

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Laboratorio di Tossicologia

I. CAMONI, A. DI MUCCIO, B. PENTECORVO, L. VERGORI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLA
2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-p-DIOSSINA
IN MATERIALI DIVERSI

Roma 6 giugno 1977

A seguito del ben noto incidente di Seveso del luglio 1976, in cui si è avuta una contaminazione del terreno da parte di varie sostanze chimiche, tra cui la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), composto dotato di elevata tossicità (+), notevole attenzione è stata rivolta alla possibilità di decontaminare il terreno tramite una degradazione della molecola della TCDD. A questo scopo sono stati condotti in laboratorio diversi esperimenti nel tentativo di individuare condizioni pratiche per la degradazione della TCDD. Tali esperimenti sono stati essenzialmente basati su due differenti concetti.

Come riportato da diversi Autori (4+6), la luce solare e la radiazione UV a circa 300 μm hanno il potere di decomporre la molecola della TCDD quando essa sia solubilizzata in adatti solventi. Pertanto sono state effettuate delle prove per ottenere questa degradazione della TCDD in varie condizioni sperimentali. In pratica è stato studiato l'effetto dell'irraggiamento con luce UV operando su soluzioni di TCDD in solventi organici, in solventi organici più olio vegetale, in soluzioni acquose contenenti olio vegetale e un emulsionante e su campioni di terreno naturalmente o artificialmente contaminato da TCDD.

D'altro canto, nonostante l'elevata stabilità chimica di cui appare dotata la molecola della TCDD, è stato riportato che il suo tempo di semivita è di

circa un anno in campioni di terreno mantenuti in becker a circa 28° C (7). Ciò suggerisce l'idea di una possibile degradazione della TCDD ad opera di microorganismi. Inoltre Matsumura (8) ha riportato che, tra cento ceppi di microorganismi provati, soltanto cinque mostrano una certa capacità a degradare la TCDD. Perciò è stata esaminata la possibilità che alcune preparazioni microbiche, aggiunte o naturalmente presenti nel terreno della zona di Seveso, potessero degradare la TCDD in varie condizioni colturali; le esperienze sono state condotte sia in brodo nutriente per microorganismi che su campioni di terreno addizionato di materiale organico e altre sostanze allo scopo di accelerare la proliferazione dei microorganismi.

Lo scopo di questa nota è esclusivamente quello di riferire sui metodi di analisi utilizzati nel corso delle sperimentazioni sopra delineate e sulle varianti e accorgimenti adottati per far fronte a situazioni analitiche molto diverse.

Non rientra, invece, nell'ambito di questa nota la discussione dei criteri con cui sono stati impostati e condotti i vari esperimenti nè tanto meno i risultati delle diverse prove.

Nel corso del lavoro analitico relativo alle sperimentazioni citate è stato possibile mettere a punto un metodo di purificazione degli estratti che si è dimostrato efficace in tutti i casi affrontati.

Invece è stato necessario studiare e adottare sistemi di estrazione differenziati a seconda del tipo di materiale nel quale si voleva determinare il contenuto di TCDD.

In pratica le analisi effettuate possono essere ricondotte ai seguenti tipi: a) terreno con aggiunta di materiale organico vario; b) soluzioni acquose contenenti alcune o tutte le seguenti sostanze: olio, emulsionante (Tween 80) e sostanze nutritive per microorganismi; c) soluzioni oleose in solvente organico.

In numerosi lavori è stata descritta l'analisi della TCDD presente come impurezza in preparati erbicidi (9-15), in clorofenoli commerciali (16+20), nell'esaclorobenzene (HCB) (21), nell'insetticida "tetrachlorvinphos" (22), in campioni di tessuti (23), in grassi e olii (24).

Nel caso dei formulati erbicidi a base di acidi clorofenossiacetici e del pentaclorofenolo, il problema analitico consiste essenzialmente nell'estrarre un componente a carattere neutro (la TCDD) da una matrice costituita da un materiale a carattere acido, per cui l'estrazione con solvente organico (etere di petrolio, esano) da un mezzo alcalino si presenta come un normale sistema di separazione (11,13+18). In modo analogo è stata usata la cromatografia a scambio ionico (10,19,20). Nel caso di erbicidi a base di alchil esteri di acidi fenossiacetici l'estrazione viene effettuata come per gli acidi liberi dopo sapo-

nificazione degli esteri. La saponificazione con potassa alcoolica e successiva estrazione con esano è stata usata per l'analisi della TCDD in campioni di tessuti animali (23).

Data la notevole stabilità chimica della molecola della TCDD, è possibile eliminare la maggior parte delle sostanze presenti negli estratti grezzi mediante un trattamento con acido solforico concentrato fino ad ottenere una soluzione incolore. Il trattamento con acido solforico concentrato può essere effettuato per dibattimento in cilindro o imbuto separatore (14,16,24) o per passaggio su colonna di Celite impregnata con acido solforico concentrato (13), in modo simile a quanto descritto per la purificazione di estratti contenenti pesticidi clorurati (5). A volte questo trattamento può precedere (12,15) o seguire (14,16) la purificazione vera e propria effettuata mediante cromatografia su colonna di allumina o gel di silice. A seconda del tipo di campione uno stesso Autore (13) indica due procedimenti diversi, in uno dei quali il trattamento con acido solforico concentrato precede e nell'altro segue la cromatografia su colonna. In genere il trattamento con acido precede la cromatografia su colonna, quando si analizzano estratti molto ricchi di sostanze estranee (13,15,24).

