

# PARTE 7. Analisi in HPLC

## PARTE 7. Analisi in HPLC

*Obiettivo del presente lavoro è la ricerca di metodi HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) per identificare sostanze inquinanti e non, presenti nelle acque, in relazione all'indagine svolta sull'impiego di prodotti chimici in ambito domestico.*

## 7. ANALISI IN HPLC E MONITORAGGI AMBIENTALI

L'obiettivo del lavoro è **ricercare metodi HPLC** (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) per **identificare sostanze inquinanti e non, presenti nelle acque**, in relazione all'indagine svolta sull'impiego di prodotti chimici in ambito domestico.



Figura 1 – Strumentazione per l'analisi HPLC.

### INTRODUZIONE ALLE TECNICHE HPLC

La **chromatografia** è una tecnica che permette la **separazione dei costituenti di una miscela**, si basa sui principi chimico-fisici dell'adsorbimento, della ripartizione, dello scambio ionico e dell'esclusione dimensionale. Esistono tecniche classiche e strumentali che consentono la separazione, identificazione e quantificazione di numerosissime sostanze, tra cui numerosi inquinanti, basati sull'interazione dei componenti da separare con una fase fissa e una fase mobile gassosa o liquida.

L'**HPLC** (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) è una **tecnica strumentale utilizzata in chimica analitica** che sfrutta una fase mobile liquida e fasi stazionarie solide o liquide, opera a elevate pressioni e consente di **determinare anche tracce di composti contenuti nei campioni da analizzare**.

La tecnica HPLC è molto versatile: a seconda delle classi di composti da analizzare, utilizzando colonne per la separazione dedicate, rivelatori ed eluenti specifici, si possono effettuare analisi su composti apolari, polari, ionici, chirali.

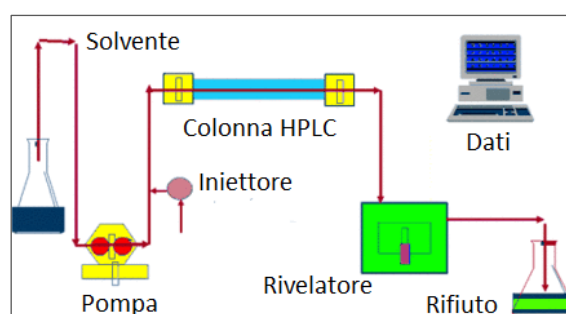


Figura 2 – Schema di funzionamento della strumentazione del sistema HPLC. Tratta da: <http://chimorgsun.blogspot.it/2012/02/hplc-cromatografia-liquida-ad-alta.html>

In **ambito ambientale**, a seconda dell'equipaggiamento strumentale disponibile, è quindi possibile effettuare per esempio il monitoraggio di inquinanti organici derivanti dall'uso di pesticidi, insetticidi, fitofarmaci o del contenuto di ioni derivanti dagli scarichi civili e industriali, come nitriti, nitrati, fosfati, solfati e cloruri, IPA (idrocarburi policiclici aromatici), aldeidi, isocianati, ammine aromatiche. I campioni da analizzare in HPLC seguono l'iter sotto riportato, per ottenere un risultato analitico significativo.

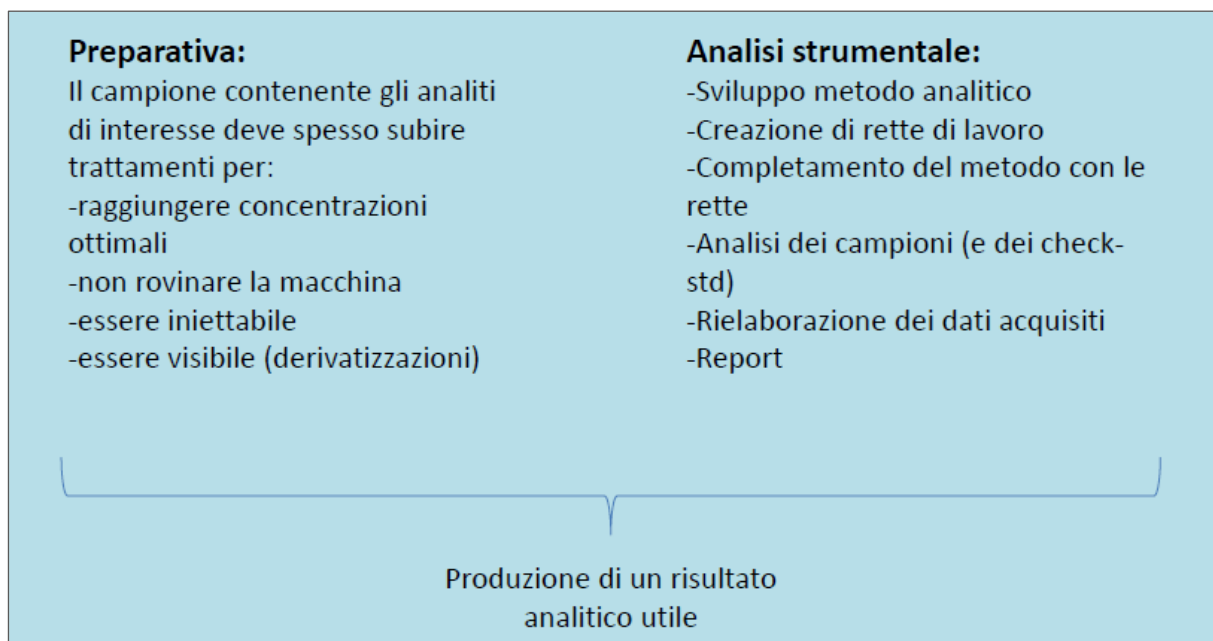


Figura 3 – Iter da seguire per analizzare attraverso il metodo HPLC dei campioni per ottenere un risultato analitico significativo.

