singole sono quelle che presentano le maggiori variazioni degli effetti rispetto alle interazioni tra sostanze. In particolare il fenolo e il naftalene hanno effetti negativi maggiori rispetto alla soluzione di metalli. Questo risultato conferma le aspettative in quanto confrontando i valori di concentrazione delle varie sostanze con i rispetti valori di EC_{50} caratteristici indicati in tabella 3 troviamo che il fenolo ha un valore minimo circa 5 volte maggiore del valore di EC_{50} di riferimento e un valore massimo di 10 volte. Stessa cosa per il naftalene con un valore minimo di circa 1,7 e un valore massimo di 8 volte superiore. In contrapposizione i valori minimo e massimo della miscela di metalli sono rispettivamente di 0,3 volte e di 0,6 volte. Quindi è normale attendersi un maggior contributo dato alla tossicità della miscela da parte delle sostanze organiche. Il naftalene dal valore di concentrazione minimo a quello massimo aumenta la tossicità della miscela del 42%, mentre il fenolo del 33%, e solo un 15% è attribuibile alla variazione di concentrazioni relativa ai metalli. Per quanto riguarda le interazioni a due fattori sono tutte positive, questo risultato consiste nel fatto che quando le concentrazioni delle sostanze (fattori) vengono variate insieme e quindi sono basse o alte simultaneamente l'effetto complessivo è maggiore rispetto alla situazione contraria dove le sostanze vengono variate in modo opposto tra loro. Discorso analogo può essere fatto sull'interazione a tre fattori che nel nostro caso è molto bassa. Vedremo in seguito come con l'analisi degli effetti residui potremo associare i concetti di sinergia e antagonismo alle interazioni tra sostanze.

Analogamente il modello lineare (4) avrà i seguenti coefficienti, relativi alle singole variabili e alle loro interazioni.

$$\text{Effetto} = 14,53 - 2,92 \cdot C_1 - 3,95 \cdot C_2 - 1,20 \cdot C_3 + 0,56 \cdot C_{12} + 0,59 \cdot C_{13} + 0,96 \cdot C_{23} - 0,18 \cdot C_{123}$$

Questi risultati si applicano nel range di concentrazioni considerate e non possono essere generalizzati ad

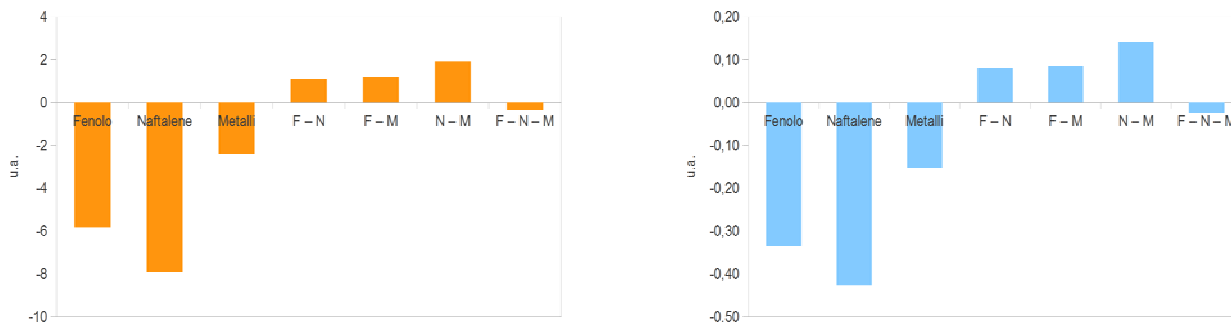


Figura 1. Risultati DOE, sostanze singole e relative interazioni, valori assoluti (SD = ± 1.03 u.a.) e normalizzati al valore basso di concentrazione (SD = ± 0.11 u.a.).

Tabella 5. Calcolo degli effetti residui. Tutti i valori di concentrazione sono espressi in mg/L

Fenolo	Naftalene	Metalli	Effetto residuo
200	5	0,50	1,52
200	5	0,25	1,03
200	1	0,50	3,34
200	1	0,25	5,75
100	5	0,50	3,54
100	5	0,25	4,58
100	1	0,50	3,81
100	1	0,25	8,88

altri range di concentrazioni in quanto concentrazioni differenti potrebbero avere interazioni differenti e dinamiche completamente diverse.