Dopo il trattamento con acido solforico concentrato la soluzione contenente la TCDD viene lavata con acqua o passata su sodio bicarbonato + sodio sol-

fato, per eliminare l'acidità e l'acqua disciolta.

Come precedentemente accennato, la purificazione delle soluzioni contenenti la TCDD è stata realizzata nella maggior parte dei casi mediante cromatografia su colonna di allumina (11, 13+18, 21, 23, 26, 27) con condizioni (dimensioni della colonna, quantità di allumina, tipo di eluente) spesso differenti. Meno usata, per quanto a nostra conoscenza, la cromatografia su colonna di gel di silice (10). E' stata anche descritta una purificazione mediante cromatografia su colonna di allumina seguita da cromatografia su strato sottile di gel di silice (12) e una purificazione mediante cromatografia su colonna di gel di silice seguita da cromatografia su colonna di allumina (22).

La determinazione finale è stata effettuata mediante la sola gas cromatografia a cattura di elettroni (13, 22, 26 28), ma più spesso alla determinazione mediante gas cromatografia a cattura di elettroni fa seguito una conferma dell'identità del picco dosato come TCDD, sulla base dello spettro di massa preso con la tecnica della gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (14+16, 21).

Una elevata sensibilità e specificità di identificazione sono state ottenute con la tecnica della frammentografia di massa (10, 11, 17+19, 23).

Per quanto a nostra conoscenza l'estrazione e la determinazione della TCDD da terreno sono state

descritte in qualche dettaglio in un solo lavoro (28): campioni di terreno da 25 g sono estratti con esano + acetone (1+1, v+v); la fase esanica è trattata con acido solforico concentrato fino ad avere una soluzione incolore, che, dopo neutralizzazione e concentrazione, viene analizzata per gas cromatografia a cattura di elettroni. Per il tipo di analisi da noi effettuate, questo metodo è apparso chiaramente non applicabile sia perchè parte da una quantità di terreno troppo esigua per costituire una campione significativo, sia perchè la purificazione non è del tutto soddisfacente per un sicuro dosaggio specialmente a bassi livelli di concentrazione.

Nei casi da noi affrontati, le difficoltà maggiori sono derivate essenzialmente dal peso del terreno esaminato (da un minimo di 200 g a circa 1000 g) imposto da talune necessità sperimentali, dalla presenza di notevoli quantità di acqua (naturalmente presente nel terreno dopo precipitazioni piovose o aggiunta per esigenze sperimentali) e dall'aggiunta al terreno utilizzato per la sperimentazione di forti quantità di sostanze organiche.

Il caso più frequente è stato quello in cui i tre fattori negativi sopra citati si presentavano congiuntamente. Pertanto i problemi affrontati sono consistiti: a) nel trovare miscele di solventi in grado di garantire una buona estrazione della TCDD anche

da terreni con elevato contenuto di acqua; b) nel mettere a punto un sistema di purificazione in grado di eliminare le forti quantità di materiale coestratto derivante sia dalla mole del campione sia dalle sostanze organiche eventualmente aggiunte; c) nel realizzare tutto il metodo di estrazione e purificazione attraverso un numero limitato di passaggi con impiego di vetreria semplice possibilmente da scartare dopo l'uso.

Per l'estrazione della TCDD da campioni di terreno mancano precisi riferimenti bibliografici riguardo alle condizioni della estrazione e al tipo di solventi più efficaci. Pertanto sono stati provati alcuni solventi sia singoli che in miscela, la scelta dei quali è stata operata anche in analogia a quanto riportato in letteratura circa l'estrazione di alcuni pesticidi clorurati dal terreno (29). I risultati ottenuti con i due sistemi di estrazione dimostratisi più efficaci (metanolo seguito da cloruro di metilene e metanolo seguito da benzolo) sono riportati nella presente nota.

Per l'estrazione della TCDD da campioni costituiti da soluzioni oleose in solvente organico o da soluzioni acquose contenenti alcune o tutte le seguenti sostanze: emulsionante (Tween 80), olio, sostanze nutrienti per microorganismi, si è fatto

ricorso ad una saponificazione con potassio idrossido e estrazione con etere di petrolio.

La purificazione degli estratti è stata realizzata con tre passaggi: a) un trattamento con acido solforico concentrato già descritto da vari Autori, come precedentemente visto; b) passaggio della soluzione su una colonna cromatografica costituita (dall'alto al basso) da uno strato di Celite impregnata di acido solforico, da uno strato di sodio solfato + sodio bicarbonato, da uno strato di gel di silice: questa colonna realizza in un unico semplice passaggio diverse azioni come ad esempio la carbonizzazione di molte sostanze in soluzione, la successiva neutralizzazione della soluzione derivante e la rimozione dalla soluzione stessa della maggior parte delle sostanze più polari; c) cromatografia su colonna di allumina, in condizioni simili a quelle descritte da altri Autori.

Nei casi affrontati la determinazione finale della TCDD è stata effettuata mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni, usando per l'identificazione due colonne a polarità differente. Alcune delle analisi effettuate sono state ripetute mediante frammentografia, seguendo i tre ioni con valore $m/e = 320, 322, 324$.