## DAI DATI OTTENUTI DALL'INDAGINE ALLE APPLICAZIONI HPLC

Nel corso di questo progetto per identificare le sostanze più utilizzate, sono state distribuite delle **schede a 107 famiglie** in cui veniva richiesto di compilare una lista di 5 prodotti di uso domestico e le rispettive quantità. Sono stati **assegnati dei valori percentuali alle sostanze** (e di conseguenza al loro principio attivo) in base alle famiglie che lo utilizzano rispetto al totale. Tra i **principi attivi più utilizzati**: ipoclorito di sodio, ossigeno attivo, benzilsalicilato, alchildimetilbenzilammonio. Sulla base di tali informazioni è stato seguito l'iter operativo specificato in Figura 4 per individuare le applicazioni HPLC correlabili alla problematica.

Con la strumentazione disponibile in laboratorio all'**Istituto Fermi di Mantova** sono state eseguite delle esercitazioni pratiche sui metodi HPLC per il monitoraggio delle acque per verificare il livello di cloruri, nitriti, nitrati, solfati e fosfati. Sono state effettuate le calibrazioni attraverso la preparazione di soluzioni standard a concen-

trazione nota, costruita la retta di taratura e fatta l'analisi di alcune soluzioni incognite.

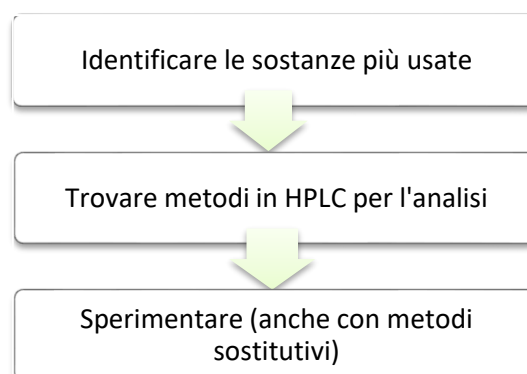


Figura 4 – Iter operativo per individuare le applicazioni HPLC correlabili alla problematica.

Di seguito alcuni dettagli inerenti l'analisi e l'immagine relativa a uno dei cromatogrammi registrati.

### ▪ Obiettivo

Preparare rette di taratura per fluoruri (F-) bromati (BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>) cloruri (Cl<sup>-</sup>) nitriti(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) clorati (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) bromuri (Br<sup>-</sup>) nitrati (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e solfati (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e successiva analisi qualitativa e quantitativa delle acque.

## ▪ Spiegazione

Si vogliono preparare 5 standard da 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm e 50ppm in matraccini da 100ml così che in ogni matraccino preparato per diluizione dalla soluzione madre a 500ppm siano presenti tutti gli ioni (fluoruri, bromati, cloruri, nitriti, clorati, bromuri, nitrati e solfati). Le soluzioni madre a 500ppm vengono preparate per pesata diretta in matracci da 500ml dopo che i sali sono stati opportunamente essiccati in stufa e pesati con precisione. Le soluzioni standard dei matraccini verranno invece analizzate in HPLC insieme ad un bianco (per diminuire l'errore provocato da possibili ioni presenti nell'acqua demineralizzata usata per le diluizioni). Successivamente

verranno analizzati campioni di acque e confrontando i tempi di ritenzione (per l'analisi qualitativa) e le aree dei picchi alle varie concentrazioni (per l'analisi quantitativa) si potranno determinare gli ioni presenti e la loro concentrazione.

Prova 1- std 20 ppm		
Picco	Tempo R.	Area
fluoruri	3,437	6,0713
bromati	4,493	0,9148
cloruri	5,047	4,2131
nitriti	6,143	2,4404
clorati	6,687	1,6621
bromuri	7,443	1,7464
nitrati	8,433	2,2321
solfati	11,433	3,0653

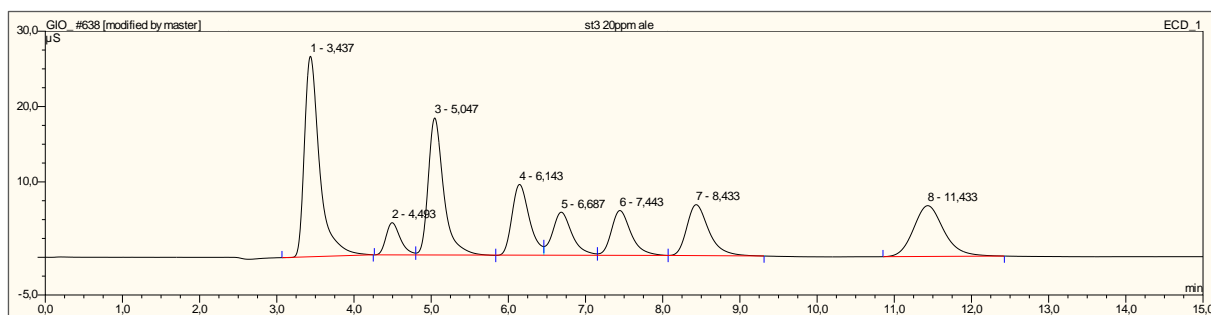


Figura 5 – Grafico dell'analisi.

## ▪ Monitoraggio dell'ipoclorito di sodio

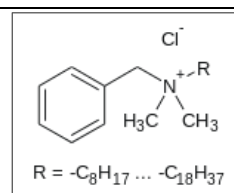
Per la determinazione dell'ipoclorito di sodio (NaClO) bisogna tenere conto che i residui possono essere presenti nelle acque oltre che come ipoclorito anche sotto forma di acido ipocloroso, cloro, cloroammine

inorganiche e organiche<sup>1</sup>. Tra i metodi applicabili in laboratorio tramite HPLC ionico è stato effettuato il monitoraggio dei cloruri, sopra descritto.

## ▪ Determinazione dell'alchilidimetilbenzilammonio

L'alchilidimetilbenzilammonio cloruro è detto anche cloruro di benzalconio o benzalconio cloruro (in inglese benzalconium-chloride - BKC) ed è utilizzato come disinfettante nei detersivi e nei prodotti co-

smetici<sup>2</sup>. È costituito da una miscela di sali quaternari.



## ▪ Determinazione ossigeno

Per la determinazione dell'ossigeno nelle acque è utilizzato prevalentemente un si-

stema basato sulla titolazione iodometrica secondo Winkler<sup>3</sup>.

#### Note

- <sup>1</sup> Il riferimento per i metodi per la determinazione dei residui dell'Istituto Superiore di Sanità sono reperibili al link: <https://old.iss.it/site/MetodiAnaliticiAcque/Pdf/ISS.BHD.033.REV00.pdf>
- <sup>2</sup> Per un esempio di determinazione con metodo HPLC e UV del benzalconio cloruro su campioni di cosmetici è possibile consultare "Rapid Determination of Benzalkonium Chloride in a Cosmetic": <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AU-190-LC-Benzalkonium-Chloride-AU70189-EN.pdf>
- <sup>3</sup> Metodi analitici per le acque: [www.chierici.biz/biblio/Analisi%20H2O.pdf](http://www.chierici.biz/biblio/Analisi%20H2O.pdf)

## BIBLIOGRAFIA

Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti:

[www.iss.it/binary/publ/cont/9634.pdf](http://www.iss.it/binary/publ/cont/9634.pdf)

Tecniche e metodi per le analisi chimiche delle acque minerali naturali in seguito all'entrata in vigore del decreto 31 maggio 2001:

[www.arpat.toscana.it/documentazione/report/ac\\_usoumano.../pubblicazione](http://www.arpat.toscana.it/documentazione/report/ac_usoumano.../pubblicazione)

5000 - Costituenti organici:

[www.primolevi.gov.it/public/transfert/Sturaro/Sezione\\_5000.pdf](http://www.primolevi.gov.it/public/transfert/Sturaro/Sezione_5000.pdf)

Metodi analitici per la determinazione di microinquinanti organici nei rifiuti:

[www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00001100/1140-monica-potalivo.zip/at.../file](http://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00001100/1140-monica-potalivo.zip/at.../file)

Metodi analitici per le acque: [www.chierici.biz/biblio/Analisi%20H2O.pdf](http://www.chierici.biz/biblio/Analisi%20H2O.pdf)

Gli allergeni nella propoli. Caratterizzazione chimica e processi di rimozione:

<https://etd.adm.unipi.it/theses/available/etd-01242010-125815/unrestricted/Testo.pdf>

Prodotto disinfettante quale componente antimicrobico negli additivi per i derivati della carne: <http://www.ordiniveterinari piemonte.it/rivista/05n11/pdf/psp01.pdf>

Rapid Determination of Benzalkonium Chloride in a Cosmetic:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AU-190-LC-Benzalkonium-Chloride-AU70189-EN.pdf>

[http://www.liceoagnoletti.it/attivita/attivita\\_professori/fisicafacile/acqua/ossigeno%20disciolto.htm](http://www.liceoagnoletti.it/attivita/attivita_professori/fisicafacile/acqua/ossigeno%20disciolto.htm)

Amandola, Terreni (1995). *Analisi chimica strumentale e tecnica*. Ed. Masson-scuola.

<http://www.pce-italia.it/html/dati-tecnici-1/misuratore-di-ossigeno-hi-964400.htm>

<http://www.ascopompe.com/cms/view/prodotti/strumentazione/analisi/ossigeno-disciolto/s324>