Per valutare le interazioni positive e negative tra le sostanze in modo da poter associare il concetto di sinergia e antagonismo considereremo i valori di EC₅₀ di riferimento di ognuna e applicheremo l'equazione (6) per stimare la tossicità delle miscele confrontando i valori così ottenuti con i valori misurati sperimentalmente. Indicheremo un aumento di tossicità generato dalla interazione tra sostanze come sinergia e una diminuzione come antagonismo.

L'analisi degli effetti residui ci permette di affermare

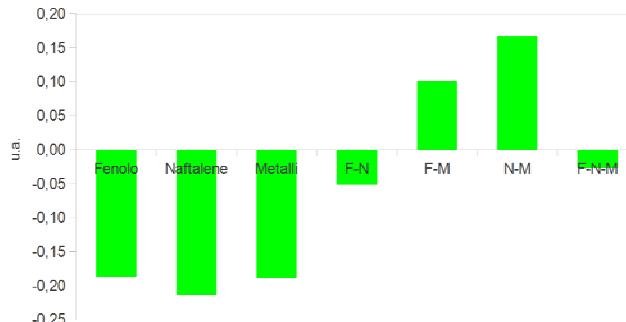


Figura 2. Risultati DOE sugli effetti residui, sostanze e relative interazioni, valori normalizzati al valore basso di concentrazione atteso (SD = ± 0.11 u.a.)

che tutti gli effetti teorici hanno valori inferiori a quelli sperimentalmente misurati (Tab. 5). Questo significa che a queste particolari concentrazioni l'effetto tossico è minore di quello stimato.

Inoltre come si può osservare dalla tabella 6 l'effetto antagonista di mitigazione della tossicità diminuisce all'aumentare delle concentrazioni delle singole sostanze utilizzate per formare la miscela. In altre parole le singole sostanze hanno effetti positivi residui maggiori a basse concentrazioni, questo significa che le interazioni, in questo caso di antagonismo, delle singole sostanze nella miscela sono maggiori alle concentrazioni minori.

L'analisi sugli effetti di interazione tra sostanze viceversa (Fig. 3) mette in evidenza come prevalgano gli effetti positivi nelle interazioni tra metalli e organici in particolare con maggiore interazione tra naftalene e

Tabella 6. Risultati analisi DOE sugli effetti residui. Alto (media dei valori residui con concentrazione alta), Basso (media dei valori residui con concentrazione bassa), Effetto Res (Alto - Basso), Basso Teo (media dei valori teorici con concentrazioni basse), Norm (Valore Normalizzato – Effetto Res/Basso Teo)

	Fenolo	Naftalene	Metalli	F - N	F - M	N - M	F - N - M
Alto	2,91	2,67	3,06	3,81	4,58	4,92	3,92
Basso	5,21	5,45	5,06	4,30	3,53	3,19	4,20
Effetto Res	-2,29	-2,78	-2,01	-0,49	1,05	1,73	-0,28
Basso Teo	12,25	13,03	10,67	9,67	10,40	10,37	10,51
Norn	-0,19	-0,21	-0,19	-0,05	0,10	0,17	-0,03

metalli (17%) rispetto a fenolo e metalli (10%).

Nel caso specifico controintuitivamente aumentando la concentrazione di metalli nella soluzione (dal valore basso al valore alto) aumenta l'effetto positivo (antagonismo) diminuendo la tossicità risultante. Risulta quindi evidente come le concentrazioni della miscela di metalli interagiscano positivamente sulla soluzione complessiva mitigando l'effetto tossico sui batteri.

Conclusioni

Il Design of Experiments incorporando considerazioni statistiche nella progettazione degli esperimenti, è in grado di fornire informazioni utili nell'individuazione delle variabili principali delle miscele sotto test e le possibili interazioni tra sostanze. In particolare l'analisi con la metodologia DOE ha permesso di evidenziare come i composti organici (fenolo e naftalene), nel gruppo dei composti testati, siano le sostanze maggiormente responsabili della tossicità della miscela e con la più ampia variabilità tossicologica, alle specifiche concentrazioni del test. Inoltre le interazioni tra le sostanze organiche e la miscela di metalli (Cr, As, Cd, V) a basse concentrazioni attenuano la tossicità finale della soluzione. Questi risultati sono specifici delle sostanze utilizzate nelle miscele e delle relative concentrazioni.