P A R T E S P E R I M E N T A L E

Apparecchi e reattivi

1. Gascromatografo con rivelatore a cattura di elettroni
2. Colonna cromatografica multistrato (vetro: 30 cm x 20 mm d.i.): Preparare a secco come segue (dal basso in alto): batuffolo di cotone idrofilo; sodio solfato anidro per un'altezza di circa 1 cm; gel di silice per circa 1,5 cm; miscela sodio bicarbonato + sodio solfato anidro (1+9, p/p) per circa 1,5 cm; miscela Celite + acido solforico conc. per circa 5 cm (mescolare in mortaio g 6,0 di Celite e ml 4 di acido solforico conc., poi comprimere questa miscela nella colonna); chiudere la colonna con uno strato di sodio solfato anidro di circa 1,5 cm.
3. Colonna cromatografica di allumina (colonna in vetro con rubinetto in Teflon, 40 cm x 22 mm d.i.): preparare in etere di petrolio con 16 g di allumina, coperta con uno strato di sodio solfato anidro di circa 2 cm.
4. Evaporatore rotante.
5. Palloni da 1 litro con cono a smeriglio.
6. Pipette Pasteur.
7. Allumina neutra Merk grado I sec. Brockmann.
8. Celite 545 lavata con acido.

9. Gel di silice 70-320 mesh: da usare senza attivazione.
10. Sodio solfato anidro per analisi.
11. Sodio bicarbonato per analisi.
12. Cotone idrofilo sgrassato.
13. Etere di petrolio.
14. Cloruro di metilene.
15. Benzene.
16. Potassio idrossido.
17. 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina standard (gentilmente fornita dalla Rochester University, N.Y., U.S.A.

a) Procedimento di estrazione

- a.1) Estrazione da campioni di terreno con eventuale aggiunta di materiale organico vario.

Il campione del peso di circa 400 g, contenuto in un becker di capacità opportuna, viene estratto due volte con metanolo (200 ml per volta) e quattro volte con 400 ml di cloruro di metilene per volta. Nel caso di campioni molto umidi è utile lasciarli asciugare all'aria. Si agita ogni volta con una bacchettina di vetro per non meno di cinque minuti, lasciando decantare e filtrando in un pallone da 1 litro attraverso filtro di carta a pieghe. Si effettuano ovviamente delle concentrazioni intermedie. Alla fine la soluzione viene portata a piccolo volume in evaporatore rotante e poi a secco per rotazione manuale del pallone.

a.2) Estrazione da soluzioni acquose contenenti alcune o tutte le seguenti sostanze: olio, emulsionante (Tween 80) e sostanze nutritive.

Al campione in esame, contenuto in beuta, viene aggiunto metà del suo volume di metanolo e potassio idrossido fino a rendere la soluzione 2N. Si fa bollire a ricadere per 1-2 ore e, dopo raffreddamento, si estrae direttamente nella beuta per dibattimento con 6 x 100 ml di etere di petrolio. Gli estratti eteri pipettati o sifonati vengono raccolti in un pallone da 1 litro e evaporati a piccolo volume in evaporatore rotante. Nel caso si formassero emulsioni nella fase di estrazione, è utile aggiungere del metanolo sotto forma di getto sottile.

b) Trattamento con acido solforico concentrato.

Nel pallone contenente il residuo derivante dall'estrazione di cui ai punti a.1) o a.2) precedenti, si aggiungono 20 ml di etere di petrolio per ottenerne per quanto possibile la solubilizzazione.

Si aggiungono poi lentamente 5 ml di acido solforico concentrato facendolo scendere lungo le pareti del pallone. Con dei movimenti di rotazione si cerca di portare l'acido a contatto con il materiale aderente alle pareti per carbonizzarlo. A questo punto si aggiungono altri 20 ml di etere di petrolio.

Si versa ora a piccole porzioni, agitando di frequente sodio solfato anidro nel pallone fino ad ottenere una massa semisolidi quasi concreta, che consenta di aspirare agevolmente l'etere surnatante con una pipetta di Pasteur. Tuttavia la massa deve essere ancora abbastanza scorrevole da poter essere lavata con successive porzioni di etere di petrolio.

c) Passaggio sulla colonna cromatografica multistrato

Si lava preventivamente la colonna con circa 40 ml di etere di petrolio.

La prima aliquota di etere di petrolio derivante dal punto b) precedente viene portata sulla colonna, iniziando la raccolta in una beuta da 250 ml. Si effettuano successivi lavaggi del pallone da 1 litro con aliquote da 10-15 ml di etere di petrolio, curando di ottenere un adeguato contatto tra il solvente e la massa semisolidi contenuta nel pallone. Si proseguono i lavaggi fino a raccogliere 150 ml di eluente. Nel caso in cui si forma sulla colonna un abbondante strato di materiale carbonizzato, è opportuno rimiscolarlo con una bacchettina di vetro. La soluzione raccolta viene concentrata a piccolo volume (circa 5-10 ml).

d) Cromatografia su colonna di Allumina.

