82. M. E. ALESSANDRINI e V. AMORMINO. — Ricerca e determinazione del DDT nell'olio di oliva.

Riassunto. — Sono descritti due metodi che permettono di svelare e determinare il DDT nell'olio di oliva anche in quantità piccolissime.

Con uno, molto lungo e delicato ma assai preciso e sensibile, operando su g 20 di olio, si possono arrivare a determinare fino a concentrazioni di mg 0,2 per Kg (0,2 ppm).

Con l'altro, meno sensibile e preciso ma più rapido, sempre operando su g 20 di olio, si possono arrivare a determinare, con sufficiente approssimazione, fino a concentrazioni di mg 1 per Kg (1 ppm), non però concentrazioni minori anche prelevando quantitativi maggiori di olio.

Résumé. — On décrit deux méthodes qui permettent de révéler et de déterminer le DDT dans l'huile d'olive, même s'il est présent dans des quantités très petites.

Par l'une de ces méthodes, qui est très longue et délicate mais très précise et sensible, employant g 20 d'huile on peut arriver à déterminer même des concentrations de mg 0,2 par Kg (0,2 ppm).

Par l'autre méthode, moins sensible et précise mais plus rapide, agissant sur g 20 d'huile comme ci-dessus, on peut arriver à déterminer le DDT, avec une approximation suffisante, dans des concentrations non inférieures à 1 mg par Kg (1 ppm), même si la détermination est fait sur des quantités plus grandes d'huile.

Summary. — Two methods are described whereby it is possible to detect and determine DDT in olive oil, even if it is present in very small quantities.

By one of these methods, which is very long and circumstantial but very precise and sensitive, by employing g 20 of oil it is possible to determine concentrations as low as mg 0,2 per Kg (0,2 ppm).

By the other method, less sensitive and precise but more rapid, working with g 20 of oil as above stated, it is possible to determine DDT, with sufficient accuracy, in concentrations not less than mg 1 per Kg (1 ppm), even if the determination is made on larger quantities of oil.

Zusammenfassung. — Zwei Methoden werden beschrieben, wodurch es möglich ist, DDT in Olivenöl nachzuweisen und zu bestimmen, wenn es auch in sehr geringen Mengen vorhanden ist.

Durch die eine Methode, die sehr zeitraubend und umständlich, und

doch sehr genau und empfindlich ist, bei Verwendung von 20 g Olivenöl ist es möglich Konzentrationen bis hinunter 0,2 mg/Kg (0,2 ppm) zu bestimmen.

Durch die zweite Methode, die weniger empfindlich und genau, dafür aber schneller ist, unter Verwendung von 20 g Öl wie oben gesagt, ist es möglich DDT mit genügender Genauigkeit in Konzentrationen nicht unter 1 mg per Kg (1 ppm) zu bestimmen, wenn auch die Bestimmung mit grösseren Ölmengen vorgenommen wird.

La lotta contro la mosca olearia a mezzo del DDT non ha dato finora risultati molto soddisfacenti, come hanno anche messo in evidenza A. Melis [1, 2], G. Faldi [3], J. Hadjinicolau [4].

Tuttavia, poichè non è da escludere che il DDT venga ulteriormente sperimentato ed impiegato, e che, di conseguenza, esso possa essere contenuto nell'olio proveniente dalle olive trattate, crediamo utile descrivere un metodo che consenta la sua ricerca e la sua determinazione nell'olio di oliva anche in quantità piccolissime.

E' molto difficile separare il DDT dalle forti quantità di sostanze grasse in cui si trova disciolto, anche perchè in tali sostanze il DDT è abbastanza solubile (il 10% ca.), mentre in altri solventi non miscibili con l'olio, quale ad es. l'alcool etilico, che potrebbero venire utilizzati per tale separazione, lo è assai meno (ad es. il 2% ca. nell'alcool etilico di 95°).

E, più piccole sono le quantità di DDT presenti, maggiori le difficoltà della separazione, anche perchè più grande è il quantitativo di olio da prelevare per l'analisi, e, di conseguenza, aumentano le quantità, sia pur piccole, di quei componenti dell'olio che non si riescono ad eliminare completamente.

Il procedimento che qui si propone, e che verrà descritto dettagliatamente nella parte sperimentale, si può dividere in tre parti:

1) *Separazione del DDT dalle sostanze grasse.* Tale separazione avviene nello stesso modo sia per la ricerca che per la determinazione, e consiste:

a) Nel disciogliere l'olio in una adeguata quantità di cloroformio.

