

# **Rassegna critica delle metodologie disponibili per la determinazione di idrocarburi policiclici aromatici in lieviti essiccati, nei substrati usati per la produzione dei lieviti ed in diversi prodotti alimentari**

ALFONSO DI MUCCIO, LUIGI BONIFORTI e MIRELLA DELISE (\*)

*Laboratorio di Tossicologia*

## **PARTE GENERALE**

Molti degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) noti sono stati riconosciuti come potenti agenti cancerogeni [1] e, di conseguenza, questa classe di composti è stata oggetto di numerosissimi lavori sperimentali sia da un punto di vista cancerogenetico, che qui non sarà considerato, che da un punto di vista analitico. Le formule di alcuni tra i più comuni idrocarburi policiclici sono riportate in Fig. 1 e 2. Diverse rassegne hanno trattato dei problemi connessi con l'origine e la presenza nell'ambiente umano degli idrocarburi policiclici aromatici [2-5], così come dei problemi relativi all'estrazione, isolamento, identificazione e dosaggio di questi composti in vari materiali [6-8].

L'analisi qualitativa e quantitativa dei PAH è un problema di notevole impegno per la bassa concentrazione alla quale questi idrocarburi possono essere presenti in prodotti diversi e per il notevole numero di composti indesiderati che qualsiasi sistema di estrazione inevitabilmente si trascina dietro. Come in tutti i casi in cui si vogliono determinare quantità piccolissime di sostanze in una matrice organica complessa, l'intero procedimento analitico può essere suddiviso schematicamente in quattro passaggi fondamentali: 1) estrazione; 2) purificazione dell'estratto con arricchimento selettivo della frazione che interessa; 3) separazione dei singoli costituenti della frazione e identificazione; 4) determinazione. Si può dire che tutte le tecniche analitiche, in varie combinazioni, sono state applicate all'analisi dei PAH in prodotti diversi quali ad esempio: condensato del fumo di sigarette, cibi affumicati, olii minerali e residui di distillazione del petrolio, sedimenti marini, inquinanti atmosferici, prodotti alimentari.

---

(\*) Borsista del Laboratorio di Tossicologia.

Saranno qui di seguito esaminate le possibilità più significative che si presentano riguardo ai quattro passaggi analitici sopra citati, tenendo in evidenza che l'interesse di questa nota è principalmente rivolto alla determinazione dei PAH nelle farine proteiche da organismi unicellulari cresciuti su n-alcani, negli n-alcani usati come substrato per questi lieviti e in prodotti alimentari.

#### ESTRAZIONE

Questo processo, come è evidente, dipende fortemente dalla natura del materiale dal quale si devono estrarre i PAH.

Nel caso di olii minerali bianchi, di n-alcani, di olii vegetali e, in genere, di tutti i prodotti solubili senza residuo in solventi idrocarburici, il procedimento di estrazione più semplice consiste nel solubilizzare una quantità opportuna di questi prodotti in cicloesano o in isoottano ed effettuare una ripartizione contro un solvente immiscibile quale il dimetilsolfossido (DMSO) o la dimetilformammide (DMF). Così Grimmer e Hildebrandt [9] e Grimmer e Böhnke [10] usano la ripartizione liquido - liquido tra cicloesano e DMF + H<sub>2</sub>O (9 : 1, v/v) per l'estrazione dei PAH da olii e grassi vegetali. I PAH si concentrano nella fase DMF + H<sub>2</sub>O, dalla quale sono riestratti con cicloesano previa diluizione con acqua. Analogo tipo di ripartizione è usato da Walleave [11] per l'analisi dei PAH in asfalti di petrolio e pece di catrame di carbone nell'ambito di uno studio sugli effetti cancerogeni di asfalti e peci sulla pelle di ratto. La ripartizione tra isoottano e DMSO è stata impiegata da Howard e Coll. [12] per l'estrazione dagli olii vegetali; da Howard e Coll. [13] e da Lijinsky e Coll. [14] per l'estrazione da *petroleum waxes* per uso di additivo alimentare; da Mc Ginnis [15] per l'estrazione dei PAH da n-alcani usati come substrato per la crescita di lieviti. I PAH si concentrano nel DMSO, dal quale sono estratti con isoottano previa diluizione con acqua.

Popl e Coll. [16] hanno usato la eluizione frontale su colonna di gel di silice per la concentrazione preliminare dei PAH da n-alcani usati per la crescita di lieviti. La tecnica consiste nel far passare le n-paraffine su un adsorbente che trattiene i PAH, nel lavare la colonna con pentano e eluire i PAH con etere etilico. Il procedimento ha lo svantaggio di essere un po' lungo: il passaggio di 1000 ml di campione sotto leggera pressione richiede circa 10 ore.

Per quanto riguarda prodotti concreti e non solubili in solventi idrocarburici (lieviti essiccati e prodotti alimentari diversi) l'estrazione deve tener conto delle interazioni dei PAH con i costituenti dei prodotti che si esaminano. Sciabad [17] rileva che l'estrazione di lieviti essiccati con isoottano in Soxhlet per 3 ore è insufficiente, poiché nelle cellule dei microorganismi gli idrocarburi policiclici si accumulano in primo luogo nelle inclusioni grasse

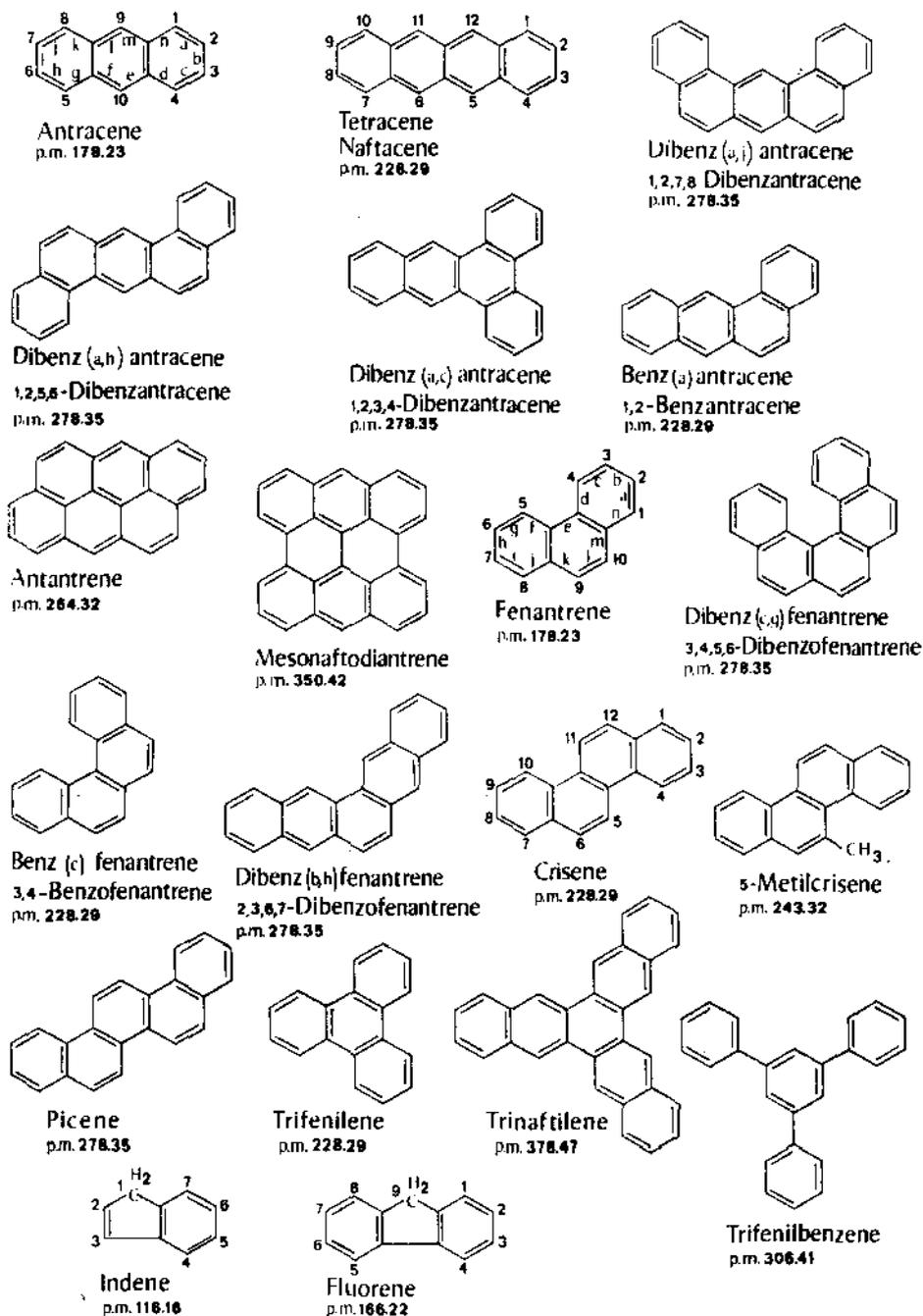
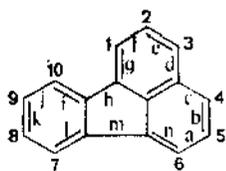
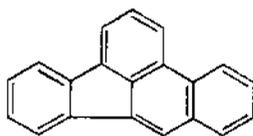


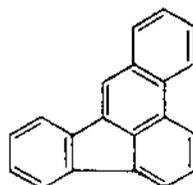
Fig. 1. — Alcuni idrocarburi policiclici aromatici.



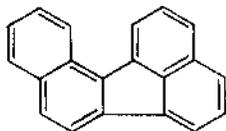
**Fluorantene**  
p.m. 202.25



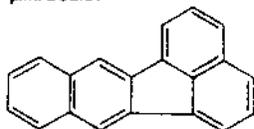
**Benz (b) fluorantene**  
4,5-Benzofluorantene  
p.m. 252.31



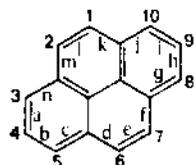
**Benz (e) fluorantene**  
2,3-Benzofluorantene  
p.m. 252.31



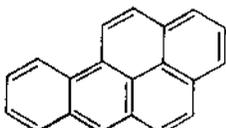
**Benz (j) fluorantene**  
9,10-Benzofluorantene  
p.m. 252.31



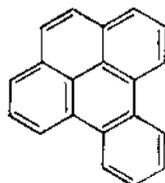
**Benz (k) fluorantene**  
8,9-Benzofluorantene  
p.m. 252.31



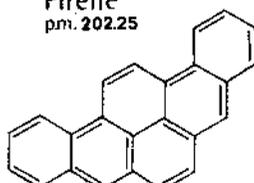
**Pirene**  
p.m. 202.25



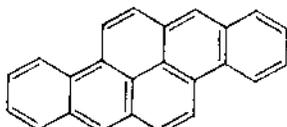
**Benz (a) pirene**  
3,4-Benzopirene  
p.m. 252.31



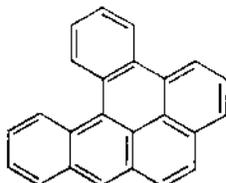
**Benz (e) pirene**  
1,2-Benzopirene  
p.m. 252.31



**Dibenz (a,i) pirene**  
3,4,9,10-Dibenzopirene  
p.m. 302.37



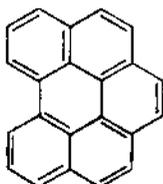
**Dibenz (h,i)pirene**  
3,4,8,9-Dibenzopirene  
p.m. 302.37



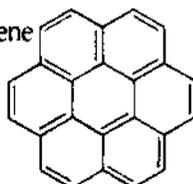
**Dibenz (a,j)pirene**  
1,2,3,4-Dibenzopirene  
p.m. 302.37



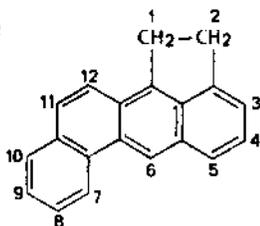
**Perilene**  
p.m. 252.31



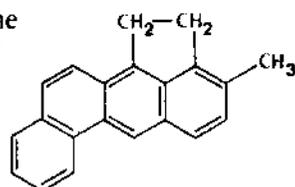
**Benz (ghi)perilene**  
1,12-Benzoperilene  
p.m. 276.34



**Coronene**  
p.m. 300.36



**Colantrene**  
p.m. 254.33



**3-Metilcolantrene**  
p.m. 268.36

Fig. 2. — Alcuni idrocarburi policiclici aromatici.

libere e, quindi, nelle strutture cellulari fosfolipidiche (nelle membrane citoplasmatiche, nei mitocondri, nelle membrane nucleari), formando complessi stabili con le proteine e sciogliendosi nei lipidi. Grimmer e Böhnke [10] hanno dimostrato che nel caso di alimenti a base proteica l'estrazione con metanolo caldo è in grado di recuperare non più del 30 % dei PAH, mentre saponificando il residuo dell'estrazione, si può recuperare ancora un 60 % dei PAH. Dal che gli AA. concludono che per isolare quantitativamente i PAH da campioni insolubili l'idrolisi è una necessità assoluta. Così per l'estrazione dei PAH dai lieviti, Grimmer e Hildebrandt [9] e Archibald e Cochrane [18] usano una saponificazione con potassa alcoolica 2 N che, tuttavia, lascia dei residui non disciolti, che vanno filtrati su batuffolo di lana di vetro e lavati con metanolo; i PAH sono estratti con cicloesano dalla miscela di saponificazione. Mc Ginnis e Norris [19] pongono l'accento sulla necessità di una completa dissoluzione dei lieviti per poter realizzare una buona estrazione dei PAH, in quanto vi è la possibilità che questi composti si trovino entro la parete cellulare; per solubilizzare completamente i lieviti questi AA. usano aggiungere il campione in piccole porzioni a una miscela di potassa idroalcoolica (600 ml di  $H_2O$  + 120g di KOH + 100 ml di EtOH per 200g di lieviti) a temperatura di circa 80–85 °C sotto agitazione; i PAH sono estratti con isoottano dalla miscela di saponificazione.

Per quanto riguarda gli alimenti in genere e i tessuti animali e vegetali, il trattamento adottato da quasi tutti gli AA. è una saponificazione con potassa alcoolica seguita da estrazione con cicloesano o isoottano. Il coefficiente di ripartizione tra cicloesano e  $MeOH + H_2O$  (4 : 1, v/v) è dell'ordine di 15–18 per molti PAH [6], il che significa un recupero praticamente totale con tre estrazioni. La saponificazione con potassa alcoolica per gli alimenti è prevista dal metodo di Grimmer e Böhnke [10] e dal metodo ufficiale dell'A.O.A.C. [20], il quale ultimo condensa un po' i numerosi lavori pubblicati dai ricercatori americani [12, 13, 21–26].

Alla luce di quanto sopra esposto è da ritenersi che l'estrazione in Soxhlet con pentano adottata da Schamp e Vanwassenhove [27] per tessuti vegetali o quella con esano a ricadere usata da Hertel e Coll. [28] per la farina non siano adeguate al problema.

#### PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO

Per la purificazione degli estratti contenenti i PAH sono state impiegate ripartizioni tra solventi, tecniche cromatografiche (su colonna, su strato sottile, gel cromatografia) e formazione di complessi per trasferimento di carica; più spesso sono state impiegate varie combinazioni di queste tecniche.

Il metodo ufficiale dell'A.O.A.C. [20] prevede: una purificazione dello estratto in isoottano per cromatografia su colonna di Florisil disattivato con

metanolo dalla quale i PAH sono eluiti con benzene e riportati in soluzione di isoottano; un trattamento di questa soluzione con acido fosforico per rimuovere i pigmenti; infine, una ripartizione tra isoottano e DMSO e una estrazione dal DMSO per ritornare ad una soluzione isoottanica. Questo procedimento è stato, tuttavia, criticato da Mc Ginnis [15] il quale sostiene che il trattamento con acido fosforico potrebbe portare a perdite; occorre, inoltre, aspettare circa un'ora per avere una buona separazione delle fasi nel primo lavaggio con acido fosforico [12]. Mc Ginnis e Norris [19] fanno poi rilevare che l'uso del Florisil è alquanto critico, in quanto questo materiale è difficile da standardizzare; il suo comportamento cromatografico e i recuperi dei PAH devono essere controllati periodicamente con degli standard; infatti il Florisil disattivato con metanolo, conservato per un certo tempo, aumenta notevolmente di attività, a seguito di una diminuzione incontrollata del metanolo adsorbito su di esso; ciò porta ad un abbassamento del recupero cromatografico dei PAH.

Grimmer e Böhnke [10] adottano i seguenti passaggi per la purificazione del loro estratto cicloesanoico: 1) ripartizione dell'estratto tra cicloesano e DMF + H<sub>2</sub>O (9 : 1) (2 estrazioni); 2) cromatografia su colonna di gel di silice contenente il 15 % di acqua aggiunta, usando cicloesano come eluente; 3) gel cromatografia su colonna di Sephadex LH-20 con eluente isopropanolo.

Il procedimento di purificazione adottato da Grimmer è abbastanza esemplificativo e serve bene come traccia per la discussione delle tecniche che possono essere usate per la purificazione degli estratti contenenti i PAH.

Nella ripartizione cicloesano/DMF+H<sub>2</sub>O i PAH si sciolgono preferenzialmente nella fase DMF+H<sub>2</sub>O, mentre la maggior parte delle impurezze liposolubili preferiscono il cicloesano; perciò si scarta la fase cicloesanoica e si riestrangono i PAH con cicloesano dalla fase DMF+H<sub>2</sub>O previa diluizione con acqua; con questo passaggio il peso del residuo dell'estratto si abbassa a circa il 10 % del valore iniziale e ciò consente nel successivo passaggio l'impiego di una colonna cromatografica di diametro ridotto con risparmio di tempo nell'eluizione. La cromatografia su gel di silice contenente il 15 % di H<sub>2</sub>O aggiunta consiste nell'eluire la colonna con cicloesano, scartando una piccola frazione iniziale che contiene i composti meno polari (alcani), raccogliendo una seconda frazione contenente i PAH e lasciando sulla colonna i composti più polari e le sostanze colorate. Nella cromatografia su Sephadex LH-20, usando isopropanolo come eluente, si scarta la prima frazione corrispondente a un po' più del volume morto della colonna nel quale viene eluita la maggior parte delle impurezze e si raccolgono poi due grosse frazioni che contengono rispettivamente, in ordine di eluizione, i PAH fino a 3 anelli e quelli da 4 a 7 anelli e oltre; queste due frazioni sono adatte all'esame mediante gascromatografia (GLC). Le caratteristiche e l'utilità del Sephadex LH-20 in generale e nell'analisi dei PAH sono state prese in considerazione da

Joustra [29], Wilk e Coll. [30], Klimisch e Reese [31], Streuli [32] e Edstrom e Petro [33]. La caratteristica del Sephadex LH-20 consiste nel fatto che esso è un substrato per gel cromatografia abbastanza polare e i fenomeni di adsorbimento sono esaltati quando si impiegano eluenti ossidrilati, quali l'isopropanolo, l'etanolo, la miscela benzene: metanolo (1:1); accade, quindi, che la gel cromatografia vera e propria delle sostanze liposolubili presenti nel campione è sovrapposta ad un fenomeno di adsorbimento, e perciò di maggior ritenzione, a carico delle sostanze più polari, tra cui la frazione dei PAH: così la maggior parte delle sostanze lipofile e i pigmenti eluiscono vicino al volume morto della colonna, mentre la frazione dei PAH eluisce nettamente dopo in ordine di peso molecolare crescente, contrariamente a quello che si verifica normalmente nella gel cromatografia.

La cromatografia su Sephadex LH-20 da sola, tuttavia, non è in grado di purificare completamente un estratto. Si può dire che la cromatografia su colonna di gel di silice e la gel cromatografia su Sephadex LH-20 si integrano utilmente. In tale combinazione la GPC è stata usata anche da Giger e Blumer [34] nella purificazione di estratti relativi a sedimenti marini, e da Novotny e Coll. [35] e Lee e Coll. [36] negli studi sulla composizione del fumo del tabacco. Questi ultimi due AA. impiegano lunghe colonne di Sephadex LH-20 allo scopo di isolare non la frazione totale dei PAH, ma frazioni a composizione più semplice per una più facile e dettagliata analisi finale. Takahashi e Yasuhira [37] purificano gli estratti di tessuti animali per la determinazione del 3-metilcolantrene mediante GPC su Sephadex LH-20 e dimostrano che questa tecnica è in grado di rimuovere le sostanze fluorescenti ed interferenti nel processo di fluorescenza presenti negli estratti, che altrimenti inficierebbero la validità dell'esame fluorimetrico.