La soluzione proveniente dal punto c) precedente viene trasferita quantitativamente sulla colonna di allumina, effettuando i lavaggi con etere di petrolio. La colonna viene eluita dapprima con 100 ml di miscela al 9% (v/v) di cloruro di metilene in etere di petrolio, scartando questa frazione, e poi con 100 ml di cloruro di metilene. Questa seconda frazione, portata cautamente a secco e diluita con etere di petrolio fino a volume opportuno è destinata all'analisi gascromatografica.

e) Determinazione gascromatografica con rivelatore a cattura di elettroni.

Sono state adottate le seguenti condizioni: colonna in vetro 1,8 m x 4 mm d.i. riempita con OV-17 1,5% + QF-1 1,95% su Chromosorb W-HP 100-120 mesh; temperature: iniettore 280°C, colonna 210°C, rivelatore 300°C; flusso gas di trasporto: azoto 45 ml/min. Saturare la colonna con ripetute iniezioni di soluzione standard di TCDD fino ad ottenere risposte costanti e riproducibili. La determinazione della TCDD, contenuta nella soluzione derivante da d) si effettua per confronto dell'area del picco identificato come TCDD con quella ottenuta iniettando una quantità nota del composto di riferimento. Le soluzioni sono eventualmente rianalizzate utilizzando una colonna riempita con una fase a polarità differente, quale SE-30 5% o OV-61 5%.

(Il gas in uscita dal rivelatore viene fatto passare attraverso una trappola a carbone attivo per bloccare la TCDD).

Risultati e Discussione

Per l'estrazione dei campioni di terreno sono stati sperimentati e confrontati due diversi sistemi di solventi. Il primo (metanolo + cloruro di metilene) è quello descritto nella parte sperimentale. Il secondo è del tutto analogo con l'unica variazione della sostituzione del benzene al posto del cloruro di metilene. Il processo di purificazione è identico in entrambi i casi.

I valori di recupero ottenuti con il primo sistema di estrazione sono riportati nella Tabella I. Le prove sono state condotte aggiungendo 20 microgrammi di TCDD sotto forma di soluzione benzenica, a campioni di terreno del peso di circa 400 g. Le determinazioni sono state effettuate in un periodo di tempo compreso tra 10 e 90 giorni dal momento dell'aggiunta. Il valore medio di recupero è stato di 90,1% con una deviazione standard di $\pm 4,4\%$.

I valori di recupero ottenuti utilizzando il secondo sistema di solventi sono riportati nella Tabella II. Sono state effettuate due serie di prove aggiungendo a campioni del peso di circa 200 grammi,

Tabella I - Determinazione della TCDD in campioni di terreno del peso di circa 400 g. Estrazione con metanolo seguito da cloruro di metilene.

N. camp.	TCDD aggiunta (μg)	TCDD trovata (μg)	Recupero %
1	20	18,6	93,0
2	20	17,0	85,0
3	20	17,7	88,5
4	20	18,7	93,5
5	20	18,1	90,5
6	20	16,9	84,5
7	20	18,3	91,5
8	20	18,1	90,5
9	20	18,5	92,5
10	20	18,4	92,0
11	20	18,8	84,0
12	20	17,2	86,0
13	20	19,8	99,0
14	20	19,0	95,0
15	20	17,2	86,0
media			90,1%
dev.st.			<u>+4,4%</u>

Tabella II - Determinazione della TCDD in campioni di terreno del peso di circa 200 g. Estrazione con metanolo seguito da benzene.

N. camp.	TCDD aggiunta (μg)	TCDD trovata (μg)	Recupero %
1	10	8,1	81,0
2	10	8,1	81,0
3	10	8,9	89,0
4	10	8,6	86,0
5	10	7,8	78,0
6	10	7,7	77,0
7	10	8,4	84,0
8	10	9,6	96,0
9	10	8,7	87,0
10	10	8,3	83,0
			media 84,2%
			dev.st. <u>+5,6%</u>
11	16,38	12,7	77,5
12	16,38	12,8	78,2
13	16,38	15,5	94,6
14	16,38	15,4	94,0
15	16,38	16,3	99,5
16	16,38	15,3	93,4
17	16,38	15,2	92,8
18	16,38	14,8	90,4
			media 90,1%
			dev.st. <u>+7,9%</u>

rispettivamente 10 microgrammi e 16,38 microgrammi di TCDD. Le determinazioni sono state effettuate in un periodo di tempo compreso tra 10 e 90 giorni dall'aggiunta della TCDD. Si sono ottenuti valori medi di recupero di 84,2% al livello di 10 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ e 90,1% al livello di 16,38 $\mu\text{g}/200\text{ g}$.

Dal confronto dei valori ottenuti con i due sistemi di solventi appare che il sistema di estrazione con metanolo seguito da cloruro di metilene è preferibile per i migliori valori di recupero trovati.

Allo scopo di controllare la validità della estrazione, alcuni campioni di terreno naturalmente contaminato, nei quali con la metodologia normale sopra descritta era stato riscontrato un livello di contaminazione di TCDD pari a 0,05 ppm, sono stati sottoposti ad una seconda serie di estrazioni con quattro porzioni da 400 ml di cloruro di metilene o benzene. Con questa seconda serie di estrazioni è stato possibile recuperare ancora un ulteriore 5÷8% della TCDD trovata nell'analisi normale.

L'uso del metanolo nell'estrazione del terreno consente di ottenere una completa disgregazione della massa del campione per semplice agitazione con bacchetta di vetro, senza dover far ricorso ad omogeneizzatori meccanici. Si ottiene, inoltre, l'eliminazione di buona parte dell'acqua dal terreno, il che facilita la sedimentazione del terreno e la decantazione dell'estratto.