---

(1) Redia *35*, 1 (1950).
(2) Redia *36*, 3 (1951).
(3) Redia *35*, 1 (1950).
(4) Arch. of the Malaria Division, Athene School of Hygiene *531*, 1 (1950).

b) Nell'eseguire diverse estrazioni della soluzione cloroformica sia con acido solforico concentrato, contenente il 10% ca. di solfato sodico anidro, sia con acido solforico fumante contenente il 15% ca. di anidride solforica: l'acido solforico discioglie, nelle condizioni stabilite dal metodo, le sostanze grasse, mentre il DDT rimane disciolto nel cloroformio.

c) Nel lavare il cloroformio, prima con una soluzione d'idrato sodico al 2%, poi con una soluzione acquosa satura di cloruro sodico, filtrarlo, asciugarlo e distillarlo, dopo di che il residuo va nitrato opportunamente secondo quanto indicato per la ricerca e per la determinazione.

Il procedimento per la separazione del DDT dalle sostanze grasse, che è basato sullo stesso principio del metodo seguito da M. S. Schechter, M. A. Pogorelskin e H. L. Haller ([5]), per la determinazione del DDT nel latte e nei grassi solidi, è stato da noi già vantaggiosamente applicato sia alla ricerca del DDT nelle farine ([6]), sia alla determinazione del pp' isomero nelle soluzioni concentrate emulsionabili di DDT ([7]). Caso per caso, il metodo va però opportunamente adattato, sopratutto per quanto riguarda il numero delle estrazioni e la concentrazione in anidride solforica dell'acido solforico fumante.

L'inconveniente di tale metodo di separazione consiste nella facilità con cui si formano delle emulsioni, talvolta anche stabili, ma avendo cura di operare su piccole quantità (dai 2 ai 20 g a seconda delle quantità di DDT presenti), tale inconveniente viene notevolmente ridotto, e, dopo avere acquistato un po' di pratica nella manualità, pressochè eliminato.

2) *Ricerca qualitativa del DDT*. Il metodo è sostanzialmente quello da noi già pubblicato per la ricerca del DDT nelle farine (6, loc. cit.) con gli opportuni adattamenti che verranno dettagliatamente descritti nella parte sperimentale.

3) *Determinazione del DDT*. Può essere eseguita in due modi:

a) Se si desiderano risultati di alta precisione e di elevata sensibilità, sul residuo, separato dalle sostanze grasse come sopra indicato,

---

([5]) Anal. Chem. *19*, 51 (1947).
([6]) Rend. Istituto Sup. Sanità *14*, 619 (1951), e Annali di Chimica *41*, 569 (1951).
([7]) Abstracts of the XIIth International Congress of Pure and Applied Chemistry, New York, September 1951, 501.

si opera esattamente secondo il metodo di M. S. Schechter, S. B. Solovay, R. H. Hayes e L. H. Haller ([8]), eseguendo la misurazione finale a mezzo di un adatto spettrofotometro.

Operando su g 20 di olio, con tale metodo si possono arrivare a determinare fino a concentrazioni di mg 0,2 per Kg (pari a 0,2 ppm).

b) Se invece si preferisce una maggiore rapidità nell'esecuzione del metodo, non è richiesta una grande precisione, o non si dispone di un adatto spettrofotometro o fotocolorimetro, si può ricorrere vantaggiosamente al metodo descritto da uno di noi per la determinazione di piccole quantità di DDT sulle superfici spruzzate ([9, 10]). In tal caso, dopo la separazione del DDT dalle sostanze grasse, si opera esattamente come per la ricerca qualitativa, istituendo alla fine opportuni confronti fra i colori sviluppati e quelli della scala cromatica preparata col DDT tecnico e che fu pubblicata nella Nota sopraindicata ([9] loc. cit.).

Con questo metodo, operando sempre su g 20 di olio, si possono arrivare a determinare, con sufficiente approssimazione, anche concentrazioni di mg 1 per Kg (pari a 1 ppm), non però concentrazioni più piccole, anche prelevando maggiori quantitativi di olio.

Il procedimento in genere è lungo e delicato, ma è l'unico che consenta di svelare e di determinare il DDT nell'olio di oliva, in quantità così piccole come quelle indicate.