Si è evidenziata inoltre la necessità di determinare i valori di EC₅₀ di riferimento delle varie sostanze prima di poter analizzare gli effetti sulle miscele. Utilizzando i valori di EC₅₀ di riferimento per le singole sostanze alle diverse concentrazioni è possibile calcolare i valori di tossicità attesi in assenza di interazioni e quindi confrontarli con quelli reali.

E' emerso come sia possibile ottenere informazioni sulla tossicità di miscele confrontando tra loro sostanze diverse e soluzioni formate a loro volta da più composti e considerate come se fossero un'unica sostanza. Ulteriori analisi potranno essere condotte applicando la metodologia DOE a differenti miscele di composti e con differenti concentrazioni.

Bibliografia

Cochran, W. G., & G. M. Cox. 1957. *Experimental Designs*, Wiley, New York

Fisher R.A. *The Design of Experiments*. 1935. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Fulladosa E., J.C. Murat, I. Villaescusa, Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target, *Chemosphere* 58 (2005a) 551-557.

Fulladosa E., J.C. Murat, I. Villaescusa, Effect of Cadmium (II), Chromium (VI) and Arsenic (V) on long-term viability- and growth- inhibition assay using *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49 (2005b) 299-306.

Guzzella L., 1996. Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (Metodo per la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri*). *Notiziario dei Metodi Analitici dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA-CNR)*, suppl. al Quaderno n.100, 1-6.

IRSA-APAT, 2003. *Metodi analitici per le acque*. 8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. Quaderno n.29

Kim K.T., Y.G. Lee, S.D.Kim, Combined toxicity of copper and phenol derivatives to *Daphnia magna*: Effect of complexation reaction, *Environ Int.* 32 (2006) 487 - 492.

Kortenkamp A., T. Backhaus, M. Faust. *State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report. Executive Summary. 22 December 2009. Study Contract Number 070307/2007/485103/ETU/D.1.*

Ren S., R.W. Mee and P.D. Frymierb. Using factorial experiments to study the toxicity of metal mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 2004, 38-43.

Soto W., J. Gutierrez, M.D. Remmenga, M.K. Nishiguchi. Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microb Ecol*, 2009 57:140

Su L., X. Zhang, X. Yuan, Y. Zhao, D. Zhang, W. Qin, Evaluation of joint toxicity of nitro aromatic compounds and copper to *Photobacterium phosphoreum* and QSAR analysis, *J. Hazard. Mater.*

In memoriam

Un ricordo di Silvio Capri

Gli amici e colleghi dell'Istituto di ricerca sulle Acque desiderano testimoniare il loro affetto a Silvio per il suo impegno, la sua serietà professionale e la grande disponibilità assicurata in tanti anni di servizio presso l'Istituto

Il 26 luglio, all'età di 57 anni, è mancato all'affetto dei suoi cari il dottor Silvio Capri, collega e amico di grande spessore umano. Fin dalla sua assunzione all'IRSA-CNR, avvenuta nel 1985, si è occupato di tematiche riguardanti lo sviluppo e validazione di metodiche analitiche per la determinazione di inquinanti nelle matrici ambientali, dedicandosi allo studio del loro comportamento e destino negli ecosistemi acquatici. Dal 1988 è stato componente del Gruppo di esperti per l'aggiornamento, verifica e standardizzazione dei metodi analitici per le acque e dal 1990 ha fatto parte del Comitato di redazione del Notiziario IRSA dei Metodi Analitici, contribuendo, grazie ad una dedizione fuori dal comune e alle sue preziose conoscenze nel settore, a migliorarne la qualità scientifica e aumentarne la diffusione