Per quanto riguarda campioni costituiti da soluzioni acquose contenenti sostanze diverse (ad esempio: olio, emulsionante, terreni per coltura microbica), nella Tabella III sono riportati i risultati di due serie di analisi effettuate su miscele che contenevano rispettivamente 8,19 microgrammi e 11,48 microgrammi di TCDD in circa 300 ml della soluzione sperimentata. I valori di recupero sono più dispersi di quelli ottenuti nelle analisi relative a estrazioni da campioni di terreno, il che riflette

Tabella III - Determinazione della TCDD in emulsioni acquose. Estrazione da miscele di saponificazione con etere di petrolio.

N. camp.	TCDD aggiunta (μg)	TCDD trovata (μg)	Recupero %
1	8,19	7,7	94,0
2	8,19	8,1	98,9
3	8,19	7,5	91,6
4	8,19	7,0	85,5
5	8,19	4,7	57,4
			media 85,5%
			dev.st. $\pm 16,4$
6	11,48	10,4	90,6
7	11,48	10,9	95,0
8	11,48	8,4	73,2
9	11,48	8,9	77,5
10	11,48	8,7	75,8
11	11,48	7,5	65,3
12	11,48	9,5	82,8
13	11,48	7,6	66,2
14	11,48	8,7	75,8
15	11,48	10,0	87,1
16	11,48	8,4	73,2
17	11,48	9,3	81,0
18	11,48	10,9	95,0
19	11,48	10,7	93,2
			media 80,8%
			dev.st. 10,1%

molto verosimilmente una certa difficoltà nel recupero della TCDD da soluzioni contenenti un emulsificante a causa delle emulsioni che a volte sono difficili da eliminare completamente.

Quanto alla prepurificazione adottata, si può dire che il trattamento con acido solforico concentrato e il passaggio sulla colonna multistrato sono in grado di rimuovere dall'estratto la maggior parte delle sostanze coestratte, dando luogo ad una soluzione generalmente incolore già sufficientemente purificata.

Anche se il volume di eluizione della TCDD, quando venga applicata sulla colonna multistrato in unica soluzione, è di circa 50 ml, è consigliabile, tuttavia, raccogliere un volume maggiore (150 ml) di eluente per tener conto del fatto che l'applicazione avviene, in pratica, in modo frazionato e di possibili variazioni nelle caratteristiche cromatografiche dei materiali impiegati nella colonna.

La colonna multistrato non è in grado di distruggere e/o trattenere alcune sostanze che possono trovarsi come contaminanti in un terreno e che potrebbero interferire nella determinazione della TCDD, quali ad esempio i bifenili policlorurati (PCB), il DDT e il DDE. Pertanto le soluzioni contenenti la TCDD sono state purificate mediante la cromatografia sulla colonna di allumina descritta. Prove effettuate con composti puri hanno mostrato che nella prima frazione

che viene scartata, sono eluiti i PCB e i pesticidi clorurati più comuni tra i quali il DDT e il DDE. La seconda frazione, nella quale viene eluita la TCDD, è risultata sempre adeguatamente purificata, anche nel caso di campioni particolarmente ricchi di materiale organico estratto. Anzichè una "microcolonna", come descritto da alcuni Autori (17, 18, 27), si è preferito far uso, per la cromatografia su allumina, di una colonna a diametro più grande, perchè solo così è stato possibile purificare anche quegli estratti che contenevano forti quantità di composti organici poco polari non trattenuti nel passaggio sulla colonna multistrato.

Nei casi affrontati, in cui la quantità di TCDD (artificialmente aggiunta o naturalmente presente) è stata dell'ordine di 10-20 microgrammi in campioni di terreno o soluzioni di peso variante da 200 a 400 g circa, la determinazione finale è stata effettuata mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni. Per una più sicura identificazione le analisi possono essere eventualmente effettuate su due colonne gascromatografiche a polarità differente. Ai livelli di concentrazione ai quali si è operato e nei campioni esaminati, il rapporto TCDD/impurezze è stato sempre tale da consentire una univoca identificazione e una sicura determinazione della TCDD. Alcuni dei risultati ottenuti sono stati periodicamente controllati mediante frammentografia seguendo i tre ioni con

valore m/e = 320, 322, 324. I valori così trovati sono risultati in accordo con quelli ottenuti con la gascromatografia. Un tipico gascromatogramma (campione n. 14 della Tab. I) è mostrato nella figura 1. Nella figura 2 è mostrato, invece, il gascromatogramma relativo ad un campione di terreno naturalmente contaminato da TCDD al livello di 0,087 ppm.

I volumi di solventi, così come indicati al punto a.1) della parte sperimentale, sono adatti per campioni di terreno del peso di circa 400 g. Tuttavia alcuni campioni, il cui peso oscillava da 800 a 1000 g, sono stati estratti efficacemente con la stessa tecnica, semplicemente adoperando aliquote di solventi di 400 ml. Invece lo schema di purificazione descritto si è dimostrato efficace anche in questi casi senza alcuna variazione.