PARTE SPERIMENTALE

Per l'esecuzione del procedimento occorrono i seguenti reattivi:

Miscela acido solforico - solfato di sodio: g 10 di solfato di sodio anidro (essiccato in stufa), si sciolgono in cm^3 100 di acido solforico concentrato (D = 1.84) scaldando leggermente: si lascia poi raffreddare a temperatura ambiente. L'aggiunta del solfato sodico ha lo scopo di evitare la formazione di emulsioni stabili.

Acido solforico fumante: (contenente il 15% ca. di anidride solforica).

([8]) Ind. Eng. Chem., An. Ed. *17*, 704 (1954).
([9]) Rend. Istituto Sup. Sanità *11*, 821 (1948), e Annali di Chimica Applicata *38*, 414 (1948).
([10]) Bull. World. Hlth. Org. *2*, 629 (1950).

Soluzione acquosa di idrato sodico al 2% ca.

Soluzione acquosa satura di cloruro sodico.

Potassa alcolica ca. N/1 (g 56 ca. di potassio idrato in un litro di alcool etilico a 95°).

Soluzione di metilato sodico al 10%. La preparazione di questo reattivo, che è dettagliatamente descritta nel lavoro di SCHECHTER e HALLER ([8] loc. cit.), è lunga e delicata. Per comodità di chi non avesse a disposizione tale lavoro, riteniamo utile riportarla.

E' necessario anzitutto usare alcool etilico completamente anidro, ciò che si può ottenere facendolo bollire a ricadere con trucioli di magnesio (g 5-10 per ogni litro di alcool) e con una piccola quantità di iodio metallico, fino a quando il magnesio non si sia completamente disciolto, poi si distilla in ambiente anidro.

La soluzione di metilato sodico si può ottenere: o sciogliendo nell'alcool metilico anidro, preparato come sopra indicato, la quantità richiesta di metilato sodico già pronto (g 10 per cm^3 100 di alcool), prodotto che però in Italia non è facile trovare in commercio, oppure sciogliendo nell'alcool la quantità necessaria di sodio metallico. E' meglio aggiungerne una quantità leggermente superiore in modo da ottenere una soluzione più concentrata che, dopo titolazione, si diluisce opportunamente. All'alcool, contenuto in un palloncino munito di refrigerante a ricadere fornito di un tubicino contenente idrato sodico, e raffreddato con ghiaccio, l'aggiunta del sodio (g 4,5-5 per ogni 100 cm^3) va fatta cautamente, poco alla volta e agitando perchè la reazione è molto violenta. Una parte aliquota della soluzione limpida (10-20 cm^3) va poi diluita con acqua e titolata con acido cloridrico normale in presenza di fenolftaleina, quindi il resto della soluzione portata alla concentrazione esatta con alcool metilico anidro. Tale soluzione, oltre che completamente anidra, come è stato già detto, deve essere anche limpida ed incolore. Perciò, prima ancora di titolarla e diluirla, se è, come di solito, leggermente torbida, deve essere mantenuta uno o due giorni in frigorifero, poi centrifugata e decantata: va conservata inoltre ben protetta dall'aria (in bottiglia con tappo paraffinato) ed in frigorifero.

Oltre i suddetti reattivi, occorrono: acido nitrico fumante D = 1,49-1,50, acido nitrico fumante D $\geq$ 1,52 ed i seguenti solventi: cloroformio, benzolo, etere etilico, tutti ridistillati.

Si opera poi nel modo seguente:

Separazione del DDT dalle sostanze grasse.

Se si suppone la presenza di piccole quantità di DDT si opera su g 20 di olio, altrimenti si possono prelevare quantitativi anche minori (g 2-10), usando quantità proporzionalmente minori di reattivi e solventi.

g 20 di olio si sciolgono in cm^3 50 di cloroformio in un separatore cilindrico della capacità di cm^3 100 ca. (se si prelevano g 10 basta scioglierli in cm^3 25 ca., se g 5 in cm^3 15 ca. ecc.). In un altro separatore cilindrico uguale si versano altri cm^3 50 di cloroformio.

Si eseguono poi due estrazioni della soluzione cloroformica dell'olio con cm^3 25-30 ogni volta della miscela acido solforico concentrato — solfato sodico, quattro volte con cm^3 5-10 ogni volta di acido solforico fumante ed infine un'ultima estrazione nuovamente con cm^3 5-10 della miscela acido solforico concentrato — solfato di sodio. E' strettamente indispensabile, per evitare la formazione di emulsioni stabili, che le prime due estrazioni con la miscela acido solforico — solfato sodico, vengano effettuate agitando i liquidi molto lentamente, con estrema delicatezza, mentre nelle successive estrazioni l'agitazione deve essere fatta molto energicamente e proseguita a lungo. Dopo ogni estrazione, si devono lasciare separare molto bene i due strati liquidi: a tal fine dopo la prima occorre aspettare almeno un'ora, mentre dopo le altre, generalmente, dai 15 ai 20 minuti sono sufficienti.