La purificazione degli estratti mediante GPC su resine stirene-divinilbenzene, in genere preceduta da cromatografia su colonna di gel di silice per l'isolamento della frazione aromatica, è stata descritta da Snook e Coll. [38], Stedman e Coll. [39], Coleman e Coll. [40, 41], McKay e Latham [42] e Popl e Coll. [43] relativamente a studi di composizione di frazioni grezze altobolenti e residui di distillazione del petrolio. Il comportamento cromatografico di vari materiali utilizzabili nella gel cromatografia dei PAH (Sephadex LH-20, Bio Beads SX-8, Styrogel 50-80 A<sup>o</sup>, Merckogel OR-PVA 500, Sephadex G-10) è stato studiato da Klimisch e Reese [31]. Il metodo di purificazione degli estratti sperimentato da Giger e Blumer [34], oltre alla cromatografia su Sephadex LH-20 e alla cromatografia su colonna di allumina/gel di silice, prevede un terzo stadio in cui i PAH sono complessati con trinitrofluorenone (TNF). Questo è un composto che ha caratteristiche di accettore di elettroni  $\pi$  ( $\pi$  acido) ed è in grado di formare complessi insolubili per trasferimento di carica con molecole aromatiche che hanno almeno tre anelli condensati, per cui è possibile eliminare per lavaggio con solventi quelle

sostanze indesiderate che non sono in grado di formare complessi e che siano passate attraverso i precedenti stadii cromatografici. Le possibilità di impiego analitico dei complessi con TNF sono state studiate da Schenk e Coll. [44]. Lo schema di purificazione adottato da Giger e Blumer [34] è molto valido e non è molto complicato in quanto i procedimenti cromatografici si risolvono nello scartare una prima frazione e nel raccogliere una seconda frazione. Tuttavia, poiché questo schema è stato messo a punto per estratti da sedimenti marini, si ritiene che nell'impiego su estratti da alimenti e tessuti potrebbero presentarsi delle complicazioni a causa delle grosse quantità di materiale a carattere lipidico che possono trovarsi in questi estratti. Si ritiene, perciò, che l'estratto proveniente dalla saponificazione del campione debba essere sottoposto ad un processo di ripartizione del tipo descritto da Grimmer e Böhnke [10] prima di arrivare agli stadii cromatografici. Per quanto a nostra conoscenza, nel caso di estratti da alimenti non esistono lavori che riportino la tecnica della complessazione con TNF per un'ulteriore purificazione finale della frazione contenente i PAH; ma sembra chiaro che essa può risultare utile quando l'estratto contenga ancora sostanze indesiderate; Giger e Blumer [34] affermano che nei sedimenti marini esistono dei metilchetoni a lunga catena che sopravvivono alla cromatografia su colonna di gel di silice e a quella su Sephadex LH-20 e possono essere eliminati sottoponendo i PAH al processo di complessazione con TNF.

Il metodo di purificazione adottato da McGinnis e Norris [19] prevede una filtrazione dell'estratto tiepido su colonna di allumina disattivata, una ripartizione tra isoottano e DMSO e una cromatografia su Florisil disattivato con metanolo; questo metodo appare poco pratico là dove bisogna effettuare la filtrazione di una soluzione tiepida su una colonna di allumina abbastanza lunga; l'impiego di Florisil, inoltre, presenta i già ricordati inconvenienti sperimentati proprio da questi AA.; infine manca la cromatografia su Sephadex LH-20, o altro materiale per gel cromatografia, che è ormai riconosciuta come un passaggio molto utile e importante nell'analisi degli idrocarburi policiclici.

Per tutte le considerazioni sopra esposte si ritiene che lo schema di purificazione descritto da Grimmer e Böhnke [10] sia quello che meglio si adatti alla purificazione di estratti relativi alle sostanze che sono oggetto di questa nota.

Sono state riportate anche delle purificazioni mediante sola cromatografia su colonna di gel di silice, allumina, Florisil [17, 45, 46]. Anche la TLC, da sola [27, 47-51] o preceduta da cromatografia su colonna di gel di silice attivato per l'isolamento della sola frazione aromatica [52], è stata proposta per la purificazione della frazione dei PAH.

È da rilevare che purificazioni di questo tipo più semplificate sono state applicate a casi particolari, in genere PAH nella frazione neutra degli estratti

relativi a inquinanti atmosferici e a condensato di fumo di sigarette, cioè campioni per i quali in genere il peso totale dell'estratto grezzo non è elevato. Schamp e Vanwassenhove [27] applicano, infatti, a scopo purificativo, la sola TLC su gel di silice alla frazione dei PAH proveniente dall'estrazione di 2 Kg di materiale vegetale e fanno osservare che la ripartizione tra solventi non era necessaria nel loro caso, mentre essa è particolarmente utile con prodotti ricchi di estratto lipidico (per esempio, alimenti).

#### SEPARAZIONE E IDENTIFICAZIONE DEI SINGOLI COSTITUENTI

Allo scopo di separare e identificare i singoli costituenti della frazione dei PAH, sono state impiegate tecniche cromatografiche e spettrali. È da osservare che nessuna tecnica da sola consente di separare e identificare tutti i componenti di miscele complesse. La letteratura offre una mole eccezionale di lavori relativi a varie possibilità di separazione, per cui qui saranno citate solo quelle più significative per ogni tipo di tecnica analitica.

#### *Cromatografia su strato sottile (TLC) e spettrometria UV e di fluorescenza*

La TLC è la tecnica usata da più lungo tempo per la separazione dei singoli componenti presenti in un estratto purificato. Per quanto riguarda gli adsorbenti si può dire che il gel di silice non possiede buone proprietà separative in questo caso particolare; infatti è stato usato generalmente per l'isolamento della frazione dei PAH nel suo complesso. L'allumina possiede migliore capacità di separazione ed è stata usata sia da sola che abbinata a TLC su cellulosa e cellulosa acetilata; l'allumina può provocare una parziale decomposizione dei PAH, a causa della presenza di impurezze di ossidi metallici [28]. Nella TLC le macchie o bande sono localizzate osservando la lastra sotto luce UV; a causa del diverso spettro di eccitazione, occorre osservare la lastra sia con lampada a 366 nm che a 254 nm; il crisene, per esempio, si visualizza con quest'ultima lunghezza d'onda.

Come esempi tipici di applicazione della TLC si possono citare i seguenti. Strömberg e Widmark [53], per l'analisi qualitativa in estratti di inquinanti atmosferici, hanno usato una TLC bidimensionale su lastre di allumina (1° eluente: esano : toluolo, 9 : 1; 2° eluente: etere etilico : metanolo : acqua, 4 : 4 : 1); le singole macchie, visualizzate alla luce UV, erano eluite con benzolo; riunendo gli eluati di macchie analoghe provenienti da circa 10 lastre si potevano effettuare identificazioni mediante spettri di assorbimento UV e di massa per confronto con composti standard. McKay e Latham [42] hanno fatto uso di una TLC su adsorbente misto allumina : cellulosa acetilata (2 : 1), sviluppando la lastra in due direzioni con lo stesso eluente (etere

etilico : toluene : cicloesano. 2 : 1 : 7). Le sostanze eluite dalle singole macchie venivano identificate tramite gli spettri di eccitazione per fluorescenza, per confronto con gli spettri di assorbimento UV di composti standard o con spettri riportati in letteratura. Anche Chatot e Coll. [47] hanno usato una TLC su adsorbente misto allumina : cellulosa acetilata (2 : 1), sviluppando, però, la lastra nella prima direzione con pentano e nella seconda con etanolo : toluene : acqua (17 : 4 : 4). Le sostanze, eluite dall'adsorbente con benzolo, sono identificate mediante gas cromatografia per confronto con sostanze di riferimento.

Sawicki e coll. [54] hanno mostrato le possibilità della TLC su allumina, cellulosa acetilata e cellulosa per un'efficace caratterizzazione dei PAH negli inquinanti atmosferici. Mentre l'allumina (eluente = pentano : etere etilico, 19 : 1) è molto utile nel separare i PAH dalle altre sostanze organiche presenti nell'estratto, la cellulosa acetilata (eluente = etanolo : toluene : acqua, 17 : 4 : 4) e la cellulosa (eluente = dimetilformammide : acqua, 1 : 1) presentano migliori capacità separative, usate in successione, dei singoli idrocarburi policiclici. Majer e Coll. [55] hanno usato una TLC su cellulosa (eluente = DMF : H<sub>2</sub>O, 70 : 30) e un esame mediante spettrometria di massa delle frazioni separate. La TLC su cellulosa è stata usata anche nella versione a fasi invertite. Così il metodo ufficiale dell'A.O.A.C. [20] prevede una TLC su cellulosa impregnata con dimetilformammide usando isoottano come eluente, seguita da una TLC delle singole bande così separate su cellulosa acetilata (eluente = etanolo : toluene : acqua, 17 : 4 : 4). La TLC a fasi invertite su cellulosa separa i PAH, principalmente, in funzione del numero degli anelli ma anche in base alla loro disposizione. La TLC su cellulosa acetilata è superiore nel separare i singoli composti isomeri a 4,5 e 6 anelli. Per esempio, le coppie benzo(a)pirene/benzo(e)pirene e benzo(a)antracene/crisene, difficili da separare su cellulosa, si separano agevolmente su cellulosa acetilata. Con la combinazione di questi due tipi di cromatografia, White e Howard [56] hanno separato 25 idrocarburi policiclici. Un sistema di separazione uguale a quello del metodo A.O.A.C. è stato impiegato da Mc Ginnis [15, 19] nell'analisi degli estratti da lieviti cresciuti su *n*-alcani e da *n*-alcani usati come substrato e da Shamp e Vanwassenhove [27] per l'analisi dei PAH nei vegetali e nel bitume. Matsushita e Coll. [57] hanno usato lastre 20 × 20 cm il cui strato adsorbente era costituito per una larghezza di 4 cm da allumina : cellulosa (95 : 5) e, per gli altri 16 cm, da cellulosa acetilata. L'estratto da filtri per inquinanti atmosferici veniva cromatografato prima sulla corsia di allumina : cellulosa con esano : etere etilico (19 : 1) e poi, ad angolo retto, con metanolo : etere : acqua (4 : 4 : 1). Alla luce UV era possibile visualizzare 66 macchie, delle quali 28 sono state identificate come PAH tramite gli spettri di eccitazione e di fluorescenza. È stato anche descritto l'impiego della TLC su strati di gel di silice impregnata con composti

accettori di elettroni, come il trinitrofluorenone, l'anidride piromellitica e la caffeina, per sfruttare l'effetto di complessazione a carico degli idrocarburi aromatici [8, 58].

In tutti questi metodi, in cui attraverso la TLC si cerca di ottenere una completa separazione dei singoli PAH, l'identificazione viene realizzata mediante il valore dell' $R_f$  e attraverso l'esame degli spettri di fluorescenza effettuato sulla sostanza eluita dalle singole macchie o bande. Questa tecnica, seppure molto sensibile, è di impiego delicato: essa richiede il confronto fra lo spettro di fluorescenza del composto ipotizzato e quello di uno standard, con l'ausilio di un atlante di spettri. Gli spettri vanno determinati in condizioni sperimentali confrontabili. Vi deve essere esatta corrispondenza tra gli spettri a tutte le lunghezze d'onda di eccitazione, altrimenti si deve sospettare la presenza di una o più impurezze [6]; è opportuno fare uso di spettri di fluorescenza « corretti » per le variazioni di intensità della sorgente e di risposta del rivelatore con la lunghezza d'onda [59]. Questa tecnica può incontrare difficoltà quando nell'estratto sono presenti sostanze fluorescenti o capaci di interferire con il fenomeno della fluorescenza. Inoltre non è possibile evidenziare la presenza di metilderivati che hanno notevole importanza tossicologica [1, 68].

AA. di scuola sovietica [17] hanno fatto uso del cosiddetto « effetto Shpol'skii »: esso consiste nel registrare lo spettro di fluorescenza dei PAH intrappolati nel reticolo cristallino di solventi n-alcani raffreddati a 77°K. Una delle difficoltà che si incontrano con la spettrofluorimetria è dovuta alla larghezza delle bande di eccitazione e di emissione negli spettri dei PAH a temperatura ambiente, e anche a basse temperature in quei solventi che formano « vetri » trasparenti che sono adatti per la spettrometria di luminescenza con illuminazione ad angolo retto. Invece alla temperatura di 77°K i PAH, bloccati nel reticolo cristallino di n-alcani, mostrano uno spettro di bande molto strette che si prestano ad una identificazione qualitativa, anche in miscele di otto componenti. La tecnica è stata esaminata a fondo da Kirkbright e De Lima [60]. Essa richiede evidentemente apparecchiature adatte allo scopo.

#### *Gas cromatografia (GLC) e gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS)*

Uno dei principali inconvenienti della tecnica TLC-spettrofluorimetria è la necessità di dover eluire le macchie che si separano nella TLC e sottoporre una alla volta le sostanze eluite alle indagini spettrali. Tutto ciò comporta un notevole dispendio di tempo e la possibilità di perdite dei PAH per decomposizione dovute alla luce UV o per incompleto recupero dal materiale adsorbente [61]. A questo riguardo la gas cromatografia mostra notevoli

vantaggi che in sostanza si condensano nel fatto che le sostanze possono essere separate e identificate nel corso dello stesso esame senza necessità di trasferimenti intermedi. A questo scopo sono state usate sia colonne capillari che impaccate. Le colonne capillari ovviamente mostrano migliori capacità di separazione, ma hanno lo svantaggio che i gas cromatogrammi così ottenuti non si prestano per un esame quantitativo in quanto ottenuti generalmente con un « frazionatore » in ingresso, il cui rapporto di frazionamento può non essere costante e riproducibile. Come esempi significativi si possono citare i seguenti lavori. Carugno e Rossi [62]: colonna capillare rivestita con SE-52 (un metil-fenil-silicone) lunga 65 m; Lane e Coll. [63]: colonna di 5,4 m × 6 mm o.d. riempita con OV-17 % (un metil-fenil-silicone) su Chromosorb W-80-100 mesh; Novotny e Coll. [35]: colonna capillare (35 m × 0,25 mm i.d.) rivestita con SE-52; Lee e Coll. [36]: colonna capillare rivestita con SE-52 (11 m × 0,26 mm i.d.); Gouw e Coll. [66]: colonna capillare (10 m × 0,01") rivestita con OV-101; Lao e Coll. [46]: colonna 12 piedi — 0,125" riempita con 6 % Dexsil 300 su Chromosorb W-HP-80-100 mesh e una capillare (35 piedi × 0,02") rivestita con Dexsil 300 (secondo gli A.A. la colonna impaccata ha dato i migliori risultati; durante un cromatogramma della durata di 80 minuti più di 100 composti venivano separati sufficientemente per permettere una identificazione mediante spettrometria di massa e un dosaggio per integrazione dell'area del picco; tuttavia il benzo(a)pirene [B(a)P] e il benzo(e)pirene[B(e)P] non venivano separati; Grimmer e Böhne [10]: colonna (10 m × 2 mm i.d.) riempita con 5 % OV-101 su Gas-Chrom Q: si tratta di una colonna di elevata efficienza che riesce a separare per esempio il B(a)P dal B(e)P e il dibenz (a, j) antracene dal dibenz(a, h) antracene; Janini e Coll. [64]: è stata impiegata come fase di ripartizione la N-N'bis (-metossibenzilidene)- $\alpha$ - $\alpha'$ -bi-p-toluidina nella sua regione nematica; questa fase ha notevoli possibilità di separazione dei PAH isomeri a 3-5 anelli; la selettività è basata sulle differenze nel rapporto lunghezza-ampiezza degli isomeri geometrici; la colonna a 2,5 % su Chromosorb W-HP-100-120 mesh lunga 4 piedi è in grado di separare agevolmente il B(a)P dal B(e)P e il crisene dal benz(a)antracene.

L'identificazione avviene in base al tempo di ritenzione per confronto con composti standard. È ovvio che questo tipo di identificazione, come per tutti i processi cromatografici, non è del tutto specifico. Per aumentare la sicurezza di identificazione è stato usato il rivelatore a cattura di elettroni e anche rivelatore a cattura di elettroni seguito da rivelatore a ionizzazione di fiamma [65].

In ogni caso un'identificazione sicura si è potuta avere solo con l'accoppiamento diretto gas cromatografo-spettrometro di massa; in questo accoppiamento in sostanza lo spettrometro di massa funge da rivelatore per il gas cromatografo. L'alta specificità degli spettri di massa assicura una identi-

ficazione pressoché inequivoca. L'uso della tecnica GC/MS nell'analisi di miscele complesse di idrocarburi è stata discussa da Kuras e Hala [67]; Lao e Coll. [46] hanno applicato la GC/MS individuando oltre 100 PAH presenti in inquinanti atmosferici; Grimmer e Böhnke [10] mediante la GC/MS hanno potuto mostrare che oltre 100 segnali negli estratti di pesce affumicato, lievito e olio di girasole erano dovuti a PAH o loro metil e dimetil derivati. È molto importante da un punto di vista tossicologico poter rivelare la presenza di alchil derivati, perché spesso i metil derivati sono molto più cancerogeni dell'idrocarburo non alchilato [1, 68]. Lee e Coll. [36] hanno applicato la GC/MS con colonna capillare (11 m × 0,26 mm i.d. rivestita con SE-52) allo studio dei PAH nei condensati di fumo di tabacco e marijuana; in questo studio gli estratti purificati su colonna di gel di silice, venivano ulteriormente purificati e frazionati mediante cromatografia su Sephadex LH-20 e cromatografia liquida ad alta pressione, in modo da ottenere frazioni più semplici; la spettrometria di massa ha consentito l'individuazione di metil e etilderivati. È stata usata anche la Risonanza Magnetica Nucleare protonica in trasformata di Fourier, che consente la rapida accumulazione degli spettri (nel caso circa 22.000, limite di lavoro 10 µg), per confermare la posizione dei gruppi metilici. Ciò riveste notevole importanza in quanto la tossicità è molto diversa per i diversi isomeri di posizione; il 5-metilcrisene, ad esempio, è molto più cancerogeno degli altri metilcriseni e del crisene non sostituito [68].

L'uso della spettrometria di massa non accoppiata alla gascromatografia è stato descritto da Majer e coll. [55] e da Giger e Blumer [34] (evaporazione graduale da una sonda riscaldata a temperatura programmata).

In questa applicazione, tuttavia, si perde il pregio fondamentale di poter separare, identificare e dosare un gran numero di PAH senza trasferimenti manuali dalla fase di separazione a quella di identificazione.

### *Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)*

La HPLC ha ricevuto una crescente attenzione nell'analisi dei PAH. Essa ha notevoli possibilità in quanto vi è una vasta scelta di supporti cromatografici. In pratica possono essere trasferite in HPLC tutte le possibilità di separazioni che sono sfruttate nell'analisi cromatografica su strato sottile. Così sono state utilizzate colonne di acetato di cellulosa [69, 70], poliammide [71], supporti impregnati di trinitrofluorenone [73], supporti ai quali è legata una fase stazionaria apolare (ottadecilsilil) per la cromatografia a fasi invertite [51, 72, 74]. La HPLC è una tecnica molto promettente per la separazione dei PAH ad alto peso molecolare o isomeri, ma non può competere con la GLC per il numero di composti separabili in una singola analisi. Ma il vero punto debole della HPLC è nel rivelatore. Dong e Coll. [51] usano un rivelatore a indice di rifrazione e un rivelatore UV a lunghezza d'onda fissa

254 nm. che da soli non offrono sufficienti garanzie di specificità. In effetti questi AA. fanno anche una raccolta di frazioni, sulle quali effettuano poi spettri UV e di fluorescenza e controlli mediante GC/MS nelle condizioni usate da Lao e coll. [46]. La migliore possibilità di rivelazione è probabilmente allo stato attuale quella descritta da Fox e Staley [74], i quali fanno uso di un rivelatore doppio ad assorbanza e fluorescenza.

La HPLC appare, quindi, utile in analisi di tipo ripetitivo su problemi già studiati in dettaglio, ma soprattutto in studi di composizione per l'ottenimento di frazioni semplici da studiare con maggior dettaglio mediante GC/MS. La HPLC, per il tipo di separazione su cui si basa, può dare migliori risultati rispetto alla gas cromatografia nello studio dei PAH a peso molecolare più elevato.

#### DETERMINAZIONE QUANTITATIVA

Per quanto concerne l'impiego delle tecniche UV e fluorescenza nella determinazione quantitativa si può fare riferimento a lavori già citati [6, 20, 56]. Il metodo dell'A.O.A.C. [20] prevede una determinazione mediante spettri UV e una conferma mediante spettrofotofluorimetria. La determinazione si esegue registrando lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto e confrontando ogni massimo di assorbimento con quelli presenti negli spettri di idrocarburi policiclici conosciuti. La determinazione quantitativa dell'idrocarburo così identificato è realizzata con l'uso della tecnica della linea di base per confronto con gli spettri ottenuti nelle stesse soluzioni a concentrazione nota dell'idrocarburo in questione. Il limite di lavoro per la determinazione UV è circa 1µg. La determinazione mediante spettri di fluorescenza è molto più sensibile (circa  $1 \div 10$  ng) ma è più delicata, in quanto più facilmente influenzata da sostanze estranee eventualmente presenti in soluzione.

Nella GLC e nella HPLC la determinazione quantitativa si basa sulla misura dell'area del picco del composto in esame per confronto con la misura dell'area del picco del composto standard ottenuta iniettando quantità note. Va tenuto presente che la « risposta » del rivelatore può variare da composto a composto.