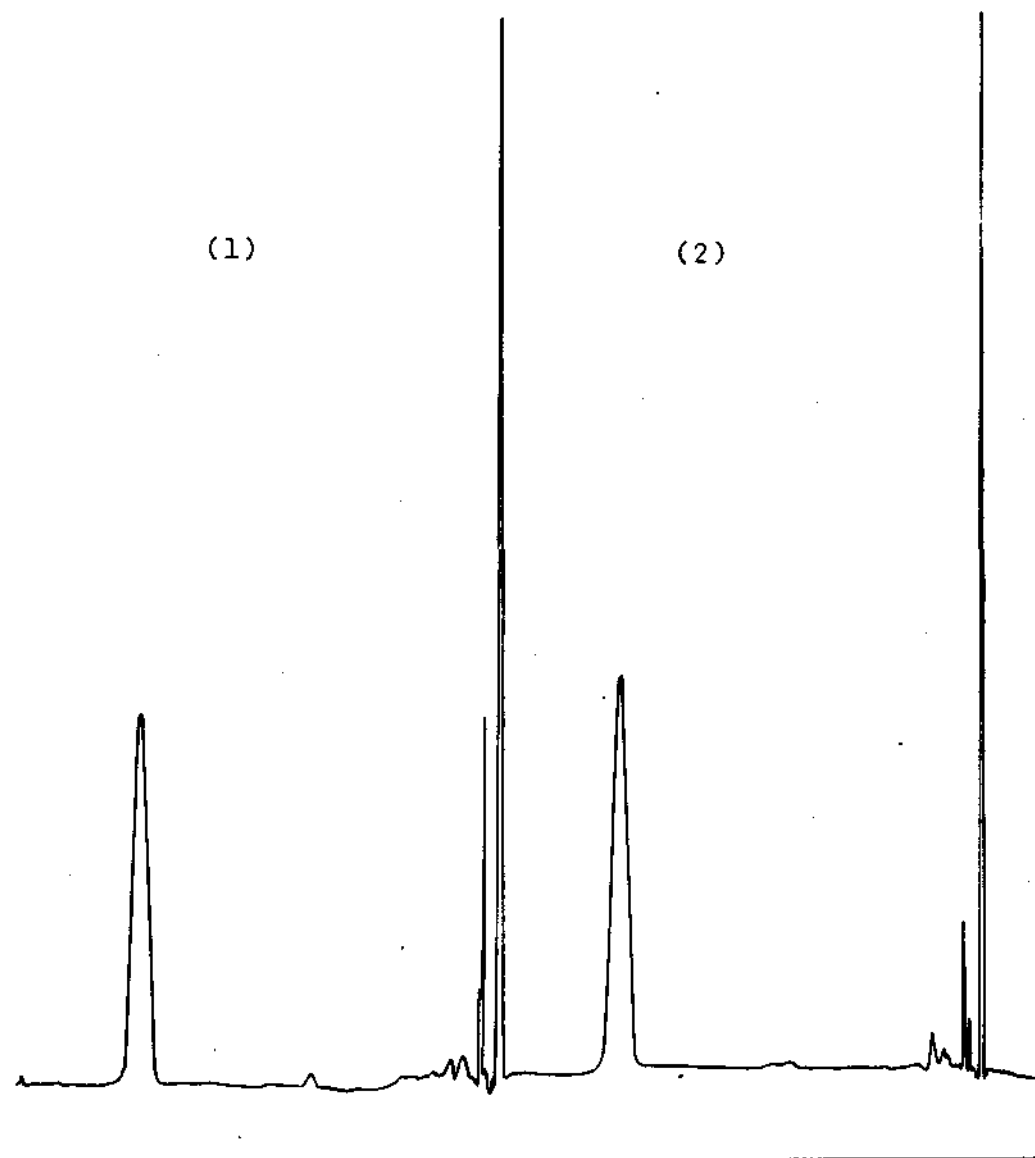


Fig. 1 - (1) - Standard TCDD 1 ng.

(2) - Campione n. 14 della Tab. I: vol. finale
40 ml, vol. iniettato 2 microlitri. Colonna
OV 17 + QF 1. Condizioni gascromatografiche:
vedi parte sperimentale.

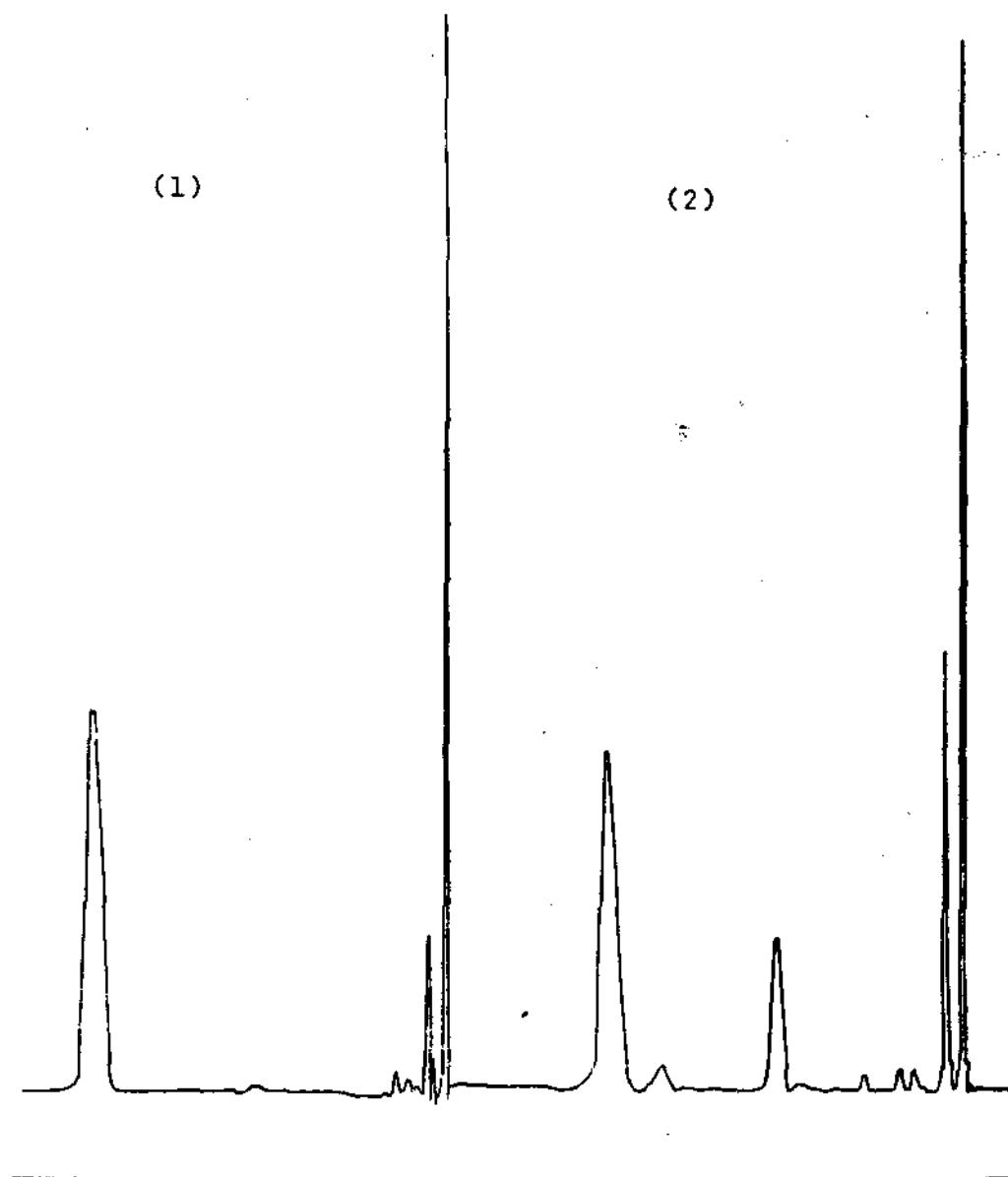


Fig. 2 - (1) - Standard TCDD 1 ng.

(2) - Campione di terreno naturalmente contaminato da TCDD al livello di 0,087 p.p.m.:
volume finale 40 ml, volume iniettato 2 microlitri. Colonna OV 17 + QF 1. Condizioni gascromatografiche: vedi parte sperimentale.

Nota: Data l'estrema tossicità della TCDD, tutto il lavoro analitico va eseguito adottando particolari cautele, quali l'uso di guanti durante tutte le manipolazioni, di camici a perdere e di mascherine di carta quando si maneggia terreno contaminato. E' necessario lavorare su superfici rivestite con fogli di plastica e fogli di carta da filtro. All'uscita del rivelatore a cattura di elettroni deve essere predisposto un sistema di aspirazione del gas effluente, che va fatto passare attraverso un tubo di adsorbimento a carbone attivo. In dipendenza del tipo di campione che si maneggia, occorre inoltre adottare tutti quegli accorgimenti intesi ad evitare ogni possibile contaminazione da parte delle TCDD. Il materiale eventualmente contaminato deve essere raccolto e decontaminato in modo idoneo.

B I B L I O G R A F I A

1. HIGGINBOTHAM,G.R., UANG,A., FIRESTONE,D., VERRET,J., RESS,J., CAMPBELL,A.D. 1968. Chemical and Toxicological Evaluations of Isolated and Syntethic Chloro Derivatives of Dibenzo-p-dioxin.
Nature 220: 702-703.
2. NIEHS.1973. Conference on the Toxicity of the Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans, April 2-3,1973, Research Triangle Park, N.C.
Environ.Health Perspec. (Exp.Issue)5.
3. SCHWETZ,B.A., NORRIS,J.M., SPARSCHU,G.L., ROWE,V.K., GEHRING,P.J., EMERSON,J.L., GERBIG,C.G.1973. Toxicology of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins.
Advan.Chem.Ser. 120:55-69.
4. PLIMMER,J.R., KLINGBIEL,U.I., CROSBY,D.G.,WONG, A.S. 1973. Photochemistry of Dibenzo-p-dioxin.
5. STEHL,R.H., PAPENNFUSS,R.R., BREDEWEG,R.A.,ROBERTS R.W.1973. The stability of Pentachlorophenol and Chlorinated Dioxins to Sunlight,Heat and Combustion.
Advan.Chem.Ser. 120:119-125.
6. CROSBY,D.G.,WONG,A.S.1977. Environmental Degradation of 2,3,7,8-Tatrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).
Science 195:1337-1338.
7. KEARNEY,P.C., ISENSEE,A.R., HELLING,C.S., WOOLSON, E.A., PLIMMER, J.R.1973. Environmental Significance

of Chlorodioxins.