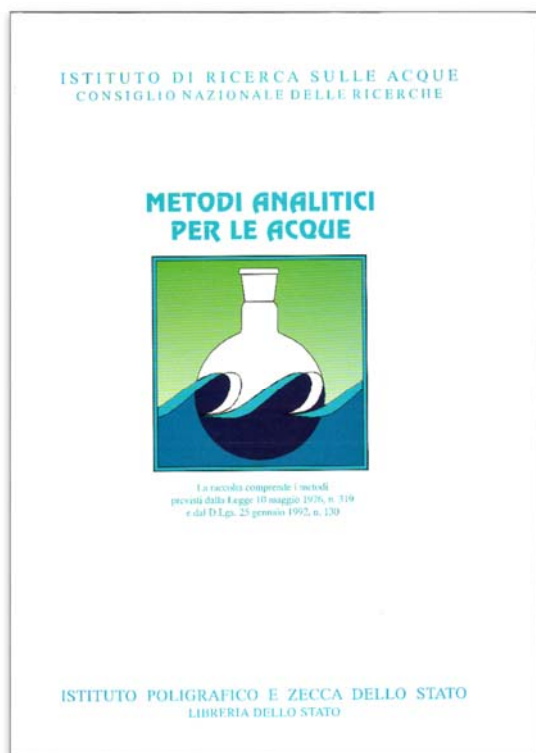
nel mondo accademico e presso le strutture pubbliche e private interessate al controllo degli inquinanti nelle acque. Ha fatto parte del comitato di redazione del volume Metodi Analitici per le Acque edito nel 1994 dall'Istituto Poligrafico dello Stato, dal 1996 è stato componente della nuova Commissione "Metodi analitici per le acque" ed ha curato la successiva edizione dei metodi analitici pubblicati da APAT e IRSA-CNR nel 2003. Successivamente ha continuato ad occuparsi di metodiche analitiche e del Notiziario IRSA ed ha esteso i suoi interessi agli aspetti tecnico-scientifici legati alla definizione

di standard di qualità ambientali per le sostanze pericolose.

Le caratteristiche che più hanno contraddistinto Silvio nel suo percorso lavorativo ed umano, oltre ad una indubbia cultura e vivacità intellettuale e ad una profonda conoscenza del cinema che tanto ha amato, sono state le sue straordinarie doti di sensibilità, disponibilità e modestia, in grado di colpire chiunque abbia avuto modo di conoscerlo, dentro e fuori l'ambiente lavorativo. Si è sempre dedicato senza riserve alle attività scientifiche che lo hanno visto coinvolto, ma ancor più è stato un punto di riferimento per colleghi e amici per la sua grande sapienza accompagnata da un carattere mite e gentile, qualità che raramente vanno d'accordo. Proprio per la sua umiltà e riservatezza forse non ha raggiunto quei riconoscimenti scientifici che ben avrebbe meritato, guadagnandosi comunque la stima e l'affetto di tutte le persone che con lui hanno condiviso la passione per la conoscenza e la scienza. Non vanno dimenticate la sua capacità di ascoltare, l'empatia con cui partecipava alle difficoltà altrui, la grande umanità che sapeva esprimere con riservatezza, l'eleganza del pensiero, la generosità d'animo ed il raffinato umorismo. Nel maggio dello scorso anno si è manifestata la malattia che lo ha allontanato dall'IRSA fino a che, dopo aver lottato con grande dignità e mai facendo pesare sugli altri le proprie difficoltà, ha dovuto arrendersi. Sino alla fine ha evitato di far trapelare la sofferenza e le emozioni contrastanti che lo devastavano, sempre attento a proteggere più



che ad essere protetto, ad incoraggiare più che ad essere incoraggiato, qualità rare oggi. La sua scomparsa lascia un grande vuoto a chi ha avuto il privilegio di conoscerlo come uomo e come collega. E' la persona, oltre che lo scienziato, che noi tutti che lo abbiamo conosciuto intendiamo ricordare, l'amico, il collega che ha saputo trasmettere inconsapevolmente un grande insegnamento di vita, lui con la sua umanità pacata e gentile, sullo stile di un'epoca passata che poco si rispecchia in quella sempre più frenetica e spesso superficiale di oggi.





Valutazione dei processi di bioaccumulo di ritardanti di fiamma bromurati (BFR) in matrici biologiche

XXVI ciclo di Dottorato in Scienze Ambientali
Università degli Studi di Milano-Bicocca

D.ssa Giulia Poma

La famiglia dei composti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants - POPs) comprende numerose classi di molecole dalla diversa natura chimica e dai molteplici utilizzi. Tra queste, uno dei gruppi di molecole più studiato negli ultimi anni è quello dei ritardanti di fiamma bromurati (BFR), sostanze chimiche di origine antropogenica che si aggiungono come additivi a una vasta gamma di prodotti commerciali (industria tessile, elettronica e delle materie plastiche), con lo scopo di ridurre l'infiammabilità. I BFR sono contaminanti che possiedono alcune delle caratteristiche di criticità ambientale tipiche dei POPs (come l'elevata persistenza nell'ambiente) e per questo motivo sono considerati composti ad alto rischio ambientale e sono stati oggetto di studio negli ultimi anni. La volatilità relativamente bassa e l'elevata lipofilità dei BFR suggeriscono che il destino della maggior parte del carico di questi composti nell'ambiente sia il rilascio sui suoli e sui sedimenti. Dal suolo, infatti, i contaminanti possono contribuire all'inquinamento dell'ambiente acquatico attraverso il processo di run off. Giunti nel comparto acquatico, i BFR, essendo poco solubili in acqua, tendono a essere rimossi dalla fase acquosa e ad accumularsi nei sedimenti a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche, che li rendono affini alla componente organica dei sedimenti stessi



Questo sequestro è, però, tutt'altro che definitivo, perché i composti adsorbiti possono entrare nelle reti trofiche attraverso gli organismi bentonici, che sono in stretta relazione con i sedimenti. Le restrizioni internazionali sull'utilizzo dei principali BFR, tra cui i polibromodifenileteri (PBDE) e l'esabromociclododecano (HBCD), hanno aperto la strada all'utilizzo di ritardanti di fiamma di nuova generazione (c.d. novel BFR) che sostituissero le miscele commerciali messe al bando. Tra questi, si annoverano il decabromodifeniletano (DBDPE), il 1,2-bis(2,4,6-tribromofenossi) etano (BTBPE), l'esabromobenzene (HBB) e il pentabromoetilbenzene (PBEB).

In Italia, studi precedenti hanno evidenziato la presenza di elevate concentrazioni di PBDE nei sedimenti del Lago Maggiore. L'input a lago della contaminazione da BFR è principalmente veicolata da due tributari (Bardello e Boesio) che scorrono nella provincia di Varese in cui sono presenti numerose industrie tessili e di materie plastiche. Per questa ragione, il progetto di dottorato si è posto lo scopo di valutare la presenza e i potenziali processi di bioaccumulo di BFR nell'ecosistema del Lago Maggiore considerando diverse matrici, sia abiotiche (sedimenti lacustri e fluviali), sia biologiche (zooplancton, molluschi e pesci, figura sottostante).

Dalle analisi effettuate, è emerso che i sedimenti del Lago Maggiore e dei suoi tributari sono caratterizzati da una contaminazione contenuta da PBEB, HBB e BTBPE, ma da una contaminazione non trascurabile da HBCD che perciò non è stato possibile attribuire a scarichi industriali specifici. Al contrario, i PBDE (in particolare il BDE-209) e il DBDPE sono stati i principali ritardanti di fiamma rilevati nei sedimenti, confermando il loro ampio utilizzo nel bacino del lago. Una contaminazione contenuta e limitata da PBEB, HBB, BTBPE è stata osservata anche nei molluschi, nello zooplanc-

News

ton e nelle specie di pesci analizzati, mentre, nonostante il suo evidente contributo alla contaminazione dei sedimenti, il DBDPE non è mai stato rilevato negli organismi acquatici considerati, soprattutto a causa del suo elevato valore di Log Kow di circa 11. I risultati ottenuti dall'analisi degli organismi considerati hanno quindi permesso di ritenere che la presenza di ritardanti di fiamma bromurati di nuova generazione nel bacino del lago non determina al momento un rischio per gli organismi acquatici che vi vivono e, più in generale, per l'ecosistema del Lago Maggiore. Come già riscontrato in altri studi, invece, l'HBCD e i PBDE sono i contaminanti presenti in maggiore concentrazione nei tessuti dei molluschi, zooplancton e pesci. La loro biomagnificazione potenziale (che per i PBDE è limitata solo ad alcuni congeneri tetra e penta-bromurati) è stata confermata mediante il calcolo di fattori di biomagnificazione (Biomagnification Factor - BMF e Trophic Magnification Factor - TMF) che sono stati ricavati a partire dalle concentrazioni di BFR presenti negli organismi della catena trofica acquatica considerata. In aggiunta, i risultati delle analisi condotte sui campioni ittici hanno evidenziato che i differenti BFR tendono a ripartirsi diversamente negli organismi, sia a seconda della specie considerata, sia in funzione del tessuto analizzato.





Consiglio Nazionale delle Ricerche

Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

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

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, via Salaria km 29+300.

C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Telefono: 06 90672 850

Fax: 06 90672 787

e-mail: notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Comitato di Redazione

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

Segreteria di Redazione

S. Ghergo

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