Per quanto riguarda la determinazione dei PAH mediante GC/MS, si sfrutta il fatto che questi composti hanno un tipo di frammentazione caratteristica, in cui lo ione molecolare trasporta una elevata percentuale della corrente ionica totale rendendolo ideale per scopi analitici. In pratica si può stabilire, a parità di condizioni, una correlazione tra intensità (cioè altezza) del picco dello ione molecolare e quantità di sostanza iniettata. Lo spettrometro di massa viene usato in questo caso come un rivelatore per il gas cromatografo. È possibile seguire l'eluizione di un composto con tecniche diverse. Si possono effettuare scansioni ripetute su un intervallo di valori

di massa, che comprenda i valori di massa degli idrocarburi che si intendono seguire; in questo modo è possibile registrare la comparsa dei diversi ioni molecolari; la determinazione si effettua per confronto con registrazioni analoghe ottenute iniettando quantità note degli idrocarburi che si vogliono dosare. La tecnica è stata descritta da Boniforti [75] per il dosaggio del 3,4-benzopirene nel pane.

Con altra tecnica si può focalizzare lo strumento su un solo valore di massa; in questo modo lo spettrometro funziona come un rivelatore specifico per quel valore di massa; è possibile perciò seguire l'eluizione dalla colonna gas cromatografica di tutti gli idrocarburi che hanno lo stesso valore di  $m/e$ ; questa tecnica è riportata con la sigla SID (*single ion detector*) o SIM (*single ion monitor*).

Infine con apparecchi dotati del cosiddetto « frammentografo » o MID (*multiple ion detector*), è possibile impostare quattro o più valori di massa sui quali lo strumento si focalizza consecutivamente e rapidamente; lo strumento è perciò in grado di seguire contemporaneamente e indipendentemente l'eluizione degli idrocarburi con valori di  $m/e$  corrispondenti ai valori impostati sui quattro o più canali. In questo modo sul sistema di registrazione si avranno quattro grafici ciascuno dei quali rappresenta il cromatogramma relativo a quei composti con valori di  $m/e$  pari a quello impostato per ciascun canale. La tecnica è stata illustrata da Van Cauwenberghe e Caustreels [76]. La determinazione si effettua sempre per confronto con cromatogrammi ottenuti iniettando quantità di composto standard paragonabili a quelle presenti nel volume di estratto iniettato. La tecnica GC/MS è una delle migliori possibilità che si presentano per l'analisi dei PAH per quanto riguarda sensibilità e sicurezza di identificazione. Il limite di sensibilità che normalmente nelle scansioni ripetute è circa 1 ng può essere abbassato notevolmente a circa 100 pg nella tecnica SID, nella quale lo strumento è focalizzato su un unico valore di massa. È importante disporre di colonne ben condizionate. Nell'accoppiamento GC/MS, lavorando ai limiti di sensibilità, speciale attenzione deve essere posta sui possibili fenomeni di adsorbimento in colonna e a livello di separatore.

#### CONCLUSIONI

Sulla base dei lavori esaminati si ritiene di poter concludere che un metodo per l'analisi degli idrocarburi policiclici aromatici in matrici organiche complesse deve comprendere i seguenti passaggi:

a) una saponificazione che consenta la disgregazione della matrice per una efficace estrazione dei PAH;

b) una estrazione con solvente: il cicloesano sembra essere più indicato rispetto all'iso-ottano per una maggiore capacità solvente e per il più basso punto di ebollizione;

c) una ripartizione del tipo cicloesano: dimetilformammide + acqua per ridurre la quantità di impurezze liposolubili presenti nell'estratto grezzo;

d) un procedimento di purificazione comprendente almeno una cromatografia su gel di silice e una cromatografia su Sephadex LH-20 o altro materiale equivalente per gel cromatografia;

e) determinazione quantitativa: si può far uso di tecniche di spettrofotometria di assorbimento UV e di fluorescenza previa separazione dei singoli componenti mediante cromatografia su strato sottile, ma l'analisi mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa è da preferirsi perché offre una maggiore semplicità e rapidità di lavoro insieme con una elevata sensibilità e specificità di identificazione.

Si ringrazia il sig. Gianni Ippoliti per i disegni delle Fig. 1 e 2.

#### BIBLIOGRAFIA

1. SCHOENTAL, R. 1964. Carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by certain other carcinogens. In: *Polycyclic Hydrocarbons*. E. Clar (Ed.). Academic Press. London, vol. I, pp. 133-160.
2. BLUMER, M. 1976. Composti aromatici policiclici in natura. *Le Scienze*, **95**: 19-29.
3. HAENNI, E.O. 1968. Analytical control of polycyclic aromatic hydrocarbons in food and food additives. *Residue Rev.* **24**: 41-78.
4. TILGNER, D.J. & H. DAUN. 1969. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in smoked foods. *Residue Rev.* **27**: 19-41.
5. HOWARD, J.W. & T. FAZIO. 1969. A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Agr. Food Chem.* **17**: 527-531.
6. GUNTHER, F.A. & F. BUZZETTI. 1965. Occurrence, isolation, and identification of polynuclear hydrocarbons as residues. *Residue Rev.* **9**: 90-113.
7. SCHAAD, R.E. 1970. Chromatographie (karzinogener) polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. *Chromatog. Rev.* **13**: 61-82.
8. FISHBEIN, L. 1973. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Chromatography of environmental hazards*. Elsevier Scientific, Amsterdam, vol. 2, pp. 415-447.
9. GRIMMER, G. & A. HILDEBRANT. 1972. Concentration and estimation of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons at low levels in high-protein foods, oils, and fats. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **55**: 631-635.
10. GRIMMER, G. & H. BÖHNKE. 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile analysis of high-protein foods, oils, and fats by gas chromatography. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **58**: 725-733.

11. WALLCAVE, L., H. GARCIA, R. FELDMAN, W. LIJINSKY, & P. SHUBIK. 1971. Skin tumorigenesis in mice by petroleum asphalts and coal-tar pitches of known polynuclear aromatic hydrocarbon content. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**: 41-52.
12. HOWARD, J. W., E.W. TURICHI, R.H. WHITE & T. FAZIO. 1966. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **49**: 1236-1244.
13. HOWARD, J.W., E.O. HAENNI & F.L. JOE Jr. 1965. An ultraviolet absorption criterion for total polynuclear aromatic hydrocarbon content of petroleum waxes in food additive use. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **48**: 304-315.
14. LIJINSKY, W., I.I. DOMSKY & J. WARD. 1965. A procedure for the detection of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in petroleum waxes using electron capture. *J. Gas Chrom.* **3**: 152-154.
15. MCGINNIS, E.L. 1975. Determination of four and five ring condensed hydrocarbons. II. Analysis of polynuclear aromatic compounds in n-paraffin feed oil for yeast fermentation. *J. Agr. Food. Chem.* **23**: 226-229.
16. POPL, M., M. STEJSKAL, & J. MOSTECKY. 1975. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in white petroleum products. *Anal. Chem.* **47**: 1947-1950.
17. SCIABAD, L.M. A. Ja. KESINA, G.S. SERKOVSKAJA, I.A. OGLOBINA & Ja.S. FRIDMAN. 1972. Opređenje 3,4-benzpirena v BVK i syr'e, ispol'znenom v processe ego polučeniya. In: *Mediko-biologičeskie issledovanija uglevodorodnyh drozžej*. Pokrovskogo (A.A. (Ed.). Mauka, Moskva, pp. 89-94.
18. ARCHIBALD, J. & A.L. COCHRANE, 1975. The determination of polycyclic hydrocarbons in yeast. *Analyst.* **100**: 355-358.
19. MCGINNIS, E.L. & M.S. NORRIS. 1975. Determination of four and five ring condensed hydrocarbons. I. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in yeast produced by growth on both n-hydrocarbons and dextrose feeds. *J. Agr. Food Chem.* **23**: 221-225.
20. *Official Methods of Analysis of the Ass. Off. Anal. Chem.* 1975. 12th edition, Horwitz, W. (Ed.). Washington, DC.
21. GENEST, C. & D.M. SMITH. 1964. A simple method for the detection of benzo(a)pyrene in smoked foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **47**: 894-897.
22. HOWARD, J.W. & R.T. TEAGUE, Jr. 1965. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons added to milk. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **48**: 315-322.
23. HOWARD, J.W., R.H. WHITE, B.E. FRY Jr. & E.W. TURICHI. 1966. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. Benzo(a)pyrene. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **49**: 611-617.
24. CRAFT, C.C. & S. NORMAN. 1966. Cleanup and screening of citrus extracts for residues of benzo(a)pyrene and two other polynuclear hydrocarbons. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **49**: 695-701.
25. HOWARD, J.W., T. FAZIO, R.H. WHITE & B.A. CLIMECK. 1968. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in total diet composites. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **51**: 122-129.

26. MALANOSKI, A.J., E.L. GREENFIELD, C.J. BARNES, J.M. WORTHINGTON & F.L. JOE JR. 1968. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **51**: 114-121.
27. SCHAMP, N. & F. VAN WASSENHOVE. 1972. Determination of benzo(a)pyrene in bitumen and plants. *J. Chromatog.* **69**: 421-425.
28. HERTEL, W., P. SUCKOW & M. ROHLICH. 1970. Untersuchungen über 3,4-Benzpyren in Getreide und Getreidemahlprodukten. *Getreide und Mehl*, **20**: 65-67.
29. JOUSTRA, M.K. 1966. Sephadex, properties and field of application. In: *Protides of Biological Fluids*. 1967. Peeters, H. (Ed.). Elsevier, Amsterdam, vol. 14, pp. 533-541.
30. WILK M., J. ROCHLITZ & H. BENDE. 1966. Säulenchromatographie von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen an lipophilem Sephadex LH-20. *J. Chromatog* **24**: 414-416.
31. KLIMISCH, H.J. & D. REESE. 1973. Säulenchromatographische Trennung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. Trennung an organischen Gelen in protischen Lösungsmitteln. *J. Chromatog.* **80**: 266-270.
32. STREULI, C.A. 1971. The effect of solvent change on the separation processes of Sephadex LH-20 modified dextran. *J. Chromatog.* **56**: 225-229.
33. EDSTROM, T., & B.A. PETRO. 1968. Gel permeation chromatographic studies of polynuclear aromatic hydrocarbon materials. *J. Polymer Sci. C*, **21**: 171-174.
34. GIGER, W. & M. BLUMER. 1974. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet, and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **46**: 1663-1671.
35. NOVOTNY, M., M.L. LEE & K.D. BARTLE. 1974. The methods for fractionation, analytical separation and identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *J. Chromat. Science*, **12**: 606-611.
36. LEE, M.L., M. NOVOTNY & K.D. BARTLE. 1976. Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco and marijuana smoke condensates. *Anal. Chem.* **48**: 405-416.
37. TAKAHASHI, G. & K. YASUHIRA. 1975. Chromatographic separation of autofluorescent and quenching substances from the hydrocarbon in tissue. *Gann.* **66**: 21-27.
38. SNOOK, M.F., W.J. CHAMBERLAIN, R.F. SEVERSON & O.T. CHORTYK. 1975. Chromatographic concentration of polynuclear aromatic hydrocarbons of tobacco smoke. *Anal. Chem.* **47**: 1155-1157.
39. STEDMAN, R.L., R.L. MILLER, L. LAKRITZ & W.J. CHAMBERLAIN. 1968. Method for concentrating polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Chem. Ind.* 394-395.
40. COLEMAN, H.J., D.E. HIRSCH & J.E. DOOLEY. 1969. Separations of crude oil fractions by gel permeation chromatography. *Anal. Chem.* **41**: 800-804.
41. COLEMAN, H.J., J.E. DOOLEY, D.E. HIRSCH & C.J. THOMPSON. 1973. Compositional studies of a high-boiling 370-535 °C distillate from Prudhoe Bay, Alaska, crude oil. *Anal. Chem.* **45**: 1724-1737.

42. MCKAY, J.F. & D.R. LATHAM. 1973. Polyaromatic hydrocarbons in high-boiling petroleum distillates. Isolation by gel permeation chromatography and identification by fluorescence spectrometry. *Anal. Chem.* **45**: 1050-1055.
43. POPL, M., M. STEJSKAL, & J. MOSTECKY. 1974. Determination of benzo(a)pyrene in tars and petroleum. *Anal. Chem.* **46**: 1581-1582.
44. SCHENK, G.H., P.W. VANCE, J. PIETRANDREA & C. MOJZIS. 1965. Study of the Pi complexes of 2, 4, 7-trinitrofluorenone with phenols, aromatic hydrocarbons, and aromatic amines. *Anal. Chem.* **37**: 372-378.
45. MOORE, G.E., R.S. THOMAS & J.L. MONKMAN. 1967. The routine determination of polycyclic hydrocarbons in airborne pollutants. *J. Chromatog.* **26**: 456-464.
46. LAO, R.C., R.S. THOMAS, H. OJA & L. DUBOIS. 1973. Application of a gas chromatograph mass spectrometer-data processor combination to the analysis of the polycyclic aromatic hydrocarbon content of airborne pollutants. *Anal. Chem.* **45**: 908-915.
47. CHATOT, G., W. JEQUIER, M. JAY & R. FONTAGES. 1969. Étude des hydrocarbures polycycliques de l'atmosphère. I. Problèmes nés du couplage de la chromatographie sur couches minces et de la chromatographie en phase gazeuse. *J. Chromatog.* **45**: 415-420.
48. SIMON, S., A.A. RYPINSKI, F.W. TAUBER, R.M. PENCYLA & D.O. WESTERBERG. 1969. Effect of cellulose casing on absorption of polycyclic hydrocarbons in wood smoke by absorbents. *J. Agr. Food Chem.* **17**: 1128-1134.
49. BROCCO, D., V. CANTUTI & G.P. CARTONI. 1970. Determination of polynuclear hydrocarbons in atmospheric dust by a combination of thin layer and gas chromatography. *J. Chromatog.* **49**: 66-69.
50. CHATOT, G., R. DANGY-CAYE & R. FONTAGES. 1972. Étude des hydrocarbures polycycliques de l'atmosphère. II. Application du couplage chromatographie en phase gazeuse-chromatographie sur couches minces au dosage des arènes polynucléaires. *J. Chromatog.* **72**: 202-206.
51. DONG, M. & D. LOCKE. 1976. High pressure liquid chromatographic method for routine analysis of major parent polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter. *Anal. Chem.* **48**: 368-372.
52. SCHMELTZ, I., R.L. STEDMAN & W.J. CHAMBERLAIN. 1964. Improved method for the determination of benzo(a)pyrene in cigarette smoke condensate. *Anal. Chem.* **36**: 2499-2500.
53. STRÖMBERG, L.E. & G. WIDMARK. 1970. Qualitative determination of polyaromatic hydrocarbons in the air near gas-works retorts. *J. Chromatog.* **47**: 27-44.
54. SAWICKI, E., T.W. STANLEY, W.C. ELBERT & J.D. PFAFF. 1964. Application of thin layer chromatography to the analysis of atmospheric pollutants and determination of benzo(a)pyrene. *Anal. Chem.* **36**: 497-502.
55. MAJER, J.R., R. PERRY & M.J. READE. 1970. The use of thin layer chromatography and mass spectrometry for the rapid estimation of trace quantities of air pollutants. *J. Chromatog.* **48**: 328-333.
56. WHITE, R.H. & J.W. HOWARD. 1967. Thin-layer chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatog.* **29**: 108-114.

57. MATSUSHITA, H., Y. ESUMI & K. YAMADA. 1970. *Bunseki Kagaku*, **19**: 951. tramite Fishbein, I., ref. 8.
58. LIBICKOVA, V., M. STUCHLIK & I. KRASNEC. 1969. Chromatography of aromatic hydrocarbons on impregnated layers. *J. Chromatog.* **45**: 278-283.
59. PORRO, T.J., R.E. ANACREON, P.S. FLANDREAU & I.S. FAGERSON. 1973. Corrected fluorescence spectra of polynuclear materials and their principal applications. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **56**: 607-620.
60. KIRKBRIGHT, G.F. & C.G. DE LIMA. 1974. The detection and determination of polynuclear aromatic hydrocarbons by luminescence spectrometry utilising the Shpol' skii effect at 77 °K. *Analyst*, **99**: 338-354.
61. INSCOE, M.N. 1964. Photochemical changes in thin layer chromatograms of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **36**: 2505-2506.
62. CARUGNO, N. & S. ROSSI. 1967. Evaluation of polynuclear hydrocarbons in cigarette smoke by glass capillary columns. *J. Gas Chrom.* **59**: 103-106.
63. JANE, D.A., H.K. MOE & M. KATZ. 1973. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons, some heterocyclics, and aliphatics with a single gas chromatograph column. *Anal. Chem.* **45**: 1776-1778.
64. JANINI, G.M., K. JOHNSTON & W.L. ZIELINSKI Jr. 1975. Use of nematic liquid crystal for gas-liquid chromatographic separation of polyaromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **47**: 670-674.
65. DAWSON, H.J. Jr. 1964. Detection of traces of polynuclear aromatics in hydrocarbons by gas chromatography. *Anal. Chem.* **36**: 1582-1583.
66. GOUV, T.W., I.M. WHITEMORE & R.E. JENTOFT. 1970. Versatile short capillary column in gas chromatography. *Anal. Chem.* **42**: 1394-1499.
67. KURÁS, M. & S. HÁLA. 1970. The use of gas chromatograph-mass spectrometer for the analysis of complex hydrocarbon mixtures. *J. Chromatog.* **51**: 45-57.
68. HOFFMANN, D., W.E. BONDINELL & E.L. WYNDER. 1974. Carcinogenicity of methylchrysenes. *Science*, **183**: 215-216.
69. IVES, N.F. & L. GIUFFRIDA. 1972. Liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **55**: 757-761.
70. KLIMISCH, H.J. 1973. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. Separation of benzpyrene isomers by high-pressure liquid chromatography on cellulose acetate columns. *Anal. Chem.* **45**: 1960-1962.
71. KLIMISCH, H.J. 1973. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-pressure liquid chromatography. Selective separation system for the quantitative determination of isomeric benzpyrenes and of coronene. *J. Chromatog.* **83**: 11-14.
72. SLEIGHT, R.B. 1973. Reversed-phase chromatography of some aromatic hydrocarbons. Structure-retention relationships. *J. Chromatog.* **83**: 31-38.

73. KARGER, B.L., M. MARTIN, J. LOHEAC & G. GUIOCHON. 1973. Separation of polyaromatic hydrocarbons by liquid-solid chromatography using 2,4,7-trinitrofluorenone impregnated corasil I columns. *Anal. Chem.* **45**: 496-500.
74. FOX, M.A. & S.W. STALEY. 1976. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons atmospheric particulate matter by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence techniques. *Anal. Chem.* **48**: 992-998.
75. BONIFORTI, L. 1975. Recherche des contaminants dans les aliments au moyen de la spectrometrie de masse. In: *Atti del XV Symposium della Commission Int. Industrie Agric.* Bologna, 12-13 nov. 1975.
76. VAN CAUWENBERGHE, K. & W. CAUTREELS. 1976. Determination of polyaromatic hydrocarbons in airborne particular matter by mass fragmentography. In: *Advances in mass spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Frigerio, A. & Castagnoli, N.(Ed.). Spectrum Publications, New York, vol. 1, pp. 465-473.

# Idrocarburi saturi negli alimenti. Metodo d'analisi e valori riscontrati in alcuni alimenti per uso umano e in campioni da organismi unicellulari

ALFONSO DI MUCCIO (a), LUIGI BONIFORTI (a), ANNA PALOMBA (b),  
MARIA PIA BERNARDINI (\*) e MIRELLA DELISE (\*)

(a) *Laboratorio di Tossicologia*

(b) *Laboratorio degli Alimenti*

## INTRODUZIONE

Diverse classi di idrocarburi a lunga catena (lineari, ramificati, saturi e insaturi) sono state riscontrate da molti AA. nei più svariati campioni naturali come tessuti vegetali [1-3], tessuti animali [4-8], tessuti umani [9-13], microorganismi [14-16], nel grasso di lana [17], nell'olio di mais e di germe di grano [18], nella farina [19], nel grasso di burro [20], nell'aria urbana [21].

L'origine degli idrocarburi nei tessuti umani, animali e vegetali non è chiara, ma si può assumere che essi derivino da processi biosintetici, da inquinamento ambientale e dall'uso di paraffine e olii minerali nella tecnologia alimentare e nella terapia medica.

Sebbene gli idrocarburi saturi siano considerati generalmente poco reattivi, tuttavia essi partecipano a vari processi biochimici. Infatti essi sono assorbiti dall'organismo animale, accumulati (preferenzialmente nel tessuto adiposo) fino ad un certo livello e mobilizzati quando si sospende la somministrazione [22, 23] con escrezione anche nel latte [16].

Gli idrocarburi assorbiti vengono a distribuirsi in vari organi dell'animale dove possono subire processi metabolici; ad esempio nel fegato essi vengono ossidati in posizione terminale ad acidi grassi che si ritrovano incorporati nei gliceridi e fosfolipidi [23]. Anche in studi di perfusione del tessuto di ruminanti di capra è stato trovato che gli idrocarburi saturi vengono convertiti parzialmente ad acidi grassi di uguale lunghezza di catena attraverso un'ossidazione in posizione terminale [24].

---

(\*) Borsista del Laboratorio di Tossicologia.

Inoltre anche la parte di idrocarburi assorbiti che non vengono metabolizzati non sono privi di significato da un punto di vista biochimico. Infatti è stato dimostrato che la maggior parte degli alcani che hanno attività biologica come acceleratori di cancerogenesi ( $C_{10}$ - $C_{20}$ ) producono una significativa riduzione della velocità di trasporto ionico attraverso membrane fosfolipidiche artificiali [25], il che può essere messo in correlazione con la riduzione di velocità di trasporto in certi epiteli maligni rispetto ai corrispondenti tessuti normali, riduzione osservata in studi di trasporto ionico intercellulare in colture di tessuti epiteliali [25].

Per idrocarburi lineari saturi a 18, 20 e 28 atomi di carbonio è stata trovata una buona correlazione tra la loro attività biologica (attività cocancerogena e come iniziatori di tumori) e il loro effetto fisico sulla struttura e sulle proprietà di trasporto delle micelle fosfolipidiche [26].

L'assorbimento degli *n*-alcani nelle membrane lipoproteiche altera in parte la struttura del doppio strato fosfolipidico attraverso un'interazione con le catene aciliche dei fosfolipidi e quindi può variare la distribuzione di carica superficiale all'interfaccia lipoproteina-citoplasma [25]. Per *n*-decano, *n*-dodecano e *n*-tetradecano è stato messo in evidenza anche il loro effetto cocancerogeno nei riguardi della luce UV [27].

D'altro canto la presenza di idrocarburi saturi è stata studiata in correlazione con alcuni stati patologici umani. Nella lipidosi follicolare splenica è stato notato un anormale incremento di idrocarburi saturi con prevalenza di  $n$ - $C_{21}$  ÷  $n$ - $C_{28}$  mentre nella milza umana normale prevalgono  $n$ - $C_{15}$  ÷  $n$ - $C_{24}$ ; olio minerale assunto come anticostipativo potrebbe essere in parte considerato come la fonte di questi idrocarburi [9]. Un incremento quantitativo di idrocarburi saturi è stato osservato anche tra meninge di cervello umano normale e meningioma [10] e nelle placche ateromatose dell'arteria femorale rispetto ai tessuti della parete dell'arteria [11, 13].

Lo scopo di questa nota è stato, pertanto, quello di determinare il contenuto e la distribuzione di *n*-alcani in alcuni dei principali alimenti per valutare quale possa essere attualmente l'incidenza di essi nella dieta umana e avere un termine di raffronto nella prospettata eventualità che carni di animali alimentati con proteine da organismi unicellulari cresciuti su *n*-alcani (SCP) entrino nell'alimentazione umana e incrementino il livello di *n*-alcani nella dieta. È da tener presente che quasi tutti i lavori trovati in letteratura sono lavori di identificazione di idrocarburi ma non riportano dati quantitativi.

È stato con l'occasione messo a punto un metodo di analisi adatto sia per le SCP che per i più comuni alimenti.

L'analisi degli idrocarburi in varie matrici è stata già descritta da diversi AA. e si avvale di procedimenti ben noti quali estrazione, saponificazione, purificazione dell'estratto mediante processi cromatografici su colonna di

allumina [5, 18] o di silice [7, 12] o mediante cromatografia su strato sottile (TLC) [6, 10, 14, 19, 20], determinazione mediante gas cromatografia (GLC) [3, 7, 10, 14, 18, 19], conferma mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (GC/MS) [1, 5, 6, 12, 20, 21, 28, 29].

Rispetto ai metodi di estrazione e purificazione citati, il metodo qui presentato, dovendo essere un metodo quantitativo, è costituito di pochi e semplici passaggi e consente anche un discreto recupero degli idrocarburi più volatili ( $n-C_{12}$ ) attraverso l'impiego di un solvente di estrazione molto volatile (pentano). Inoltre è stata adottata la cromatografia su strato sottile in quanto offre la possibilità di eliminare alcuni componenti con  $R_f$  molto vicino a quello degli alcani, il che sarebbe stato difficile realizzare usando unicamente la cromatografia su colonna.

Per quanto riguarda la gas cromatografia sono state saggiate le condizioni descritte in letteratura e sono state poi adottate quelle descritte nella parte sperimentale che, tuttavia, non sono da considerare tassative potendosi realizzare analisi soddisfacenti anche con altri riempimenti di colonna del tipo siliconi.

Il metodo si presenta, inoltre, molto sensibile, essendo le determinazioni dei singoli  $n$ -alcani effettuate a livello di frazioni di ppm (mg/kg).

## PARTE SPERIMENTALE

### *Materiali*

Pentano, etere di petrolio 40°-60°, etere etilico, alcool etilico, isoottano: reattivi puri per analisi ridistillati con apparecchiatura tutta in vetro munita di colonna di distillazione di 400 mm  $\times$  25 mm d.i. riempita con anelli di vetro.

Acqua distillata estratta due volte con etere di petrolio distillato; potassio idrossido e acido cloridrico puri per analisi.

Gel di silice per cromatografia su colonna (70-325 mesh), sodio solfato anidro e cotone idrofilo estratti in Soxhlet per 6 ore in etere di petrolio 40°-60°. Allontanare il solvente per aspirazione sotto vuoto utilizzando un essiccatore. Essiccare il gel di silice e il sodio solfato anidro in stufa a 105 °C per 1 ora.

Lastre per cromatografia su strato sottile 20  $\times$  20 cm ricoperte con gel di silice G; spessore dello strato 0,5 mm. Lavare mediante sviluppo cromatografico con etere etilico distillato e attivare a 105 °C per 1 ora.

Soluzione di 2'-7'-diclorofluoresceina 0,2 % in alcool etilico. Standards di  $n$ -alcani da  $n-C_{12}$  a  $n-C_{32}$ .

Imbuti separatori da 500 ml con rubinetto in PTFE, colonne cromatografiche senza rubinetto 200 mm  $\times$  20 mm d.i., palloni a fondo tondo

da 500 ml con cono smerigliato, refrigeranti a bolle raffreddati ad acqua, provette coniche di capacità 15 ml con cono a smeriglio.

Lavare tutta la vetreria con etere etilico o etere di petrolio. Evitare il contatto del campione e degli estratti con gomma, plastica e altri materiali che possono cedere sostanze indesiderate. Effettuare periodicamente prove in bianco per escludere possibili contaminazioni.

### *Procedimento*

#### *1. Disgregazione del campione.*

a) *Proteine da organismi unicellulari (SCP).* - Un'aliquota di 5 g di campione viene posta insieme a 15 ml di soluzione acquosa di HCl (1:1) in un pallone a fondo tondo da 500 ml sul quale si innesta un refrigerante ad acqua. Si tiene il pallone su b.m. bollente per 1 ora. Dopo raffreddamento si introducono dall'alto del refrigerante 15 g di KOH in pastiglie, poco alla volta, raffreddando ogni volta il pallone per immersione in acqua e ghiaccio. Infine, sempre attraverso il refrigerante, si versano 15 ml di etanolo e 25 ml di acqua e si lascia bollire a riflusso su b.m. per almeno 2 ore.

b) *Tessuti animali e vegetali.* - Un'aliquota di 25 g di campione, ridotto in piccoli pezzi, viene saponificata con 25 g di KOH disciolto in una miscela di 100 ml di etanolo + 50 ml di acqua, facendo bollire a ricadere per almeno 2 ore.

Questo procedimento può essere applicato anche alle SCP partendo da 5 g e riducendo in proporzione la miscela di saponificazione.

#### *2. Estrazione degli idrocarburi.*

La soluzione appena tiepida derivante dalla saponificazione del campione viene trasferita in imbuto separatore da 500 ml, lavando il pallone con piccole quantità di acqua, etanolo e pentano successivamente. Si effettuano tre estrazioni con pentano (1 × 50 ml e 2 × 30 ml), scartando alla fine la fase acquosa e riunendo quantitativamente le tre porzioni in un unico imbuto separatore.

#### *3. Purificazione dell'estratto.*

La fase pentanica risultante dall'estrazione e che contiene oltre agli idrocarburi anche altre sostanze liposolubili viene parzialmente purificata facendola passare attraverso una colonna cromatografica (dimensioni del vetro: 200 mm di altezza × 20 mm di diametro interno) formata con 5 g di gel di silice e chiusa con uno strato di sodio solfato anidro di 8 cm di altezza. L'imbuto separatore viene lavato con tre porzioni da 30 ml di pentano che

vengono fatte passare sulla colonna. Tutti gli eluati sono raccolti in una beuta da 250 ml e poi concentrati cautamente fino a 1-2 ml con evaporatore rotante (30 °C, pressione ridotta).

#### 4. Isolamento della frazione degli alcani.

La soluzione pentanica ottenuta dall'operazione precedente viene deposta quantitativamente e il più rapidamente possibile sotto forma di banda su una lastra per TLC ricoperta con gel di silice (0,5 mm), utilizzando una microsiringa da 100  $\mu$ l. A lato della banda si depongono 20-30  $\mu$ l di una soluzione 1 mg/ml di un alcano. Si sviluppa la lastra con pentano con una corsa di 12 cm in una vasca rivestita con carta da filtro e saturata con pentano.

Al termine della corsa si toglie la lastra dalla vasca, si lascia asciugare all'aria per circa un minuto e si spruzza con la soluzione di diclorofluoresceina. Si evidenzia sotto la luce UV la banda corrispondente agli alcani, che viene raschiata e trasferita in una colonnina di vetro senza rubinetto e contenente uno strato di ovatta sgrassata.

Gli alcani sono eluiti dall'adsorbente con 15 ml di miscela etere etilico + + esano (1 + 1), raccogliendo in provetta a fondo conico. Si concentra la soluzione a circa 1 ml, avendo cura di aggiungere prima dell'operazione 0,2-0,3 ml di isoottano.

#### 5. Identificazione e dosaggio degli alcani.

L'analisi si effettua per gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma nelle seguenti condizioni: colonna in vetro 3 m  $\times$  3 mm d.i. riempita con OV-17 3 % su Chromosorb W-HP 80-100 mesh; temperature: forno 100 °C per 2 min, fino a 280 °C a 5 °C/min, poi isoterma; iniettore e rivelatore 300 °C; gas di trasporto: azoto a 60 ml/min.

L'identificazione dei singoli alcani si realizza per confronto con i tempi di ritenzione di n-alcani standard da n-C<sub>12</sub> a n-C<sub>32</sub> cromatografati nelle stesse condizioni. Il dosaggio viene effettuato aggiungendo all'estratto finale una quantità opportuna di un n-alcano scelto in modo da cadere in una zona libera del cromatogramma e confrontando le aree di ciascun picco ottenute per triangolazione o mediante integratore elettronico. Gli estratti di campioni che mostrano una certa complessità nella zona del n-C<sub>18</sub> sono rianalizzati per gas cromatografia su colonna capillare, soprattutto per dosare separatamente n-C<sub>18</sub> e fitano (2, 6, 10, 14-tetrametilesadecano) che con la colonna impaccata non sono risolti.

La gas cromatografia con colonna capillare si effettua nelle seguenti condizioni: colonna in acciaio 90 m  $\times$  0,25 mm d.i., rivestita con Apiezon L; temperature: iniettore 280 °C, forno 175 °C; rapporto di *splitter* all'iniettore 1/50; gas di trasporto: elio a 2 ml/min; rivelatore: FID.

La maggior parte degli estratti sono stati controllati mediante gas cromatografia-spettrometria di massa con una unità GC-MS LKB 9000 S usando una colonna gas cromatografica lunga 3 m di OV-101 al 5 % su Chromosorb WHP 80-100 mesh con programma di temperatura da 100 °C a 250 °C a 5 °C/min, iniettore 280 °C, separatore 260 °C; gas di trasporto: elio a 30 ml/min; energia di ionizzazione: 20 eV.

Dal momento che nell'estratto finale con il metodo descritto si ritrovano anche idrocarburi monoinsaturi, gli estratti i cui cromatogrammi si presentavano molto complessi sono stati sottoposti a idrogenazione catalitica e rianalizzati per gas cromatografia con colonna impaccata. L'idrogenazione è stata condotta in soluzione di isoottano in presenza di circa 10-15 mg di PtO<sub>2</sub> sotto agitazione utilizzando un microidrogenatore Packard nel quale si fa gorgogliare idrogeno purissimo per 30 min. Finita l'operazione la soluzione è stata filtrata per allontanare il PtO<sub>2</sub>.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Per controllare la validità del metodo descritto sono state effettuate prove di recupero partendo da 50 µg di ciascun alcano a numero pari di atomi di carbonio da n-C<sub>12</sub> a n-C<sub>32</sub> ed eseguendo tutto il metodo.

Nella Tab. 1 sono riportati il valore medio della quantità trovata che è la media di tre distinte prove e la percentuale di recupero calcolata. Si

TABELLA 1

Valori di recupero di n-alcani

	Quantità aggiunta (gamma)	Quantità trovata media di 3 determinazioni	% di recupero
n-C <sub>12</sub> . . . . .	50	29,8	59,6
n-C <sub>14</sub> . . . . .	50	35,6	71,2
n-C <sub>16</sub> . . . . .	50	42,3	84,6
n-C <sub>18</sub> . . . . .	50	44,9	89,8
n-C <sub>20</sub> . . . . .	50	45,2	90,4
n-C <sub>22</sub> . . . . .	50	44,6	89,2
n-C <sub>24</sub> . . . . .	50	45,7	91,4
n-C <sub>26</sub> . . . . .	50	45,4	90,4
n-C <sub>28</sub> . . . . .	50	45,9	91,8
n-C <sub>30</sub> . . . . .	50	44,8	89,6
n-C <sub>32</sub> . . . . .	50	44,7	89,4

osservano valori di recupero un po' bassi per  $n-C_{12}$  e  $n-C_{14}$  a ragione della loro maggiore volatilità; è probabile che detti valori possano essere migliorati effettuando le operazioni di concentrazione con l'ausilio di una piccola colonna di rettifica riempita con anelli di vetro.

Per quanto riguarda la selettività del metodo di purificazione si può dire che essa è buona in quanto la banda che si isola con la cromatografia su strato sottile contiene sicuramente tutti gli alcani (lineari, ramificati, aliciclici) e gli alcheni monoinsaturi (lineari e ramificati) e probabilmente i di-insaturi, ma vengono completamente separati altri composti liposolubili che si trovano normalmente nell'insaponificabile quali alcoli, aldeidi, steroli o composti che potrebbero trovarsi nel caso di incompleta saponificazione o di fenomeni di emulsione, quali gliceridi e acidi grassi.

Nella Fig. 1 è mostrata una tipica risoluzione di alcuni dei composti citati su lastra di gel di silice G con eluente pentano.

La cromatografia su strato sottile adottata in questo metodo per la separazione della frazione degli alcani si dimostra preferibile alla cromatografia su colonna di allumina o gel di silice per la sua migliore capacità separativa. Infatti negli estratti di alcuni organi animali (ad esempio fegato,

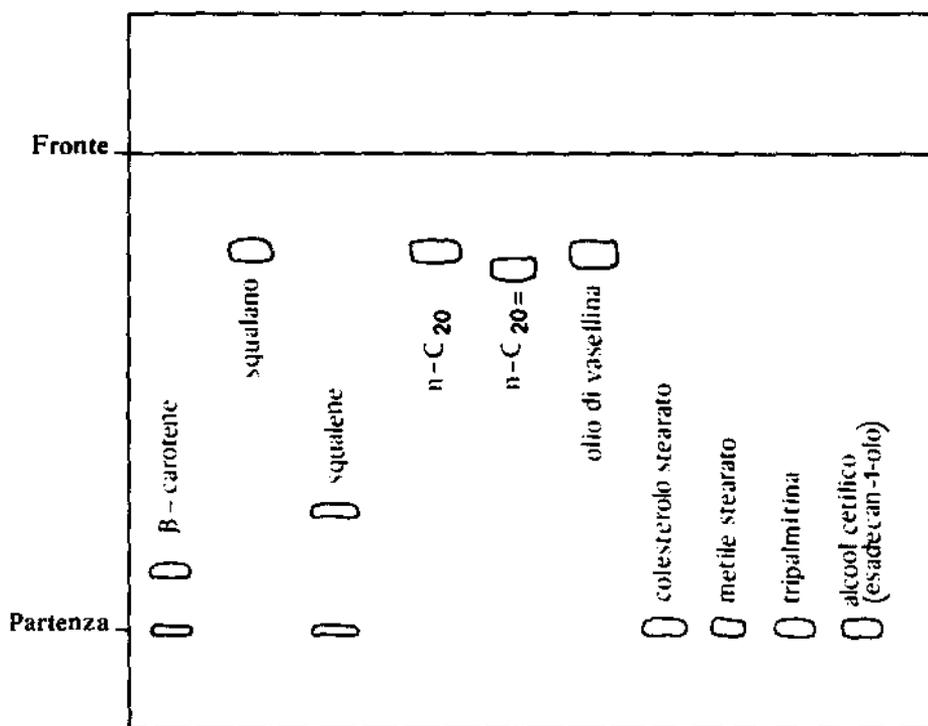


Fig. 1. - Separazione su lastra di gel di silice G-0,5 mm; eluente: pentano.

cuore, muscolo) compaiono alcune bande con Rf non molto differenti da quello degli alcani e che sarebbe molto difficile separare con cromatografia su colonna. Inoltre da alcuni AA. [30] appare che spesso gli estratti contengono anche squalene che può falsare la determinazione della quantità totale di n-alcane; mentre lo squalano nell'esame gas cromatografico non disturba in quanto va a cadere nella zona tra n-C<sub>26</sub> e n-C<sub>27</sub>. Con il frazionamento su strato sottile invece lo squalene viene completamente separato dalla banda degli n-alcane.

Le analisi hanno mostrato nei campioni esaminati una serie omologa di n-alcane da C<sub>12</sub> a C<sub>31</sub>. I cromatogrammi riportati in Fig. 2 e Fig. 3 mostrano una certa complessità nella zona del n-C<sub>18</sub>. Rianalizzando gli estratti su colonna capillare il picco attribuito a n-C<sub>18</sub> mostra essere composto da n-C<sub>18</sub> e fitano (2,6,10,14-tetrametilesadecano) che è stato anche confermato mediante esame GC/MS usando una colonna impaccata in grado di risolverli parzialmente e confrontando lo spettro di massa con quello riportato in letteratura per questo composto.

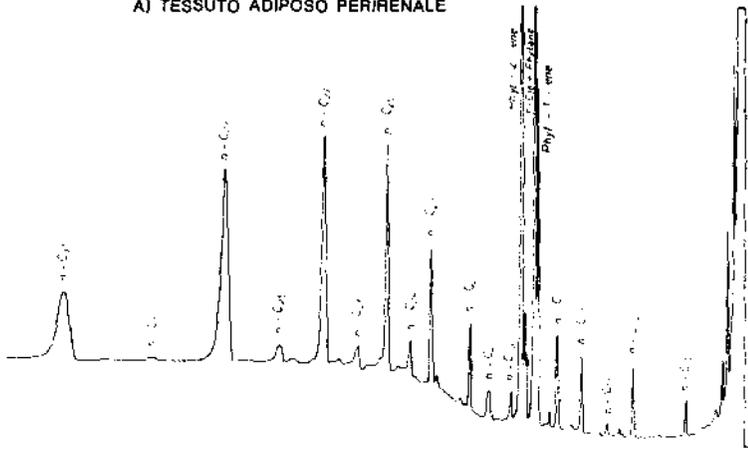
Ulteriori analisi GC/MS hanno consentito di identificare anche il fit-1-ene (3,7,11,15-tetrametilesadec-1-ene) e fit-2-ene per confronto degli spettri di massa con quelli riportati da Urback e Stark [20]. In accordo con questi AA., il picco identificato come fit-1-ene mostra un tempo di ritenzione più breve di quello del fit-2-ene su colonne non polari (Apiezon, OV-101). Inoltre i picchi identificati come fit-1-ene e fit-2-ene, a seguito di idrogenazione, scompaiono e danno luogo ad un solo picco con tempo di ritenzione e spettro di massa corrispondenti a quelli del fitano.

Nella zona del n-C<sub>18</sub> - n-C<sub>20</sub> si osservano a volte due picchi che a causa della loro bassa concentrazione non è stato possibile identificare. Comunque, in base al loro tempo di ritenzione non corrispondente ad alcun n-alcane e al fatto che non subiscono idrogenazione, si può ipotizzare che appartengano al gruppo del cicloesano alchil sostituito.

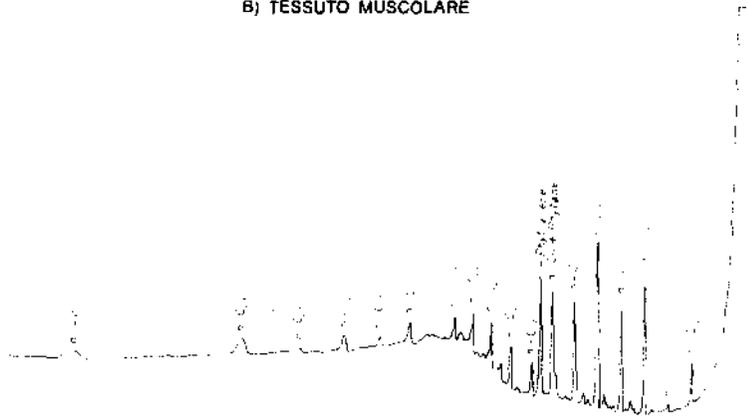
Nei cromatogrammi si osserva un certo numero di altri picchi con tempi di ritenzione non corrispondenti a quelli di n-alcane. A causa della loro bassa concentrazione, essi non sono stati identificati e dosati, ma si può assumere che siano idrocarburi insaturi, ramificati e cicloesani alchil sostituiti [5], che nella cromatografia su strato sottile mostrano lo stesso Rf degli n-alcane.

La presenza dello squalene non viene riportata in quanto con il metodo descritto esso è stato deliberatamente eliminato mediante l'analisi TLC. per facilitare il dosaggio degli n-alcane nella zona del n-C<sub>20</sub>; inoltre la sua determinazione non è rilevante ai fini di uno studio sul significato degli n-alcane negli alimenti. Invece lo squalano nell'esame gas cromatografico non disturba in quanto va a cadere nella zona n-C<sub>26</sub> - n-C<sub>27</sub>. Sebbene in alcuni campioni compaia nella zona un piccolo picco, la presenza di squalano non è riportata in questa nota in quanto l'identificazione non è sicura.

## A) TESSUTO ADIPOSO PERIRENALE



## B) TESSUTO MUSCOLARE



## C) FEGATO

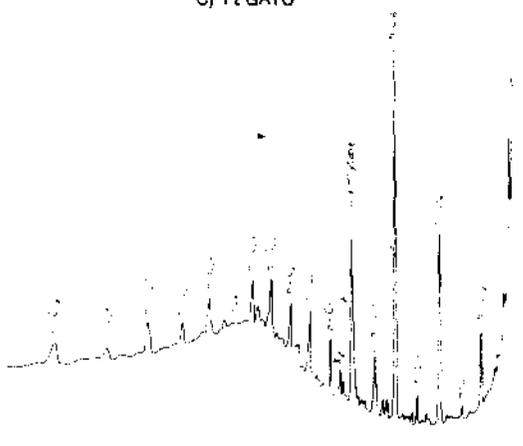


Fig. 2. — Gas cromatogrammi di estratti: (A) tessuto adiposo perirenale bovino; (B) tessuto muscolare bovino; (C) fegato bovino. Condizioni: vedi testo.

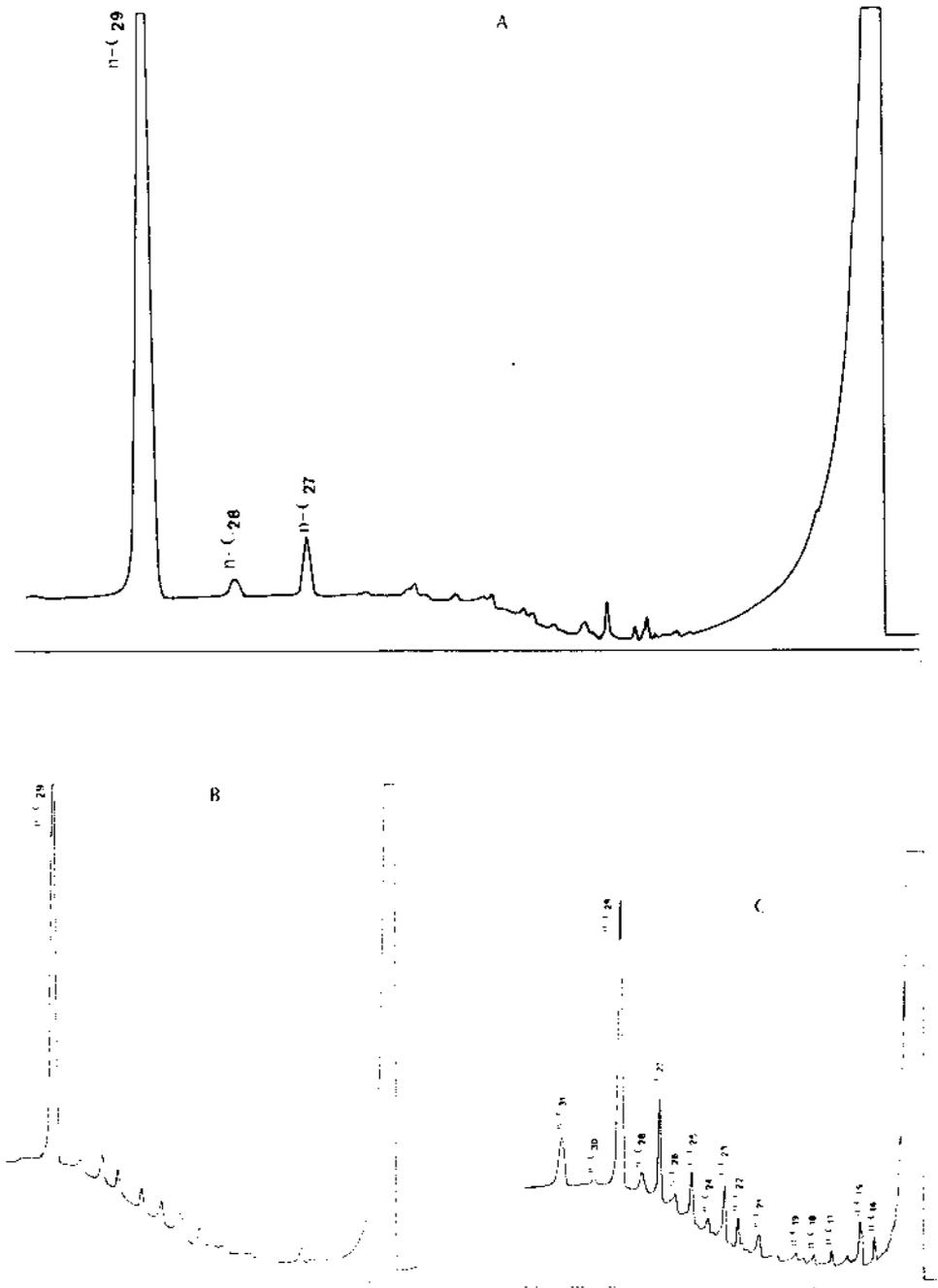


Fig. 3. — Gas cromatogrammi di estratti: (A) mela con buccia; (B) pera con buccia; (C) albicocca. Condizioni: vedi testo.

Con il metodo qui descritto sono stati esaminati alcuni campioni di sostanze alimentari di origine animale e vegetale allo scopo di valutare l'incidenza degli *n*-alcani nell'alimentazione umana e avere così un'idea del significato e dell'importanza di eventuali residui di *n*-alcani derivanti dall'uso di proteine da organismi unicellulari nell'alimentazione animale. Sono stati anche analizzati dei campioni di proteine da organismi unicellulari che hanno mostrato contenere *n*-alcani residui per un totale di circa 0,4 % p/p.

Nella Fig. 4 è presentato un tipico gas cromatogramma degli *n*-alcani estratti da proteine di organismi unicellulari; accanto ad ogni picco è segnata anche la percentuale relativa di ciascun *n*-alcano rispetto al totale.

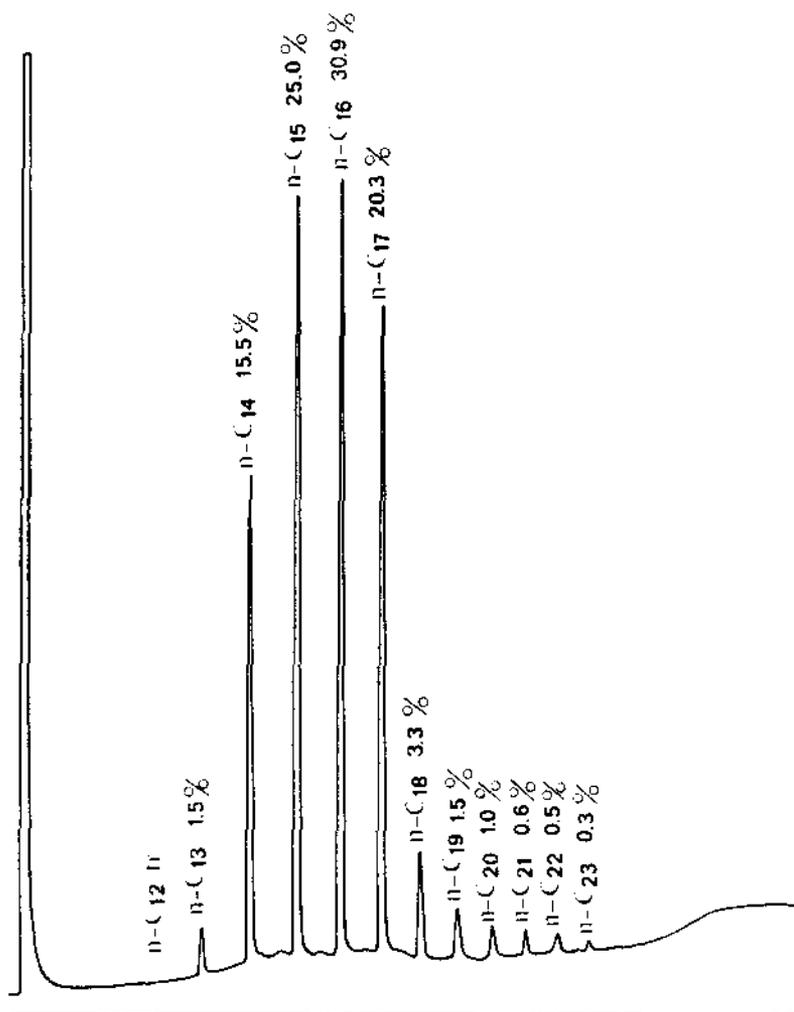


Fig. 4. — Gas cromatogramma di *n*-alcani estratti da un campione di proteine da organismi unicellulari; accanto ad ogni picco è riportata anche la percentuale relativa di ciascun *n*-alcano rispetto al totale. Condizioni: vedi testo.

La composizione percentuale media degli *n*-alcani è riportata in Tab. 2. Nella Tab. 3 sono riportati i valori in ppm (mg/kg), per ciascun idrocarburo identificato nei campioni di alimenti esaminati.

Nel tessuto adiposo di bovino (Fig. 2) si nota una predominanza di idrocarburi a numero dispari di atomi di carbonio nella zona alta del cromatogramma, mentre nella zona bassa predomina il *n*-C<sub>18</sub> tra i lineari e fitano e fitene tra i ramificati. Nel fegato di bovino si trovano in quantità confrontabili idrocarburi pari e dispari, eccetto che nella zona bassa del cromatogramma dove predominano gli idrocarburi pari con una distribuzione a campana centrata su *n*-C<sub>16</sub>. Una distribuzione analoga è riportata da Ferretti

## Valori in ppm degli idrocarburi identici

*n*-Alcani

ALIMENTO	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Pane rosetta . . . . .	—	—	—	—	—	0,01	—	—	—
Pane a cassetta . . . . .	—	—	—	—	—	0,04	0,01	0,01	—
Pane all'olio . . . . .	—	—	—	—	—	0,02	0,01	0,01	—
Pane casareccio . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Grissini . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Farina grano . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Olio sop. vergine . . . . .	0,03	—	0,01	0,01	0,02	—	—	—	—
Olio sansa oliva . . . . .	—	—	—	—	0,11	—	—	—	—
Olio semi vari . . . . .	—	—	—	—	0,01	—	—	—	—
Burro . . . . .	—	—	—	—	0,07	0,59	0,05	—	0,15
Margarina . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0,01
Riso . . . . .	2,94	—	7,5	5,8	0,24	—	2,4	0,41	1,0
Pomodori . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0,01
Spinaci . . . . .	—	—	—	—	0,10	—	7,2 (b)	—	—
Bietola . . . . .	—	—	—	0,03	0,03	—	4,5 (b)	—	—
Fagiolini . . . . .	—	—	—	0,01	—	—	—	0,01	—
Cetrioli . . . . .	—	—	—	0,02	—	—	0,01	0,02	0,01
Zucchine . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Melanzane . . . . .	—	—	0,01	—	0,03	—	0,02	—	0,01
Peperoni . . . . .	—	—	0,01	—	0,02	0,01	0,05	0,17	0,13
Sedano . . . . .	—	—	0,01	0,02	0,20	0,01	0,04	0,08	0,05
Patate . . . . .	—	—	—	—	0,01	—	0,01	—	0,01
Verze . . . . .	—	—	—	—	0,02	—	0,03	0,03	0,02
Melograni . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	0,01	—
Mele sbucciate . . . . .	—	—	—	—	0,25	—	0,01	—	—
Mele intere . . . . .	—	—	—	—	0,01	—	—	—	—
Mele golden intere . . . . .	—	—	—	—	0,03	—	0,03	0,02	0,05
Prugne . . . . .	—	—	0,02	—	—	—	0,02	—	—
Pere . . . . .	—	—	0,01	—	0,04	—	0,03	—	—
Albicocche . . . . .	—	—	0,02	0,06	—	0,01	0,01	0,01	—
Pesche . . . . .	—	—	0,02	0,11	0,10	—	0,04	—	0,02
Fegato bovino . . . . .	0,08	0,01	0,23	0,04	0,46	0,13	0,15	0,11	0,08
Tessuto muscolare bovino . . . . .	0,02	0,01	0,14	0,09	0,25	0,17	0,22	0,09	0,17
Tessuto adiposo perirenale bovino . . . . .	—	—	—	0,37	0,60	1,20	3,0	0,27	—

Osservazioni: (a) nel riso è presente una quantità di idrocarburi superiore a C<sub>20</sub> (300-400 ppm).  
(b) è stato valutato come C<sub>18</sub>, un insieme di vari composti saturi ed insaturi.

TABELLA 2

## Composizione percentuale delle n-parafine della Toprina \*

PARAFFINA		%	PARAFFINA		%
C <sub>13</sub>	Tridecano	2,80	C <sub>21</sub>	Eneicosano	0,40
C <sub>14</sub>	Tetradecano	17,00	C <sub>22</sub>	Duocosano	0,01
C <sub>15</sub>	Pentadecano	19,00	C <sub>23</sub>	Tricosano	5,50
C <sub>16</sub>	Esadecano	16,00	C <sub>24</sub>	Tetracosano	5,60
C <sub>17</sub>	Eptadecano	8,60	C <sub>25</sub>	Pentacosano	1,10
C <sub>18</sub>	Ottadecano	1,60	C <sub>26</sub>	Esacosano	3,50
C <sub>19</sub>	Nonadecano	0,80	C <sub>29</sub>	Nonacosano	8,50
C <sub>20</sub>	Eicosano	0,60	C <sub>30</sub>	Triacosano	9,00

\* Il dosaggio è stato effettuato con il metodo descritto da Di Muccio e Coli. (questo volume, pag. 325).

## ficati in diversi campioni alimentari

TABELLA 3

(atomi di C)

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	TOTALE ppm
—	—	0,02	—	0,07	—	0,05	—	0,07	—	0,02	—	0,24
—	—	0,03	—	0,09	—	0,05	—	0,06	—	0,03	—	0,32
—	—	0,03	0,01	0,09	—	0,04	—	0,05	0,01	0,01	—	0,28
—	—	0,07	0,01	0,26	0,01	0,14	0,02	0,13	0,02	0,06	—	0,72
—	—	0,01	—	0,09	0,01	0,05	—	0,05	—	0,02	—	0,28
—	—	0,02	0,01	0,11	—	0,04	—	0,04	—	0,01	—	0,23
0,01	0,01	0,12	0,08	0,37	0,07	0,44	0,31	0,31	0,03	0,39	—	2,21
0,05	0,05	0,03	0,19	1,0	0,17	2,3	0,43	1,7	0,09	0,38	—	8,70
—	—	0,01	—	0,02	—	0,06	0,03	0,13	0,03	0,66	—	0,95
0,25	0,42	0,60	0,75	0,67	0,53	0,41	0,25	0,30	0,04	0,10	—	5,18
0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,02	0,08	—	0,09	—	0,34
0,49	—	—	1,1	—	—	—	—	—	—	—	—	21,84 <sup>(a)</sup>
—	—	—	—	—	—	0,01	0,01	0,06	0,01	0,09	—	0,19
—	—	0,05	—	0,01	—	0,10	—	4,69	—	—	—	12,15
—	—	—	—	—	—	—	—	0,09	—	—	—	4,65
—	—	—	—	0,01	0,01	0,04	—	0,13	—	0,29	—	0,50
0,21	0,02	0,17	0,02	0,07	—	0,06	—	0,05	—	—	—	0,66
0,78	0,06	1,1	0,02	0,17	0,02	0,07	—	0,03	—	0,01	—	2,26
0,03	0,04	—	—	0,04	0,02	0,04	—	0,02	—	—	—	0,26
—	0,02	—	—	0,04	0,02	0,06	—	0,04	—	0,03	—	0,50
—	0,05	0,02	0,01	0,01	—	—	—	—	—	—	—	0,50
—	0,01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,04
—	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	2,3	0,25	0,90	—	2,85
—	—	0,01	—	0,05	0,02	0,20	0,03	0,08	—	—	—	0,40
—	—	—	—	—	—	—	0,06	—	—	—	—	0,33
—	—	—	—	—	—	0,05	0,02	1,2	—	—	—	1,28
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,13
—	0,08	—	—	0,10	—	0,91	0,12	9,1	—	0,91	—	11,26
—	0,03	—	—	—	—	0,05	0,03	0,96	—	—	—	1,15
0,04	0,04	0,07	0,03	0,08	0,02	0,17	0,06	0,66	0,02	0,16	—	1,48
0,02	0,02	0,03	—	0,05	—	0,03	—	0,03	—	—	—	0,47
0,08	0,06	0,10	—	0,07	0,06	0,10	0,04	0,09	—	—	—	1,89
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,09	0,18	0,08	0,08	0,07	—	0,11	0,06	0,15	—	—	—	1,98
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,12	—	0,67	0,29	1,40	—	2,56	—	5,34	—	2,52	—	18,64

e Flanagan [8] nel fegato di coniglio, ma con apice su  $n-C_{23}$ . Nel fegato non è stata riscontrata la presenza di fitene. Nel muscolo di bovino predominano idrocarburi a catena corta, sia pari che dispari.

Per quanto riguarda la farina e gli alimenti a base di grano si osserva che prevalgono gli idrocarburi dispari nella zona alta del cromatogramma ( $n-C_{25}$ ,  $n-C_{27}$ ,  $n-C_{29}$ ); nei campioni esaminati si hanno valori per il totale di  $n$ -alcani inferiori a 1 ppm (mg/kg).

Anche per gli alimenti grassi di origine vegetale si osserva il prevalere degli  $n$ -alcani dispari nella zona alta ( $n-C_{23}$ ,  $n-C_{25}$ ,  $n-C_{27}$ ,  $n-C_{29}$ ,  $n-C_{31}$ ); tuttavia il valore totale nei campioni esaminati ha valori bassi: 0.34-0.95 per olio di semi vari e margarina che sono sottoposti a raffinazione (deodorizzazione in corrente di vapore), mentre si hanno valori più elevati (2,21 ppm per olio sopraffino vergine; 5.18 ppm per il burro) per grassi non trattati.

L'olio di sansa di oliva contiene quantità più elevate in quanto viene ottenuto per estrazione con solventi: infatti sono molto incrementati i  $n-C_{25}$ ,  $n-C_{27}$ ,  $n-C_{29}$ ,  $n-C_{31}$  che sono caratteristici dei prodotti vegetali; dagli altri valori riportati in Tab. 2 si osserva che in generale per prodotti vegetali l'idrocarburo relativamente più importante è il  $n-C_{29}$ , con un predominio degli idrocarburi dispari alti.

Melanzane, peperoni e patate sembrano, invece, avere quantità modeste di  $n$ -alcani con una distribuzione piuttosto uniforme.

Come conclusione delle analisi riportate in questa nota si può affermare che sebbene gli  $n$ -alcani sono risultati presenti in tutti gli alimenti esaminati che sono abbastanza rappresentativi di quelli che entrano in una dieta umana, i valori globali di  $n$ -alcani sono molto ridotti non superando in generale le 10 ppm.

Tuttavia per poter attribuire a ciascun alimento un valore statisticamente valido del contenuto di  $n$ -alcani sarà necessario esaminare un numero più elevato di campioni, possibilmente di varia provenienza, per ognuno degli alimenti considerati. Una indagine di questo tipo è attualmente in corso su vari tipi di alimenti.

D'altro canto lo scopo della presente nota è stato quello di considerare il maggior numero di tipi di alimenti per poter avere una visione generale dello stato del problema.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CARRUTHERS, W. & JOHNSTONE, A. W. 1959. Composition of a paraffin wax fraction from tobacco leaf and tobacco smoke. *Nature*, **124**: 1131-1132.
2. JOHNSTON, R. L. & JONES, L. A. 1968. Separation and gas chromatographic determination of normal hydrocarbons in tobacco leaves. *Anal. Chem.* **40**: 1728-1731.
3. ADAMS, T. C. JR. & JONES, L. A. 1973. Long-chain hydrocarbons of Cannabis and its smoke. *J. Agr. Food Chem.* **21**: 1129-1131.

1. NICHOLAS, H. J. & BOMBAUGH, K. J. 1965. Constituents of the hydrocarbon fraction of beef brains. *Biochim. Biophys. Acta.* **98**: 372-379.
5. NAGY, B., MODZELESKI, V. E. & SCOTT, W. M. 1969. Saturated hydrocarbons in bovine liver. *Biochem. J.* **114**: 645-648.
6. BODY, D. R. 1977. Characterization of bovine rumen liquor isoprenoid hydrocarbons with reference to dietary phytol. *Lipids.* **12**: 204-207.
7. BANDURSKI, E. L. & NAGY, B. 1975. Nature of alkanes in beef heart lipids. *Lipids.* **10**: 67-69.
8. FERRETTI, A. & FLANAGAN, V. P. 1977. Tissue variation in hydrocarbon composition in the rabbit. *Lipids.* **12**: 198-203.
9. ROSE, H. G. & LIBER, A. F. 1966. Accumulation of saturated hydrocarbons in human spleens. *J. Lab. Clin. Med.* **68**: 475-483.
10. CAIN, C. E., BELL, O. E. JR., WHITE, H. B. JR., SULTA, L. L. & SMITH, R. R. 1967. Hydrocarbons from human meninges and meningiomas. *Biochim. Biophys. Acta.* **144**: 493-500.
11. BROOKS, C. J. W., STEEL, G. & HARLAND, W. A. 1970. Lipids of human atheroma. VI. Hydrocarbons of the atheromatous plaque. *Lipids.* **5**: 818-824.
12. SCHLUNEGGER, U. P. 1972. Distribution patterns of n-alkanes in human liver, urine and sweat. *Biochim. Biophys. Acta.* **260**: 339-344.
13. GAZZARRINI, F. & NAGY, B. 1966. Saturated hydrocarbons in human femoral arterial tissues and plaques. *Arch. Biochem. Biophys.* **113**: 245-252.
14. ALBRO, P. W. & HUSTON, C. K. 1964. Lipids of *Sarcina Lutea*. II. Hydrocarbon content of the lipid extracts. *J. Bacteriol.* **88**: 981-986.
15. TORNABENE, T. G. & MARKEY, S. P. 1971. Characterization of branched monounsaturated hydrocarbons of *Sarcina Lutea* and *Sarcina Flava*. *Lipids.* **6**: 190-195.
16. TULLIEZ, J., BORIES, G., BOUDENE, C. & FEVRIER, C. 1975. Les hydrocarbures des algues spirulinaes: nature, étude du devenir de l'heptadécane chez le rat et le porc. *Ann. Nutr. Alim.* **29**: 563-572.
17. MOLD, J. D., MEANS, R. E., STEVENS, R. K. & RUTH, J. M. 1964. The paraffin hydrocarbons of wool wax. Normal, iso, anteiso and other branched isomers. *Biochemistry.* **3**: 1293-1298.
18. KUKSIS, A. 1964. Hydrocarbon composition of some crude and refined edible seed oils. *Biochemistry.* **3**: 1086-1093.
19. YOUNGS, V. L. & GILLES, K. A. 1970. Wheat hydrocarbons. *Cereal Chem.* **47**: 317-323.
20. URBACH, G. & STARK, W. 1975. The C-20 hydrocarbons of butterfat. *J. Agr. Food Chem.* **23**: 20-24.
21. GROB, K. & GROB, G. 1971. Gas-liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> organic compounds in an urban atmosphere. An application of ultratrace analysis on capillary columns. *J. Chromatogr.* **62**: 1-13.
22. TULLIEZ, J.-E. & BORIES, G.-F. 1975. Métabolisme des hydrocarbures paraffiniques et naphéniques chez les animaux supérieurs. II-Accumulation et mobilisation chez le rat. *Ann. Nutr. Alim.* **29**: 213-221.

23. KOLATTUKUDY, P. E. & HANKIN, L. 1966. Metabolism of a plant wax paraffin (n-nona-cosano) in the rat. *J. Nutr.* **90**: 167-174.
24. MCCARTHY, R. D. 1964. Mammalian metabolism of straight-chain saturated hydrocarbons. *Biochim. Biophys. Acta.* **84**: 74-79.
25. WESLEY HORTON, A. & McCLURE, D. W. 1971. Ionic transport through model membranes. I. Effects of accelerators of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **225**: 248-253.
26. WESLEY HORTON, A., ESHLEMAN, D. N., SCHUFF, A. R. & PERMAN, W. H. 1976. Correlation of cocarcinogenic activity among n-alkanes with their physical effects on phospholipid micelles. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**: 387-391.
27. BINGHAM, E. & NORD, P. J. 1977. Cocarcinogenic effects of n-alkanes and ultraviolet light on mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 1099-1101.
28. MODZELESKI, V. E., MACLEOD, W. D. JR. & NAGY, B. 1968. A combined gas chromatographic-mass spectrometric methods for identifying n- and branched-chain alkanes in sedimentary rocks. *Anal. Chem.* **40**: 987-989.
29. MCCARTHY, E. D., HAN, J. & CALVIN, M. 1968. Hydrogen atom transfer in mass spectrometric fragmentation patterns of saturated aliphatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* **40**: 1475-1480.
30. VALFRE', F., BOSI, G. & BELLEZZA, P. 1977. Presenza di n-paraffine in mangimi e risvolti igienico-sanitari. *Selezione Suinavicunicola.* **11**: 3-13.

# Metodi analitici per la determinazione di oligoelementi nelle biomasse da n-alcani

ADRIANA PEPE e ROSA GIORDANO (\*)

*Laboratorio di Tossicologia*

## DETERMINAZIONE DEL MERCURIO

1. - Il presente metodo consente di determinare il mercurio; il limite inferiore della determinazione è 0,02 mg/kg.

### 2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene mineralizzato a caldo, a riflusso, con acido solforico e acido nitrico. L'ossidazione viene completata con aggiunta di una soluzione di permanganato di potassio. Dopo aver aggiunto cloridrato di idrossilamina e cloruro stannoso, il mercurio si determina mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in vapore freddo.

### 3. - *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere quanto più è possibile esenti da mercurio.

3.1. - Acqua bidistillata.

3.2. - Acido nitrico ( $d = 1,40$ ).

3.3. - Acido solforico ( $d = 1,84$ ).

3.3.1. - Acido solforico 7 N circa: diluire un volume di acido solforico concentrato (3.3) con 4 volumi di acqua (3.1).

3.3.2. - Acido solforico 2 N circa: diluire 1 volume di acido 7 N (3.3.1) con 2,5 volumi di acqua (3.1).

3.4. - Acido cloridrico ( $d = 1,18$ ).

---

(\*) Borsista del Laboratorio di Tossicologia.

- 3.5. - Soluzione di permanganato di potassio, 50,0 g per litro.
- 3.6. - Soluzione acquosa di cloridrato di idrossilammina, 100,0 g per litro.
- 3.7. - Soluzione di cloruro stannoso: sciogliere a caldo 25,0 g di  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 50 ml di acido cloridrico (3.4), portare al volume di 250 ml con acqua (3.1) e far gorgogliare azoto nella soluzione. Conservare in presenza di 1-2 g di stagno metallico.
- 3.8. - Misto solfocromico: sciogliere 4,0 g di bicromato di potassio in 300 ml di acido solforico 7 N (3.3.1) e portare al volume di un litro con acqua.
- 3.9. - Perclorato di magnesio, in granuli.
- 3.10. - Sostanza campione: cloruro mercurico ( $\text{HgCl}_2$ ).
- 3.11. - Soluzioni standard:
- 3.11.1. - Soluzione standard a 0,5 mg di Hg per ml: pesare 0,677 g  $\pm$  0,1 mg di sostanza (3.10) e, in un pallone tarato da un litro, scioglierla in circa 250 ml di acido solforico 7 N (3.3.1), aggiungere quasi 700 ml di acqua (3.1) e 1 ml della soluzione di permanganato di potassio (3.5). Portare a volume con acqua e mescolare. Preparare questa soluzione ogni tre mesi.
- 3.11.2. - Soluzione standard a 0,02  $\mu\text{g}$  di Hg per ml: diluire di 25.000 volte la soluzione standard (3.11.1) mediante diluizioni successive con acido solforico 2 N (3.3.2). Per esempio, portare due volte 10 ml a 250 ml e infine 10 ml a 400 ml. Prima di portare definitivamente a volume la soluzione, aggiungere goccia a goccia del permanganato di potassio (3.5) fino a colorazione persistente. Preparare questa soluzione ogni giorno.

#### 4. - *Apparecchiatura.*

Tutta la vetreria deve essere pulita con acido nitrico (3.2) caldo, e risciacquata con acqua (3.1) prima dell'uso.

4.1. - Apparecchio per mineralizzazione con refrigerante a ricadere (Fig. 1).

4.2. - Gorgogliatore munito di tappo a due vie per permettere che i vapori di mercurio vengano trascinati, con una tacca che indichi il volume necessario per la misurazione. La capacità del gorgogliatore e l'altezza della tacca dipendono dallo spettrofotometro di assorbimento atomico utilizzato. Prima dell'uso, lavare più volte il gorgogliatore con il misto solfocromico (3.8) e risciacquarlo con acqua bidistillata (3.1).

4.3. - Assorbitore di vapore acqueo, riempito di perclorato di magnesio (3.9).

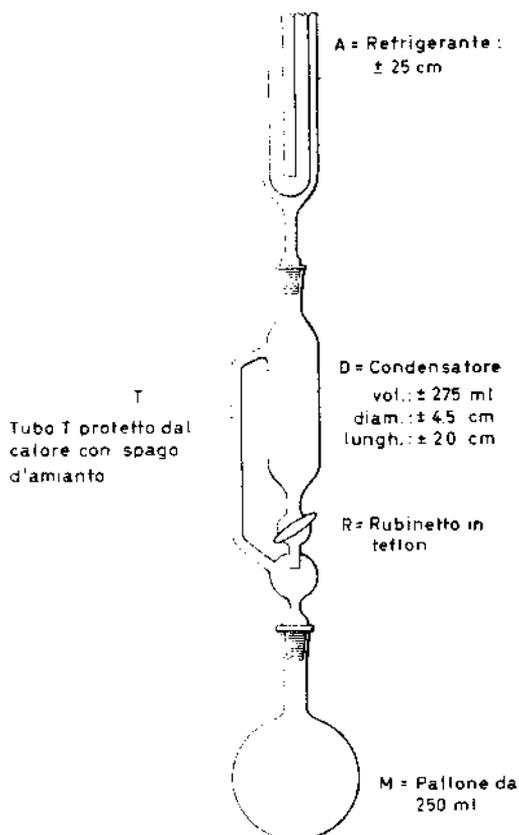


Fig. 1. — Apparecchio per la mineralizzazione.

4.4. — Spettrofotometro di assorbimento atomico per la determinazione del mercurio in vapore freddo, a circuito aperto o chiuso, munito di registratore.

#### 5. — Procedimento.

##### 5.1. — Mineralizzazione.

5.1.1. — Pesare con approssimazione di 2 mg, da 0,5 a 2 g di campione omogeneo, contenente non più di 0,5  $\mu\text{g}$  di mercurio totale. Se il contenuto in mercurio del campione è superiore a 1 mg/kg, pesare 0,5 g ed eseguire la determinazione del mercurio (5.3) su un'aliquota della soluzione ottenuta dal campione mineralizzato. Introdurre la quantità pesata nel pallone (M) ed aggiungervi qualche pallina di vetro. Raccordare il pallone al condensatore (D) e chiudere il rubinetto (R). Introdurre dal condensatore 25 ml di acido nitrico (3.2) e 10 ml di acido solforico (3.3). Montare il refrigerante (A)

e metterlo in funzione. Aprire con cautela il rubinetto (R) e lasciar fluire, poco per volta, i due acidi nel pallone. Interrompere l'aggiunta di acidi se la reazione è troppo vivace. A condensatore svuotato, omogenizzare il contenuto del pallone agitandolo con precauzione e lasciare il rubinetto aperto.

5.1.2. - Riscaldare cautamente il pallone. Quando non si forma più la schiuma, chiudere il rubinetto (R), continuare a scaldare e lasciare che nel condensatore si accumulino il condensato. Interrompere il riscaldamento quando il contenuto del pallone imbrunisce. Lasciar fluire il condensato un po' per volta nel pallone fino a che il colore schiarisca. Chiudere il rubinetto e scaldare di nuovo. Ripetere questa operazione ogni volta che, riscaldando, il contenuto del pallone imbrunisce. Continuare quindi a riscaldare e, al comparire di fumi bianchi, introdurre il condensato nel pallone. Proseguire in questa maniera, alternando il riscaldamento all'aggiunta del condensato per un'ora. Terminare il riscaldamento quando si formano fumi bianchi. Lasciar allora raffreddare fino a circa 40 °C, aprire il rubinetto e lasciar passare tutto il condensato nel pallone. Lavare l'apparecchio dalla testa del refrigerante con 5-10 ml di acqua (3.1), raccogliere l'acqua di lavaggio nel pallone e staccare il condensatore.

#### 5.2. - Trattamento della soluzione.

Introdurre nel pallone, goccia a goccia e agitando, la soluzione di permanganato di potassio (3.5) fino a colorazione rosa persistente. Prendere nota della quantità di soluzione (3.5) utilizzata (se tale quantità è superiore ai 10 ml, ripetere il procedimento a partire da (5.1)). Riscaldare dolcemente fino a decolorazione e lasciar raffreddare. Travasare il contenuto del pallone in un gorgogliatore (4.2), lavare il pallone con acqua (3.1) ed aggiungere le acque di lavaggio al contenuto del gorgogliatore. Se il dosaggio del mercurio viene effettuato su un'aliquota della soluzione, quando per esempio il contenuto di mercurio è superiore a 0,5 µg o se si deve ricorrere al metodo delle aggiunte (5.5), invece del gorgogliatore, usare un pallone tarato. Portare a volume con acqua (3.1), prelevare un'aliquota e collocarla nel gorgogliatore. Eseguire la determinazione del mercurio (5.3) lo stesso giorno del trattamento della soluzione (5.2).

#### 5.3. - Determinazione del mercurio.

Introdurre nel gorgogliatore 5 ml di cloridrato di idrossilammina (3.6) e portare a volume con acqua bidistillata (3.1) nel caso in cui viene utilizzata tutta la soluzione, oppure portare a volume con acido solforico 2 N (3.3.2) quando si tratti di un'aliquota della soluzione o delle soluzioni di riferimento. Aggiungere 5 ml della soluzione di cloruro stannoso (3.7) ed innestare il gorgogliatore all'assorbitore di vapore acqueo (4.3) ed allo spettrofotometro di assorbimento atomico (4.4). Mettere in funzione lo spettrofotometro. Ren-

dere omogeneo il contenuto del gorgogliatore agitando leggermente, far gorgogliare aria o azoto, eseguire la misurazione e registrarla. Effettuare le letture nel più breve tempo possibile dopo l'aggiunta del cloruro stannoso. Se si utilizza uno spettrofotometro (4.4) a circuito aperto, attendere 30 secondi prima di far gorgogliare l'aria o l'azoto.

#### 5.4. - Curva di riferimento.

Introdurre in altrettanti gorgogliatori volumi rispettivamente di 2,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 e 25,0 ml della soluzione standard (3.11.2) e, in uno stesso gorgogliatore, 25 ml di acido solforico 2 N (3.3.2). Aggiungere goccia a goccia ad ogni gorgogliatore la soluzione di permanganato di potassio (3.5) agitando cautamente, fino a colorazione persistente. Procedere alla determinazione del mercurio come indicato in (5.3). Tracciare la curva di riferimento riportando in ordinate i valori delle misure espresse in assorbanza ed in ascisse le quantità di mercurio in microgrammi. Le soluzioni di riferimento contengono rispettivamente 0,04 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,50 e 0  $\mu\text{g}$  di mercurio.

#### 5.5. - Metodo delle aggiunte.

Il metodo delle aggiunte può essere impiegato principalmente quando lo spettrofotometro (4.4) è utilizzato a circuito aperto o quando, dopo l'aggiunta del cloruro stannoso (5.3), la velocità di estrazione del mercurio dalla soluzione in esame è nettamente inferiore a quella osservata con le soluzioni di riferimento. Ciò si verifica quando il campione contiene molte sostanze organiche. Introdurre in un gorgogliatore una delle soluzioni standard diluite (5.4) ed aggiungere una porzione della soluzione in esame dopo trattamento secondo (5.2). La quantità di mercurio contenuto nel gorgogliatore deve trovarsi entro i valori per i quali lo spettrofotometro fornisce una risposta lineare. Determinare il mercurio come indicato in (5.3). Procedere eventualmente a parecchie determinazioni utilizzando diverse soluzioni standard diluite (4.4).

#### 5.6. - Prova in bianco.

Effettuare tutte le operazioni, dalla mineralizzazione (5.1) fino alla misurazione (5.3), tranne che l'introduzione del campione. Durante il trattamento della soluzione (5.2), introdurre una quantità di soluzione di permanganato di potassio uguale a quella utilizzata per il campione.

#### 6. - Calcoli.

Dalla curva di riferimento (5.4) determinare le quantità di mercurio in  $\mu\text{g}$  corrispondenti ai valori misurati dell'assorbanza. La quantità di mercurio in  $\text{mg}/\text{kg}$  è data dalla formula

$$\frac{A}{P} \cdot f$$

dove:

A = quantità in  $\mu\text{g}$  di Hg determinati nel campione, tenuto conto del valore del bianco;

P = peso in grammi del campione;

f = fattore di diluizione (nel caso di un'aliquota).

### DETERMINAZIONE DEL PIOMBO

1. - Il presente metodo consente di determinare il piombo: il limite inferiore della determinazione è di 0,2 mg/kg.

2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene incenerito e le ceneri disciolte in acido nitrico. Aggiustato il pH della soluzione a 1,5 con ammoniaca, il piombo viene chelato con pirrolidin-ditiocarbammato di ammonio (APDC) e successivamente estratto con metil-isobutil-chetone (MIBK). I chelati di piombo sono stabili in fase organica almeno per un'ora. Mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, il quantitativo di piombo presente nella fase organica è determinato a 283,3 nm.

3. - *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere di elevata purezza.

3.1. - Acido nitrico al 65 % (d = 1,40).

3.1.1 - Acido nitrico 1 N.

3.2. - Soluzione di idrossido di ammonio al 25 % (d = 0,91).

3.2.1. - Soluzione diluita di idrossido di ammonio (1 : 5).

3.3. - Soluzione all'1 % (m/v) di pirrolidin-ditiocarbammato di ammonio (APDC). Preparare la soluzione ogni giorno.

3.4. - Metil-isobutil-chetone (MIBK) saturato con acqua.

3.5. - Soluzione standard di piombo: in un matraccio tarato da 1000 ml sciogliere in acqua 0,1599 g di nitrato di piombo, aggiungere 10 ml di acido nitrico (3.1) e portare a volume con acqua. 1 ml = 100  $\mu\text{g}$  di Pb. Può anche essere usata una soluzione standard del commercio.

3.5.1. - Soluzione standard diluita: in un matraccio tarato da 200 ml collocare 20,0 ml della soluzione standard di piombo (3.5), portare a volume con acqua e mescolare. 1 ml di questa soluzione contiene 10  $\mu\text{g}$  di Pb.

#### 4. - *Apparecchiatura e vetreria.*

4.1. - Muffola a temperatura controllata.

4.2. - Capsule di quarzo o di platino.

4.3. - pHmetro con elettrodo a vetro e a calomelano.

4.4. - Spettrofotometro di assorbimento atomico.

4.5. - Lampada a scarica a radiofrequenza (EDF) o lampada a catodo cavo per il piombo.

4.6. - Vetreria pulita con acido nitrico diluito ed accuratamente risciacquata, impiegata esclusivamente per la determinazione del piombo.

#### 5. - *Procedimento.*

5.1. - In una capsula (4.2) pesare 10-20 g  $\pm$  1 mg di sostanza omogenea ed essiccata all'aria, mettere in muffola (4.1) e lasciare incenerire a 420-450 °C per una notte.

5.2. - Far raffreddare le ceneri, umettarle con 2-3 ml di acqua ed aggiungere 15 ml di acido nitrico (3.1). Riscaldare con cautela la capsula e filtrare raccogliendo il filtrato in un matraccio tarato da 100 ml. Lavare la capsula ed il filtro per cinque volte adoperando ogni volta 2 ml di acqua. Trasferire il filtro contenente il residuo nella capsula ed incenerire nuovamente per 3-5 ore. Sciogliere il residuo riscaldando la capsula cui sono stati aggiunti 10 ml di acido nitrico 1 N (3.1.1) e filtrare nello stesso matraccio da 100 ml. Lavare più volte capsula e filtro con acqua, portare a volume e mescolare.

5.3. - A seconda del quantitativo di Pb che si prevede presente nella soluzione, prelevare un'aliquota di questa, metterla in un piccolo becher ed aggiustare il pH con la soluzione di idrossido di ammonio (3.2) e, se necessario, anche con la soluzione diluita (3.2.1), usando il pHmetro (4.3). Ad operazione ultimata, il pH deve essere di 1,5.

5.4. - Trasferire la soluzione in un imbuto separatore, lavando il becher con alcuni ml di acqua. Aggiungere 5 ml di APDC (3.3) ed agitare. Aggiungere 10 ml di MIBK (3.4) e dibattere vigorosamente per 3 minuti.

5.5. - Scartare la fase acquosa e raccogliere la fase organica in una provetta.

5.6. - Preparare un bianco usando gli stessi reattivi, senza il campione

6. - *Curva di riferimento.*

6.1. - In matracci tarati da 100 ml pipettare 2,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 - 30,0 e 40,0 ml della soluzione standard diluita (3.5.1), aggiungere a ciascuno 15 ml di acido nitrico (3.1) e portare a volume con acqua. Mescolare bene.

6.1.1. - Collocare 10 ml di ciascuna soluzione (6.1) in altrettanti becher da 50 ml, aggiustare il pH a 1,5 con le soluzioni di idrossido di ammonio (3.2 e 3.2.1), trasferire le soluzioni in imbuto separatori ed aggiungere 5 ml di APDC (3.3) e 10 ml di MIBK (3.4). Dibattere bene per 3 minuti.

6.2. - Raccogliere le fasi organiche in altrettante provette. Le fasi organiche di 10 ml contengono rispettivamente 2 - 5 - 10 - 20 - 30 e 40  $\mu\text{g}$  di Pb.

7. - *Determinazione.*

7.1. - Accendere lo spettrofotometro di assorbimento atomico (4.4) e lasciare che la lampada per il piombo (4.5) si riscaldi almeno per 30 minuti. Aggiustare il monocromatore fino ad ottenere il massimo segnale nei pressi della lunghezza d'onda raccomandata di 283,3 nm. Usare fiamma aria-propano.

7.2. - Atomizzare il MIBK (3.4) nella fiamma ed aggiustare la fiamma in modo da ottenere il massimo di assorbanza (fiamma non luminescente). Aggiustare lo strumento ad assorbimento zero.

7.3. - Atomizzare nella fiamma le fasi organiche di 10 ml contenenti i quantitativi standard di piombo (6.2) e prendere nota delle letture o dei picchi. Costruire la curva di riferimento riportando i valori misurati contro la concentrazione e tenere conto del valore del bianco.

7.4. - Atomizzare nella fiamma la soluzione del campione (5.5) e prendere nota delle letture o dei picchi. Leggere la quantità di piombo presente nel campione facendo uso della curva di riferimento e tenendo conto del bianco.

8. - *Calcoli.*

Calcolare la quantità di piombo del campione come segue:

$$\text{mg/kg} = \frac{C \cdot V}{p \cdot v}$$

dove:

C =  $\mu\text{g}$  Pb (per 10 ml) ricavati dalla curva di riferimento;

p = peso del campione in grammi;

V = volume finale in ml della soluzione in esame;

v = volume in ml dell'aliquota prelevata dalla soluzione per l'analisi.

## DETERMINAZIONE DEL SELENIO

1. - Il presente metodo consente di determinare il selenio; il limite inferiore della determinazione è 0,02 mg/kg.

2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene mineralizzato con acido nitrico, la soluzione viene portata a secco ed il residuo incenerito in presenza di nitrato di magnesio. Il selenio, ridotto allo stato tetravalente, viene complessato con 2,3-diammino-naftalene a pH 1 ottenendosi il 4,5-benzo-piaz-selenolo. L'estratto di quest'ultimo in cicloesano è eccitato alla lunghezza d'onda di 366 nm e l'emissione è misurata a 520 nm.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di ammoniaca (densità: 0,88 g/ml).

3.2. - Cicloesano per spettrofotometria.

3.3. - Acido cloridrico (densità: 1,18 g/ml).

3.4. - Acido nitrico extrapuro (densità 1,42 g/ml).

3.5. - Soluzione diluita di ammoniaca. Mescolare 200 ml della soluzione (3.1) con acqua e portare al volume di 500 ml.

3.6. - Soluzione di 2,3-diammino-naftalene. Sciogliere 0,1 g di 2,3-diammino-naftalene in 100 ml di acido cloridrico 0,1 N (3.8); riscaldare a 50 °C per 20 minuti e quindi lasciar raffreddare. Questo reattivo deve essere preparato immediatamente prima dell'uso e deve essere purificato mediante estrazione con 4 porzioni di 10 ml ciascuna di cicloesano (3.2) e filtrazione su carta Whatman n. 1 (o equivalente). Eseguire queste operazioni a luce soffusa.

3.7. - Soluzione di EDTA. In 100 ml di acqua, sciogliere 1,5 g di etilendiammino-tetracetato bisodico biidrato.

3.8. - Acido cloridrico 0,1 N.

3.9. - Acido cloridrico 4 N.

3.10. - Soluzione di nitrato di magnesio. In pallone tarato da 1000 ml, sciogliere in acqua 700 g di nitrato di magnesio e portare a volume.

3.11. - Acido solforico diluito. In pallone tarato da 1000 ml contenente dell'acqua, aggiungere 100 ml di acido solforico (densità 1,84) e portare a volume con acqua.

3.12.1. - Soluzione standard di selenio. In un pallone tarato da 1000 ml. sciogliere 0.100 g di selenio (in polvere) nella minima quantità possibile di acido nitrico (3.4) e portare a volume con acido solforico diluito (3.11). 1 ml di questa soluzione contiene 100  $\mu\text{g}$  di selenio. Si possono usare anche soluzioni standard di selenio reperibili in commercio.

3.12.2. - Soluzione standard diluita di selenio. Diluire 1 ml della soluzione standard concentrata di selenio (3.12.1) con acido cloridrico 4 N fino al volume di 1000 ml. Preparare ogni giorno una nuova soluzione 1 ml = 0,1  $\mu\text{g}$  di selenio.

#### 4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Spettrofluorimetro o fotometro a filtri.

4.2. - Pallone a fondo rotondo da 500 ml con tappo smerigliato; condensatore adattabile al pallone.

4.3. - pHmetro il cui elettrodo deve essere usato soltanto per la determinazione del selenio.

4.4. - Muffola.

#### 5. - *Procedimento.*

5.1. - Dissoluzione del campione.

Pesare 1 g (con approssimazione di  $\pm$  0,001 g) di campione, introdurlo nel pallone (4.2), aggiungere 50 ml di acido nitrico (3.4), agitare e quindi innestare al pallone il condensatore a ricadere. Lasciare in riposo per una notte a temperatura ambiente. Se si forma schiuma molto abbondante, agitare con precauzione il contenuto del pallone. Riscaldare a fiamma bassa per 30 minuti e quindi a fiamma vivace; lasciare bollire a riflusso per 4-5 ore. Travasare il contenuto del pallone in una capsula di porcellana e collocarla a bagno maria portando quasi a secchezza. Mettere in stufa a 105 °C per un'ora. Lasciar raffreddare, aggiungere 20 ml di soluzione di nitrato di magnesio (3.10), mescolare con cautela il contenuto della capsula adoperando una bacchetta di vetro ed evaporare fin quasi a secchezza su bagno maria. Mettere la capsula in stufa regolata a 100 °C e, in 5-6 ore, portare progressivamente la temperatura a 160 °C. Mescolare ogni tanto con la bacchetta di vetro per evitare che la schiuma trabordi. Coprire la capsula con un vetro da orologio, metterla in un'altra capsula di porcellana più grande ed aumentare progressivamente la temperatura facendo in modo che in 4-5 ore si raggiungano i 210 °C. Mantenere a questa temperatura per 2 ore. Mettere le capsule in muffola (4.4) previamente scaldata a circa

220 °C, portare la temperatura progressivamente a 550 °C e mantenerla per 3 ore. Lasciar raffreddare, disciogliere le ceneri in 25 ml di acido cloridrico concentrato (3.3), coprire con vetro da orologio trasparente e riscaldare per 10 minuti a bagno maria. Lasciar raffreddare.

5.2. - Preparare un bianco usando tutti i reattivi necessari per la determinazione tranne il campione.

### 5.3. - Determinazione.

Trasferire le soluzioni preparate come in 5.1 e 5.2 in altrettanti palloni tarati da 100 ml e portare a volume con acido cloridrico 0,1 N (3.8). Trasferire in una beuta da 150 ml un'aliquota di 50 ml di soluzione (o una adeguata frazione contenente non più di 0,5 µg di selenio, diluita a 50 ml con acido cloridrico 0,1 N) ed aggiungere 2 ml di soluzione di EDTA (3.7). (Se il campione è ricco in cationi, aggiungere 3 ml di soluzione di EDTA). Con un pHmetro (4.3) aggiustare il pH a 1,0, impiegando una soluzione di ammoniaca (3.5). Aggiungere 5 ml di una soluzione di 2,3-diammino-naftalene e riscaldare a 50 °C su bagno maria per 20 minuti. Quando la soluzione si è raffreddata fino a temperatura ambiente, travasarla in un imbuto separatore da 100 ml ed aggiungere 5,0 ml di cicloesano (3.3). Agitare per un minuto, attendere fino a separazione delle due fasi e scartare la fase acquosa. Eliminare dal cicloesano le ultime tracce di acqua mediante filtrazione su filtro di carta o al silicone (Whatman 1 PS o equivalente) oppure centrifugare. Misurare l'intensità della fluorescenza della soluzione di cicloesano regolando la lunghezza d'onda di eccitazione dello spettrofluorimetro a 366 nm e la lunghezza d'onda di emissione a 520 nm.

### 5.4. - Curva di riferimento.

In una serie di palloni tarati da 100 ml, collocare volumi appropriati di soluzione standard diluita (3.12.2) contenenti rispettivamente 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 e 0,50 µg di selenio. Diluire ogni soluzione a 50 ml con acido cloridrico 0,1 N (3.8) ed aggiungere 2 ml di soluzione di EDTA (3.7). Aggiustare il pH a 1,0 usando la soluzione di ammoniaca (3.5) e controllandolo con il pHmetro (4.3). Procedere alla determinazione come descritto al punto 5.3 iniziando da « aggiungere 5 ml di soluzione di 2,3-diammino-naftalene ... ». Tracciare la curva di riferimento riportando le intensità di fluorescenza in funzione delle quantità di selenio presenti.

### 6. - Calcoli.

Calcolare le quantità di selenio nel campione dalla curva di riferimento, tenendo conto del valore del bianco.

## DETERMINAZIONE DEL FLUORO

1. - Il presente metodo consente di determinare il fluoro; il limite inferiore della determinazione è di 0,2 mg/kg.

2. - *Principio del metodo.*

In presenza di sostanza organica, il campione deve essere mineralizzato in capsula di nichel. Per campioni a contenuto di fluoro relativamente elevato, si può usare una normale muffola mentre, per campioni a basso contenuto in fluoro, deve essere usata una muffola a tenuta di gas, rivestita internamente di nichel. Le ceneri vengono fuse con soda caustica ed il prodotto della fusione viene disciolto in acqua; la soluzione è quindi trasferita in un pallone da distillazione aggiungendovi del solfato ferroso per ridurre il Mn(IV) ed il Ni(III). Si aggiunge poi acido solforico 24 N contenente del solfato di argento e privo di fluoro e di nitrati. Il fluoro viene quindi raccolto sotto forma di acido fluoridrico idrato o di  $H_2SiF_6$ . La determinazione del fluoro nel distillato può essere eseguita sia fotometricamente a 620 nm sotto forma di complesso fluoro-lantanio-alizarina, sia potenziometricamente usando un elettrodo specifico.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido acetico al 96% (v/v) (acido acetico glaciale).

3.2. - Acetone.

3.3. - Idrossido di ammonio al 25% (d = 0,91).

3.4. - Fluoruro di sodio.

3.5. - Acetato di sodio,  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ .

3.6. - Idrossido di sodio.

3.7. - Nitrato di lantanio,  $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ .

3.8. - Cloruro di sodio.

3.9. - Alizarina-complexon: acido alizarin-3-metilammino-N, N-diacetico (biidrato).

3.10. - Acido solforico 24 N, esente da fluoro: in un pallone da 2 litri a fondo rotondo, mettere 1 litro di acido solforico 24 N e qualche pallina di vetro. Raccordare il pallone ad un generatore di vapore (pallone Pyrex da 2 litri a fondo ritondo) e ad un condensatore. Riscaldare l'acido solforico a 120-130 °C, introdurvi il vapore e distillare, a circa 150 °C, raccogliendo

circa un litro di liquido. Per riportare l'acido solforico alla normalità primitiva, aumentare l'intensità della fiamma e cessare la distillazione quando la temperatura sarà arrivata a 171 °C.

3.11. - Acido solforico esente da fluoro e da nitrati, contenente solfato di argento: mettere 10 g di solfato di argento, 1 g di solfato ferroso  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 10 ml di acido solforico concentrato in una capsula di porcellana e riscaldare la soluzione per 10 minuti dopo il primo cospicuo svolgimento di  $\text{SO}_3$ . Raffreddare, versare la soluzione in un becher lavando la capsula con un totale di 500 ml di acido solforico 24 N esente da fluoro (3.10), riscaldare agitando con una bacchetta di vetro fino ad ottenere una soluzione chiara.

3.12. - Reattivo misto alizarina-complexon-lantanio. In un becher sospendere, in circa 100 ml di acqua, 192 mg di alizarina-complexon (3.9) e aggiungere 1 ml di ammoniaca concentrata. Dopo completa dissoluzione, aggiungere 1 ml di acido acetico glaciale. In un altro becher, sciogliere 34 g di acetato di sodio in 150 ml di acqua e 15 ml di acido acetico glaciale. In un terzo becher, sciogliere 433 mg di nitrato di lantanio in circa 100 ml di acqua. Per preparare il reattivo misto, in un pallone tarato da 1000 ml mescolare, nell'ordine, la soluzione di alizarina-complexon, la soluzione di acetato di sodio e la soluzione di nitrato di lantanio, aggiungere 250 ml di acetone e portare a volume con acqua. Il reattivo misto può essere conservato per circa 14 giorni (al buio).

3.13. - Soluzione standard di fluoro. In un pallone tarato da 1000 ml, sciogliere in acqua 0,4421 g di fluoruro di sodio e portare a volume con acqua. 1 ml = 200  $\mu\text{g}$  di F.

3.13.1. - Soluzione standard diluita di fluoro. Prelevare 25,0 ml della soluzione standard di fluoro (3.13) e collocarli in un pallone tarato da 500 ml; portare a volume con acqua e mescolare bene. 1 ml di questa soluzione contiene 10  $\mu\text{g}$  di fluoro.

3.14. - Soluzione tampone CDTA. Sospendere in 800 ml di acqua 4 g di acido cicloesano-1,2-diammino-tetracetico e portare in soluzione aggiungendo, goccia a goccia, una soluzione di idrossido di sodio al 40%. Aggiungere 57 ml di acido acetico (3.1), 58 g di cloruro di sodio (3.8) e agitare bene fino a completa dissoluzione. Portare il pH della soluzione a 5,5-5,8 mediante aggiunta di piccole quantità di soluzione di idrossido di sodio o di acido acetico e portare a volume di 1000 ml con acqua.

La soluzione tampone CDTA è anche reperibile in commercio.

#### 4. - Apparecchiatura.

4.1. - Apparecchio di distillazione in corrente di vapore. Usare una normale apparecchiatura di distillazione in corrente di vapore o altra apparec-

chiatura a temperatura controllata (140 °C). Raccogliere il distillato in pallone tarato.

4.2. – Muffola riscaldata elettricamente con controllo della temperatura (Se necessario, a tenuta di gas e rivestita di nichel).

4.3. – Capsula di nichel di cm 8 di diametro.

4.4. – Spettrofotometro con celle da 4 o 5 cm.

4.5. – Elettrodo specifico per il fluoro ed elettrodo di riferimento a calomelano oppure elettrodo combinato per il fluoro.

4.6. – pHmetro digitale a scala espansa dei mV.

4.7. – Agitatore magnetico.

## 5. – Procedimento.

Pesare 15–20 g di sostanza in una capsula di nichel (4.3) e tenere in muffola per una notte a 550 °C. Dopo raffreddamento, aggiungere 5 g di idrossido di sodio (3.6) e fondere per 5 minuti a fiamma ossidante. Portare in soluzione con il minore quantitativo possibile di acqua e versare la soluzione, lavando più volte, nel pallone di distillazione. Aggiungere qualche pallina di vetro. Aggiungere quindi al pallone di distillazione una soluzione preparata di fresco contenente 2 g di solfato ferroso  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sciolti in circa 10 ml di acqua e mescolare ruotando il pallone. Collegare il pallone all'apparecchiatura di distillazione, aggiungere goccia a goccia 60 ml di acido solforico contenente solfato di argento (3.11) e cominciare a riscaldare, fino a raggiungere la temperatura di 140 °C. Raggiunta questa temperatura, far arrivare il vapore acqueo che deve fluire di continuo nel pallone di distillazione. Operare a luce soffusa poiché il cloruro d'argento si decompone per azione della luce. Il volume del distillato deve essere di 1000 ml.

### 5.1. – Determinazione fotometrica.

5.2.1. – Misurazione del campione. Prelevare un'aliquota del distillato (50 ml al massimo) e collocarla in un pallone tarato da 100 ml. Se 50 ml di distillato contengono meno di 5  $\mu\text{g}$  di fluoro, concentrare una parte o tutto il distillato fino a 50 ml. Aggiungere nel pallone tarato 20 ml di acetone (3.2), 20 ml di reattivo misto (3.12) e portare a volume con acqua. Tenere i campioni per un'ora al buio o a luce soffusa fino a completo sviluppo del colore e quindi eseguire le misure a 620 nm in celle da 4 o 5 cm, contro la soluzione di riferimento. Calcolare il contenuto in fluoro dalla curva di riferimento.

5.2.2. – Costruzione della curva di riferimento. Pipettare 2 – 5 – 10 – 15 – 20 e 25 ml di soluzione standard diluita di fluoro (3.13.1) in altrettanti palloni tarati da 500 ml, portare a volume con acqua e mescolare. Per costruire

la curva di riferimento, pipettare 50 ml di ognuna delle suddette soluzioni (contenenti 2 - 5 - 10 - 15 - 20 e 25  $\mu\text{g}$  di F) in altrettanti palloni tarati da 100 ml; usare 50 ml di acqua bidistillata come soluzione di riferimento. Aggiungere 20 ml di acetone (3.2) e 20 ml di reattivo misto (3.12) ad ogni pallone tarato e procedere come descritto sopra.

### 5.3. - Determinazione potenziometrica.

5.3.1. - Misurazione del campione. Pipettare 10 ml di distillato in un becher da 50 ml, aggiungere 1 ml di soluzione tampone (3.14), immergervi un'ancoretta magnetica ed agitare dolcemente e di continuo usando un agitatore magnetico (4.8). Immergere gli elettrodi o l'elettrodo combinato nella soluzione e prendere nota del potenziale misurato in mV; prima di annotare il potenziale, attendere fino a che sia stato raggiunto l'equilibrio (variazione nella lettura di  $\pm 0,2$  mV). Saranno necessari alcuni minuti per basse concentrazioni di fluoro. Se in 10 ml di distillato sono presenti meno di 20  $\mu\text{g}$  di fluoro, concentrare una appropriata aliquota del distillato. Calcolare il contenuto in fluoro usando la curva di riferimento.

5.3.2. - Costruzione della curva di riferimento. Pipettare 2 - 4 - 10 - 20 e 40 ml di soluzione standard diluita di fluoro (3.13.1) (corrispondenti a 20 - 40 - 100 - 200 e 400  $\mu\text{g}$  di F) in altrettanti palloni tarati da 100 ml, portare a volume con acqua e mescolare. Pipettare 10 ml di ognuna di queste soluzioni (corrispondenti a 2 - 4 - 10 - 20 e 40  $\mu\text{g}$  di F) e misurare il potenziale, sotto continua agitazione, come descritto in 5.3.1. Riportare il logaritmo della concentrazione del fluoro contro il potenziale in mV e tracciare la curva di riferimento. La curva risulta lineare per concentrazioni comprese tra 0,2 e 4,0 mg/l di fluoro; per concentrazioni progressivamente 10 volte superiori l'una rispetto all'altra, la differenza di potenziale deve risultare maggiore di almeno 56 mV (v. Nota).

## 6. - Calcoli.

Calcolare come segue il contenuto in fluoro del campione, espresso in mg/kg:

$$\text{mg/kg} = \frac{a \cdot V}{E \cdot b}$$

dove:

- a =  $\mu\text{g}$  di fluoro, ottenuti dalla curva di riferimento;
- E = peso in g del campione iniziale;
- V = volume totale del distillato in ml;
- b = volume in ml dell'aliquota di distillato prelevata.

Nota. — Poiché la differenza di potenziale è dipendente dalla temperatura, il campione e le soluzioni di riferimento devono essere misurate alla stessa temperatura.

## DETERMINAZIONE DELL'ARSENICO

1. - Il presente metodo consente di determinare l'arsenico totale; il limite inferiore della determinazione è 0,2 mg/kg.

2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene incenerito in presenza di nitrato di magnesio e ossido di magnesio. Le ceneri vengono disciolte in acido cloridrico e l'arsenico distillato come idruro. L'arsenico viene quindi determinato spettrofotometricamente sotto forma di composto blu di molibdeno.

3. - *Reattivi.*

Nota: tutti i reattivi, tranne il (3.1), devono essere praticamente esenti da arsenico.

3.1. - Triossido di arsenico  $As_2O_3$ , p.a.