Advan.Chem.Ser. 120:105-111.

8. MATSUMURA, F., BENEZET, H.J. 1973. Studies on the Bio-accumulation and Microbial Degradation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
9. BRENNER, K.S., MÜLLER, K., SATTEL, P. 1972. Nachweis und Bestimmung von 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in chlorsubstituierten Phenoxyalkansäuren. J.Chromat. 64:39-48.
10. CRUMMETT, W.B., STEHL, R.H. 1973. Determination of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Various Materials. Environ.Health Perspec.(Exp.Issue) 5:15-25.
11. BUSER, H.R., BOSSHARDT, H.P. 1974. Determination of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin at parts per billion levels in Technical-Grade 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid, in 2,4,5-T-alkylester and 2,4,5-T-amine Salt Herbicide Formulations by Quadrupole Mass-Fragmentography. J.Chromat. 90:71-77.
12. VOGEL, H., WEEREN, R.D. 1976. Bestimmung von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure. Z.Anal.Chem. 280:9-13.
13. ELVIDGE, D.A., 1971. The Gas-Chromatographic Determination of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in

- 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid ("2,4,5-T"),
2,4,5-T Ethylhexyl Ester, Formulations of
2,4,5-T Esters and 2,4,5-Trichlorophenol.
Analyst 96:721-727.
14. EDMUNDS, J.W., LEE, D.F., NICKELS, C.M.L. 1973.
Determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-
dioxin in 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid and
2,4,5-T Alkyl Ester Herbicides.
Pestic.Sci. 4:101-105.
15. Woolson, E.A., THOMAS, R.F., ENSOR, P.D., J. 1972.
Polychlorodibenzo-p-dioxin content in Selected
Pesticides.
J.Agr.Food Chem. 20:351-354.
16. FIRESTONE, D., RESS, J., BROWN, N.L., BARRON, R.P.,
DAMICO, J.N. 1972. Determination of Polychlorodi-
benzo-p-dioxins and Related Compounds in Commer-
cial Chlorophenols.
J.Ass.Off.Anal.Chem. 55:85-92.
17. BUSER, H.R. 1975. Analysis of Polychlorinated
Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Chlori-
nated Phenols by Mass Fragmentography.
J.Chromat. 107:295-310.
18. BUSER, H.R., BOSSHARDT, H.P. 1976. Determination of
Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzo-
furans in Commercial Pentachlorophenols by Combi-
ned Gas Chromatography-Mass Spectrometry.
J.Ass.Off.Anal.Chem. 59:562-569.

19. BLASER, W.W., BREDEWEG, R.A., SHADOFF, L.A., STEHL, R.H. 1976. Determination of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins in Pentachlorophenol by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.
Anal. Chem. 48:984-986.
20. PFEIFFER, C.D. 1976. Determination of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins in Pentachlorophenol by Liquid Chromatography.
J. Chromat. Sci. 14:386-391.
21. VILLANUEVA, E.C., JENNINGS, R.W., BURSE, V.W., KIMBROUGH, R.D. 1974. Evidence of Chlorodibenzo-p-dioxin and Chlorodibenzofuran in Hexachlorobenzene.
J. Agr. Food Chem. 22:916-917.
22. WEBBER, T.J.N., BOX, D.G. 1973. The Examination of Tetrachlorvinphos and its Formulations for the presence of Tetrachlorodibenzo-p-dioxins by Gas-Liquid Chromatographic Method.
Analyst 98: 181-189.
23. BANHMAN, R., MESELSON, M. 1973. An Analytical Method for Detecting TCDD (Dioxin): Levels of TCDD in Samples from Vietnam.
Environ. Health Perspec. (Exp. Issue) 5:27-35.
24. Officials Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 12th Ed., Association of Official Chemists, Washington, D.C., 1975, Sect. 28.118, pp. 511-512.

25. Pesticide Analytical Manual, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland 20852. 1971. Vol. 1, sect. 211.15.
26. PORTER, M.L., BURKE, A. 1971. Separation of Three Chlorodibenzo-p-dioxins from Some Polychlorinated Biphenyls by Chromatography on an Aluminum Oxide Column.
J. Ass. Off. Anal. Chem. 54:1426-1428.
27. WILLIAMS, D.T., BLANCHFIELD, B.J. 1972. An Improved Screening Method for Chlorodibenzo-p-dioxins.
J. Ass. Off. Anal. Chem. 55:1358-1359.
28. WOOLSON, E.A., ENSOR, P.D.J., REICHEL, W.L., YOUNG, A.L. 1973. Dioxin Residues in Lakeland Sand and Bald Eagle Samples.
Advan. Chem. Ser. 120:112-114.
29. CHIBA, M., MORLEY, H.V. 1968. Factors Influencing Extraction of Aldrin and Dieldrin Residues from Different Soil Types.
J. Agr. Food Chem. 16:916-922.

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici pubblicati nei "Rapporti ISTISAN" è dei singoli autori.

La data riportata in copertina a piè pagina è quella della consegna alla tipografia del testo pronto per la stampa.

La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN" deve essere preventivamente autorizzata dai competenti Direttori di Laboratorio o Servizio.

A cura del Servizio Documentazione dell'Istituto
Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, Roma.