Quando i due strati liquidi si sono separati bene, dopo ogni estrazione, si versa lo strato inferiore nel secondo separatore contenente cloroformio. Questo secondo trattamento con cloroformio ha lo scopo di trattenere le piccole quantità di soluzione cloroformica eventualmente emulsionate con l'acido solforico nelle estrazioni eseguite nel primo imbuto a rubinetto. Ogni volta, dopo ciascuna estrazione e la susseguente separazione dei due liquidi nel secondo imbuto a rubinetto, si getta via lo strato acido sottostante.

Finite le estrazioni con acido solforico, si riuniscono le due porzioni di cloroformio contenute nei due separatori e si filtra lentamente alla pompa attraverso un crogiulo di vetro a fondo poroso, contenente anche nel fondo uno strato di cotone compresso lavato precedentemente con cloroformio. Si versa il cloroformio filtrato in un separatore cilindrico della capacità di ca. cm^3 100, si lava la bevuta con cloroformio che poi si versa anche nel separatore. Si tratta quindi due o tre volte (fino a scomparsa della reazione acida) con ca. cm^3 15 ogni volta della soluzione di idrato sodico al 2% e si agita molto a lungo. Si lasciano separare i due strati, si getta via la parte acquosa e si lava il cloroformio due o tre volte con

una soluzione satura di cloruro sodico (fino a scomparsa della reazione alcalina) quindi si filtra attraverso un imbuto preferibilmente cilindrico contenente al fondo dell'ovatta ben compressa e sgrassata (allo scopo viene preventivamente estratta in Soxhlet con acetone). Il soluto cloroformico, raccolto in una bevuta, viene distillato in massima parte e le ultime porzioni raccolte in una bevutina da cm^3 50, dove si finisce di evaporare su b. m.

Ricerca del DDT. Sul residuo, ottenuto come sopra indicato, e che deve essere completamente esente di ogni traccia di cloroformio, si esegue la nitrazione esattamente come indicato per la ricerca del DDT nelle farine ([6] loc. cit.) e si procede ancora come indicato in detto lavoro fino al punto in cui il tetranitroderivato del DDT va estratto con benzolo dalla miscela acquosa-acida. A questo punto, allo scopo di aumentare la sensibilità, si aggiungono soltanto cm^3 1,5 di benzolo anzichè 3. Si agita bene e si raccoglie la soluzione benzenica direttamente in un tubicino lungo ca. cm 10 e col diametro interno di mm 7. Poi sulla soluzione benzenica, viene delicatamente stratificato 1 cm^3 di potassa alcoolica circa normale e si aspetta 1-2 minuti.

In presenza di DDT in quantità non inferiori a 20 γ, nella zona di contatto fra i due liquidi si forma un anello bleu o verdognolo nettamente visibile. L'anello può essere bleu o verde a seconda che siano rimaste presenti tracce più o meno sensibili di sostanze grasse: tali sostanze danno con potassa alcoolica colorazione giallo-bruna ed i due colori (giallo e azzurro dovuto al DDT) si compongono per dare una colorazione verde. Se la quantità di DDT è sufficiente, agitando i due liquidi tutta la soluzione assume colorazione azzurra, più o meno intensa a seconda delle maggiori o minori quantità di DDT presente. Per quantità di DDT inferiori a 20 γ, l'anello che si forma nella zona di contatto, non è bleu ma più o meno verdognola, mentre in assenza di DDT è giallo brunastro. Come è noto, la colorazione bleu è dovuta ad un composto che il tetranitroderivato del DDT forma con la potassa alcoolica.

Determinazione del DDT. Come è stato già detto, questa può venire eseguita in due modi:

a) Con il metodo di Schechter e coll. ([8] loc. cit.), che offre una grande sensibilità e precisione, ma che è molto lungo.