3.2. - Acido cloridrico (d = 1,18), p.a.

3.3. - Nitrato di magnesio ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ), p.a.

3.4. - Ossido di magnesio, p.a.

3.5. - Zinco metallico in granuli, contenente meno di 0,1 mg/kg di arsenico.

3.6. - Soluzione di assorbimento: a mezzo di un cilindro, trasferire 25 ml di soluzione di cloruro mercurico (1,5 g in 100 ml di acqua) in un pallone tarato da 250 ml. Aggiungere 7,5 ml di permanganato di potassio 0,003 M in acido solforico 3 N, portare a volume con acqua e mescolare. Preparare questa soluzione ogni giorno.

3.7. - Soluzione di molibdato ammonico: sciogliere 1 g di molibdato di ammonio  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  in 100 ml di acido solforico 5,4 N.

3.8. - Soluzione di solfato di idrazina: 0,15 g in 100 ml. Preparare la soluzione ogni settimana.

3.9. - Soluzione di acido cloridrico: diluire 1 volume di acido cloridrico (3.2) con un eguale volume di acqua.

3.10. - Soluzione di nitrato di magnesio: sciogliere 10 g di nitrato di magnesio (3.3) in 100 ml di acqua.

3.11. - Soluzione di ioduro di potassio: 15 g in 100 ml di acqua. Questa soluzione deve essere conservata al buio e in frigorifero. È stabile per 2 giorni.

3.12. - Soluzione di cloruro stannoso: sciogliere 40 g di cloruro stannoso ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in una miscela di 25 ml di acqua e 75 ml di acido cloridrico (3.2). Preparare questa soluzione ogni giorno.

3.13. - Soluzione standard di arsenico: pesare 0,132 g di triossido di arsenico (3.1) in un becher da 100 ml e scioglierli in 2 ml di soluzione di idrossido di sodio (50 g/litro). Trasferire quantitativamente in pallone tarato da un litro, portare a volume con acqua e mescolare.

1 ml = 100  $\mu\text{g}$  di arsenico.

3.14. - Soluzione standard diluita di arsenico: diluire 5 ml della soluzione standard di arsenico (3.13) fino a 100 ml con acqua.

1 ml = 5  $\mu\text{g}$  di arsenico.

Preparare questa soluzione immediatamente prima dell'uso.

#### 1. - *Apparecchiatura.*

Nota: non lavare le apparecchiature e la vetreria con detersivi poiché questi possono interferire sullo sviluppo del colore.

##### 4.1. - Muffola.

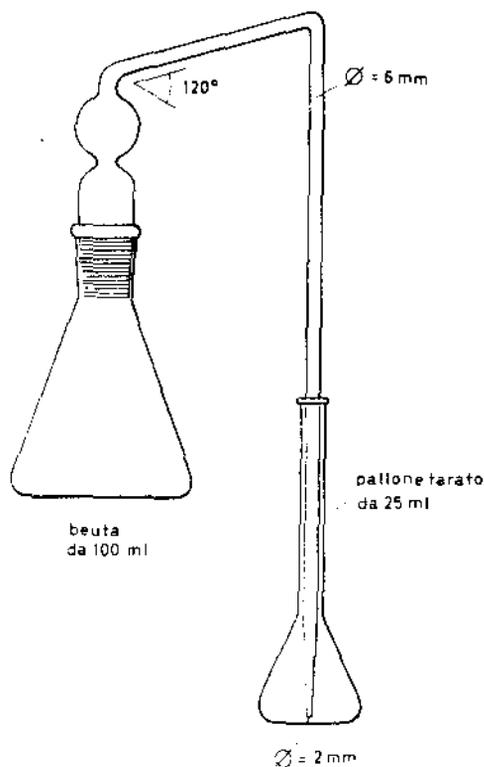


Fig. 2. - Apparecchio per lo svolgimento dell'arsenico.

4.2. - Spettrofotometro con celle da 20 mm.

4.3. - Apparecchiatura per lo svolgimento dell'arsenico (Fig. 2).

### 5. - Procedimento.

5.1. - Dissoluzione del campione. Pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, da 1 a 5 g di campione contenenti non più di 30  $\mu\text{g}$  di arsenico e metterli in una capsula di quarzo. Aggiungere 20 ml di soluzione di nitrato di magnesio (3.10), 3 g di ossido di magnesio (3.4), sufficiente acqua da ottenere un impasto consistente e mescolare accuratamente. Essiccare a 100 °C per un'ora in stufa, mettere poi in muffola e far elevare la temperatura a 550-600 °C. Mantenere in muffola per una notte o più, fino a che le ceneri non contengano più sostanze carboniose. Raffreddare, umettare con acqua, coprire la capsula e aggiungere con cautela 55 ml di soluzione di acido cloridrico (3.9). Mescolare la soluzione e, se necessario, riscaldare su bagno maria fino a che le ceneri siano andate completamente in soluzione. Filtrare attraverso carta Whatman n. 40 (o filtro equivalente) raccogliendo il filtrato in un pallone tarato da 100 ml. Lavare il filtro e l'imbuto con varie porzioni di acqua bollente fino a raccogliere un volume di filtrato di circa 80 ml.

5.2. - Preparare un bianco usando tutti i reattivi tranne il campione.

5.3. - Separazione dell'arsenico. Al filtrato raffreddato (5.1 e 5.2) aggiungere 2 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.11) e 0,5 ml di soluzione di cloruro stannoso (3.12). Se la soluzione rimane colorata, aggiungere ulteriori porzioni di 0,5 ml di cloruro stannoso. Mescolare, riscaldare su bagno maria per 30 minuti e quindi lasciar raffreddare. In un pallone tarato da 25 ml, mettere 20 ml di soluzione di assorbimento (3.6) e collegare il pallone all'apparecchiatura per lo svolgimento dell'arsenico descritta in (4.3). Aggiungere 5 g di zinco (3.5) al pallone tarato contenente la soluzione preparata e innestarlo immediatamente all'apparecchiatura. Lasciare che la reazione abbia luogo a temperatura ambiente per un'ora.

Nota: la soluzione di assorbimento deve rimanere di colore rosa.

5.4. - Determinazione. Alla soluzione contenuta nel pallone tarato da 25 ml, aggiungere 1,0 ml di soluzione di molibdato ammonico (3.7) e mescolare bene. Aggiungere 1,0 ml di soluzione di solfato di idrazina (3.8), mescolare bene e dibattere la soluzione fino a che tutto il  $\text{Mn}^{+7}$  sia ridotto a  $\text{Mn}^{+2}$ . Portare a volume con acqua, mescolare e riscaldare per 30 minuti su bagno maria. Raffreddare il pallone a temperatura ambiente. Se si osserva un precipitato bianco, lasciare la soluzione in riposo (da 5 a 10 minuti) così che esso si depositi; quindi riempire la cella dello spettrofotometro decantando la soluzione. Misurare l'assorbanza della soluzione in celle da 20 mm a 840 nm contro l'acqua.

5.5. - *Curva di riferimento.* In una serie di palloni tarati da 100 ml, trasferire volumi di soluzione standard diluita (3.14) contenenti rispettivamente 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 e 30,0  $\mu\text{g}$  di arsenico. A ciascuna soluzione aggiungere 55 ml di soluzione di acido cloridrico (3.9), diluire con acqua fino al volume di 80 ml circa e quindi procedere alla determinazione come descritto nei paragrafi 5.3 e 5.4. Costruire una curva riportando le assorbanze contro i quantitativi di arsenico.

*Nota:* È consigliabile controllare la curva di riferimento dopo ogni serie di determinazioni.

## 6. - *Calcoli.*

Determinare la quantità di arsenico presente nel campione dalla curva di riferimento, tenendo conto del bianco. Esprimere i risultati in mg/kg.

## DETERMINAZIONE DI FERRO, RAME, MANGANESE E ZINCO

1. - Il presente metodo consente di determinare ferro, rame, manganese e zinco; i rispettivi limiti inferiori sono i seguenti:

Fe . . . . .	20	mg/kg
Cu . . . . .	10	mg/kg
Mn . . . . .	20	mg/kg
Zn . . . . .	20	mg/kg

## 2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene sciolto in acido cloridrico dopo distruzione delle sostanze organiche. La determinazione degli elementi viene effettuata, dopo opportuna diluizione, mediante spettrofotometria di assorbimento atomico.

## 3. - *Reattivi.*

Tutti i reattivi devono essere di elevata purezza.

3.1. - Acido cloridrico (d = 1,19).

3.2. - Acido cloridrico 6 N.

3.3. - Acido cloridrico 0.5 N.

3.4. - Acido fluoridrico al 38-40 % (v/v), con un contenuto in ferro inferiore a 1 mg litro ed un residuo all'evaporazione (espresso in solfati) inferiore a 10 mg.

3.5. - Acido solforico ( $d = 1,84$ ).

3.6. - Acqua ossigenata a 100 volumi circa di ossigeno (30% in peso).

3.7. - Soluzione standard di ferro (1000  $\mu\text{g/ml}$ ): sciogliere 1 g di fil di ferro p.a. in 200 ml di acido cloridrico 6 N (3.2), aggiungere 16 ml di acqua ossigenata (3.6) e portare a volume di 1000 ml con acqua.

3.7.1. - Soluzione standard diluita (100  $\mu\text{g/ml}$ ): diluire un volume della soluzione standard (3.7) con 9 volumi di acqua.

3.8. - Soluzione standard di rame (1000  $\mu\text{g/ml}$ ): sciogliere 1 g di rame in polvere in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2), aggiungere 5 ml di acqua ossigenata (3.6) e portare a volume di 1000 ml con acqua.

3.8.1. - Soluzione standard diluita 10 ( $\mu\text{g/ml}$ ): diluire 1 volume della soluzione standard (3.8) con 9 volumi di acqua, poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi di acqua.

3.9. - Soluzione standard di manganese (1000  $\mu\text{g/ml}$ ): sciogliere 1 g di manganese in polvere in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2) e portare al volume di 1000 ml con acqua.

3.9.1. - Soluzione standard diluita (10  $\mu\text{g/ml}$ ): diluire 1 volume della soluzione standard (3.9) con 9 volumi di acqua e poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi di acqua.

3.10 - Soluzione standard di zinco (1000  $\mu\text{g/ml}$ ): sciogliere 1 g di zinco in lamina in 25 ml di acido cloridrico 6 N (3.2) e portare al volume di 1000 ml con acqua.

3.10.1 - Soluzione standard diluita (10  $\mu\text{g/ml}$ ): diluire 1 volume della soluzione standard (3.10) con 9 volumi di acqua e poi ridiluire 1 volume della soluzione ottenuta con 9 volumi di acqua.

3.11. - Soluzione di cloruro di lantanio: sciogliere 12 g di ossido di lantanio in 150 ml di acqua, aggiungere 100 ml di acido cloridrico 6 N (3.2) e portare al volume di 1000 ml con acqua.

#### 4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Muffola a temperatura regolabile e controllata.

4.2. - Vetreria al borosilicato: si raccomanda di impiegarla per le sole determinazioni di Fe, Cu, Mn e Zn.

4.3. - Capsula di platino o di quarzo.

4.4. - Spettrofotometro di assorbimento atomico con rispettive lampade.

5. - *Procedimento.*

5.1. - Porre 1 - 10 g di campione, pesato con l'approssimazione di 0,2 mg, in una capsula di platino o di quarzo (4.3), essiccare in stufa a 105 °C e quindi introdurla in muffola fredda (4.1). Elevare gradualmente la temperatura della muffola in modo da raggiungere 450-475 °C in 90 minuti circa. Mantenere questa temperatura almeno per 16 ore.

5.2. - Inumidire con acqua le ceneri raffreddate e trasferire in un becher da 250 ml. Lavare la capsula con un totale di circa 5 ml di acido cloridrico (3.1) e travasare lentamente ed accuratamente quest'ultimo nel becher. (Si può avere una reazione vivace per sviluppo di CO<sub>2</sub>). Aggiungere goccia a goccia acido cloridrico (3.1), agitando fino a che l'effervescenza non sia terminata. Evaporare a secchezza, agitando ogni tanto con una bacchetta di vetro.

5.3. - Aggiungere al residuo 15 ml di acido cloridrico 6 N (3.2), seguiti da circa 120 ml di acqua. Mescolare con la bacchetta di vetro che va lasciata nel becher e coprire con vetro da orologio. Portare la soluzione a leggera ebollizione e mantenervela fino a che non si noti ulteriore dissoluzione delle ceneri.

5.4. - Filtrare su carta priva di ceneri e raccogliere il filtrato in pallone tarato da 250 ml. Lavare il becher ed il filtro prima con 5 ml di acido cloridrico (3.2) caldo e poi, per due volte, con acqua bollente. Portare a volume con acqua. (Concentrazione dell'acido cloridrico: 0,5 N).

6. - *Curve di riferimento.*

6.1. - Per ciascun oligoelemento da determinare, preparare una serie di soluzioni di riferimento a partire dalle soluzioni standard diluite 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 e 3.10.1 in modo che le concentrazioni dell'acido cloridrico in ciascuna di esse sia all'incirca 0,5 N e, nel caso del ferro, del manganese e

**Ferro**

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
ml di soluzione standard diluita (3.7.1.) (1ml = 100 $\mu\text{g Fe}$ ) . .	0	0,5	1	2	3	4	5
ml di HCl 6 N (3.2) . . . . .	7	7	7	7	7	7	7

Aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua.

**Rame**

$\mu\text{g Cu/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard diluita (3.8.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Cu}$ ) . .	0	1	2	4	6	8	10
ml di HCl 6 N (3.2) . . . . .	8	8	8	8	8	8	8
Portare a 1000 ml con acqua.							

**Manganese**

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard diluita (3.9.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Mn}$ ) . .	0	1	2	4	6	8	10
ml di HCl 6 N (3.2) . . . . .	7	7	7	7	7	7	7
Aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua.							

**Zinco**

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml di soluzione standard diluita (3.10.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Zn}$ ) . .	0	0,5	1	2	4	6	8
ml di HCl 6 N (3.2) . . . . .	7	7	7	7	7	7	7
Aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua.							

dello zinco, la concentrazione del cloruro di lantanio corrisponda allo 0,1% di La (v/v). Le concentrazioni prescelte per gli oligoelementi in esame debbono trovarsi nell'intervallo di sensibilità dello spettrofotometro utilizzato. Le tabelle riportano, a titolo di esempio, alcuni tipi di soluzioni di riferimento; nondimeno, a seconda del tipo e della sensibilità dello spettrofotometro usato, potrà essere necessario scegliere altre concentrazioni.

7. - *Determinazione*

7.1. - Per la determinazione del rame, la soluzione preparata secondo i punti 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 può in linea generale essere utilizzata direttamente. Se è necessario portare la sua concentrazione nell'intervallo di quelle delle soluzioni di riferimento, un'aliquota di essa può essere prelevata e portata a volume, in pallone tarato da 100 ml, con acido cloridrico 0,5 N (3.3).

7.2. - Per la determinazione del ferro, del manganese e dello zinco, pipettare un'aliquota della soluzione preparata secondo 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e metterla in pallone tarato da 100 ml; aggiungere 10 ml di cloruro di lantanio (3.11) e portare a volume con acido cloridrico 0,5 N (3.3).

7.3. - Prova in bianco. Preparare un bianco usando tutti i reattivi descritti nel procedimento ma escludendo il campione.

7.4. - Misurare l'assorbimento delle soluzioni di riferimento e della soluzione in esame, impiegando una fiamma ossidante aria-acetilene, alle seguenti lunghezze d'onda:

Fe . . . . .	248,3	nm
Cu . . . . .	324,8	nm
Mn . . . . .	279,5	nm
Zn . . . . .	213,8	nm

Ripetere ogni misurazione quattro volte.

8. - *Calcoli.*

Dalla curva di riferimento, calcolare la concentrazione degli oligoelementi nella soluzione in esame ed esprimere il risultato in mg/kg di campione. Tenere conto del valore del bianco.

9. - *Osservazione.*

La elevata quantità di fosfati può interferire sulla determinazione di ferro, manganese e zinco. Si può ovviare a questo inconveniente aggiungendo opportune quantità di soluzione di cloruro di lantanio (3.11). Se tuttavia il campione ha un rapporto ponderale  $\frac{Ca + Mg}{P} > 2$ , l'aggiunta di soluzione di cloruro di lantanio (3.11) può essere tralasciata.

## DETERMINAZIONE DEL CADMIO

1. - Il presente metodo consente di determinare il cadmio; il limite inferiore della determinazione è 0,02 mg/kg.

## 2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene mineralizzato in « bomba » con acido nitrico. Dopo aver portato in soluzione con acqua, la determinazione viene effettuata mediante spettrofotometria di assorbimento atomico senza fiamma in forno di grafite.

## 3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido nitrico al 65% ( $d = 1,40$ ).

3.2. - Nitrato di cadmio  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ .

3.3. - Soluzione standard di cadmio (50 mg/litro). In pallone tarato da 1000 ml, sciogliere 137,2 mg di nitrato di cadmio (3.2) in acqua. Aggiungere 10 ml di acido nitrico concentrato (3.1) e portare a volume con acqua.

3.4. - Soluzione standard diluita di cadmio (2 mg/litro). Collocare 40,0 ml della soluzione standard di cadmio (3.3) in pallone tarato da 1000 ml, aggiungere 10 ml di acido nitrico concentrato (3.1) e portare a volume con acqua.

## 4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Bomba-autoclave di alluminio, con coperchio e valvola di sicurezza, nella quale è inserito un contenitore in Teflon con coperchio. Usare bombe con contenitori in Teflon della capacità di circa 100 ml di cm 4,5 di diametro.

4.2. - Stufa a temperatura regolabile e controllata.

4.3. - Spettrofotometro di assorbimento atomico con correttore dell'assorbimento non specifico.

4.4. - Lampada a scarica a radiofrequenza ( $\lambda = 228,8$  nm).

4.5. - Forno di grafite.

4.6. - Registratore potenziometrico.

4.7. - Micropipette automatiche.

4.8. - Argon U.P.P. in bombola.

4.9. - Piastra scaldante.

## 5. - *Procedimento.*

5.1. - Pesare 0,5-1,0 g di campione e metterli nel contenitore della bomba autoclave (4.1) per la digestione. Aggiungere 6 ml di acido nitrico (3.1).

chiudere ermeticamente il contenitore e la bomba (4.1) e mettere in stufa fredda. Portare in 1 h circa la temperatura a 140 °C. Mantenere a questa temperatura per 12 h.

5.2. – Togliere la bomba dalla stufa, lasciar raffreddare, aprire con cautela ed estrarre il contenitore contenente il campione in soluzione.

5.3. – Scaldare il contenitore su piastra portando con cautela quasi a secchezza in corrente di aria filtrata attraverso filtro a millipore da 0,45  $\mu$ . Aggiungere 6 ml di acido nitrico (3.1), chiudere il contenitore, inserirlo nella bomba, chiudere quest'ultima e metterla in stufa fredda. Portare la temperatura a 140 °C e mantenerla per 12 h.

5.4. – Una volta raffreddata, aprire la bomba, estrarre il contenitore e, su piastra scaldante, far evaporare la soluzione fino a circa 300  $\mu$ l.

5.5. – Usando una micropipetta, travasare la soluzione in pallone tarato da 5 ml lavando il contenitore più volte con acqua e travasando anche le acque di lavaggio con l'aiuto della stessa micropipetta. Portare a volume con acqua.

5.6. – Preparare un bianco usando gli stessi quantitativi di acido nitrico (3.1) senza il campione.

## 6. - *Curva di riferimento.*

6.1. – Preparare una serie di soluzioni di riferimento come segue: in pallone tarato da 100 ml, collocare 10 ml della soluzione standard diluita di cadmio (3.4) e portare a volume con acqua. Pipettare quindi 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 e 15,0 ml di questa soluzione in altrettanti palloni tarati da 100 ml, aggiungere 5 ml di acido nitrico (3.1) e portare a volume con acqua. Queste soluzioni contengono rispettivamente 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 3,0  $\mu$ g di Cd.

## 7. - *Determinazione.*

7.1. – Accendere lo spettrofotometro di assorbimento atomico (4.2) predisposto opportunamente con la lampada (4.3) e il forno di grafite (4.4). Le condizioni operative ottimali sono le seguenti:

Temperature (in gradi centigradi) . . .	10	40	2400
Tempi (in minuti secondi) . . . . .	20	30	10
Volume di soluzione da iniettare . . .	20 $\mu$ l		

7.2. – Iniettare il bianco e le soluzioni standard; registrarne i picchi.

7.3. - Iniettare la soluzione del campione e registrare il picco. Eseguire per ogni campione almeno tre iniezioni, registrandone i tre picchi.

7.4. - Leggere la quantità di cadmio presente nel campione facendo uso della curva di riferimento e tenendo conto del valore del bianco.

#### 8. - Calcoli.

Calcolare la quantità di cadmio del campione come segue:

$$\text{mg/kg} = \frac{C \cdot V}{p}$$

dove:

C =  $\mu\text{g}$  di cadmio ottenuti dalla curva di riferimento, tenuto conto del valore del bianco, presenti nel campione;

V = volume totale della soluzione in esame;

p = peso del campione in grammi;