Per comodità di chi non avesse a disposizione la memoria originale, riteniamo utile descrivere tale metodo. Si opera esattamente nel modo seguente:

Al residuo ottenuto dopo la separazione delle sostanze grasse e contenuto in una bevutina da cm^3 50, vengono aggiunti cm^3 5 di una mi-

scela solfonitrica preparata mescolando parti uguali di acido solforico concentrato (D = 1,84) e acido nitrico fumante (D = 1,49-1,50) e si mantiene per un'ora su di un b.m. bollente, agitando di tanto in tanto (non è necessario immergere la bevutina nel b.m.). Dopo raffreddamento, si versano nella stessa bevutina cm^3 25 di acqua ghiacciata, si agita e si versa la miscela in un separatore a pera da cm^3 150. Si lava la bevutina con altri cm^3 25 di acqua ghiacciata, che si versano anche nel separatore. Si estrae poi con cm^3 50 di etere etilico ghiacciato agitando ripetutamente, si getta via lo strato acquoso sottostante e si lava l'etere due o tre volte (fino a scomparsa della reazione acida nelle acque di lavaggio) con ca. cm^3 10 ogni volta di una soluzione acquosa di idrato sodico al 2%, poi ancora due o tre volte (fino a scomparsa della reazione alcalina) con ca. cm^3 10 ogni volta di una soluzione acquosa satura di cloruro sodico. Infine si filtra l'etere attraverso dell'ovatta sgrassata e ben compressa contenuta in un imbuto preferibilmente cilindrico: ciò ha lo scopo di far trattenere dall'ovatta le piccole quantità di acqua contenute nell'etere, che viene raccolto in una bevutina con tappo a smeriglio da cm^3 150. Si lava bene l'imbuto e l'ovatta con altro etere e si distilla o si evapora l'etere su b.m. non bollente avendo cura di aggiungervi prima qualche pallina di vetro. Dopo evaporazione dell'etere, si mantiene il residuo per un'ora in stufa a 60°. Dopo raffreddamento, il residuo viene disciolto in benzolo e quindi addizionato con una quantità doppia rispetto al benzolo, di una soluzione di metilato sodico preparata come sopra indicato: si sviluppa un colore azzurro (bisogna avere cura di non aspirare con la bocca il benzolo ed il metilato sodico nelle pipette per evitare l'introduzione di tracce di umidità che disturberebbero poi la reazione colorimetrica che deve avvenire in ambiente completamente anidro). Si lascia per 15 minuti per fare sviluppare completamente il colore ed infine si fa la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 597 μ. La quantità di benzolo, e, di conseguenza, di metilato sodico da aggiungere dipendono dalla quantità di DDT presente. Aggiungendo solo 1 cm^3 di benzolo e 2 cm^3 di metilato sodico, usando vaschette da 3 cm^3, 1 cm di spessore e lo spettrofotometro di Beckmann, partendo da g 20 di olio, si possono arrivare a determinare fino a concentrazioni di mg 0,2 per Kg (0,2 ppm). Se poi dal saggio qualitativo preliminare risultassero presenti quantità sensibilmente maggiori di DDT, nel qual caso la colorazione ottenuta con le quantità di benzolo e di metilato sodico sopra riportate risulterebbe troppo intensa, o si preleva inizialmente una minore quantità di olio per la determinazione o si discioglie il residuo in una maggiore quantità di benzolo e si preleva poi una parte aliquota. Qualsiasi spettrofotometro, oltre quello

di Beckmann, può essere ugualmente bene utilizzato. Anche il fotocolorimetro di Klett-Summerson, usando il filtro n. 60, risponde benissimo, quantunque con tale apparecchio non si raggiunga la sensibilità raggiunta col Beckmann, ed occorra un maggior volume di liquido (10 cm^3). Naturalmente, per ogni apparecchio usato occorre prepararsi prima la relativa curva di taratura con un campione di olio di oliva contenente quantità note di DDT. Il DDT usato per preparare le curve deve contenere all'incirca 70-74% di p-p'-isomero e il 25% ca. di o-p'-isomero.

Questo metodo, benchè lungo e delicato, è l'unico che consenta di determinare anche quantità così piccole di DDT come quelle indicate.

b) Se poi non è richiesta una grande sensibilità e precisione nei risultati e si preferisce invece una maggiore rapidità nell'esecuzione del metodo, si procede quantitativamente, come per la ricerca del DDT ed i colori ottenuti si confrontano alla fine con la scala cromatica preparata da uno di noi come indicato nella Nota sopra citata (⁹ loc. cit.).

Anche in questo caso la quantità di olio da prelevare dipende dalla quantità di DDT che si suppone presente: dai 2 ai 20 g. Non è consigliabile operare su quantitativi maggiori.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica.