

## STUDI CINETICI

Per studiare la cinetica e il meccanismo di una reazione bimolecolare è necessario seguire la concentrazione di uno o più tra reagenti e prodotti in funzione del tempo.

L'importanza di ottenere delle misure non soggette ad errori ha portato il gruppo di Riverside a sviluppare un metodo di misura relativa delle costanti cinetiche. Secondo questo metodo si introducono nella camera di reazione due composti organici che reagiscono entrambi con il radicale OH· (o il radicale NO<sub>3</sub>·) [38]. Uno è il composto di cui si vuole determinare la costante di velocità (TEST), l'altro è un composto di riferimento (REF) scelto opportunamente e tale che la sua costante di velocità, nota, sia dello stesso ordine di grandezza della costante di velocità del test (in questo modo il tempo di decadimento del test è simile a quello del composto di riferimento)

Le reazioni competitive sono:



Il radicale OH· (NO<sub>3</sub>·) deve essere introdotto in eccesso affinché le due reazioni del secondo ordine diventino reazioni dello pseudoprimo ordine per calcolare più agevolmente k<sub>1</sub>. Se [TEST]<sub>0</sub> e [REF]<sub>0</sub> sono le concentrazioni iniziali dei due reagenti e [TEST]<sub>i</sub> e [REF]<sub>i</sub> le concentrazioni dopo un certo tempo di reazione i, si può facilmente ricavare la seguente reazione:

$$\ln [\text{TEST}]_0 / [\text{TEST}]_i = k_1 / k_2 \ln [\text{REF}]_0 / [\text{REF}]_i \quad (3.10)$$

dove:

$$Y = \ln [\text{TEST}]_0 / [\text{TEST}]_i$$

$$X = \ln [\text{REF}]_0 / [\text{REF}]_i$$

$$Y = mX$$

ottenendo così una retta con coefficiente angolare  $m = k_1 / k_2$

E' quindi sufficiente misurare le concentrazioni relative [TEST]<sub>0</sub> / [TEST]<sub>i</sub>

e [REF]<sub>0</sub> / [REF]<sub>i</sub> a tempi diversi per ricavare immediatamente il rapporto tra le due costanti cinetiche e, sostituendo k<sub>2</sub> nota, si ottiene la costante incognita.

La tecnica delle cinetiche relative, oltre ad avere il grande vantaggio di non essere affetta da errori di calibrazione nella misura delle concentrazioni assolute, non richiede neppure la conoscenza esatta del tempo nel quale viene seguito il campionamento. Questo metodo permette inoltre di misurare direttamente le concentrazioni delle specie organiche anziché quella dell'intermedio radicalico. Ovviamente l'accuratezza delle costanti così calcolate dipende dall'accuratezza con cui è nota la costante delle specie di riferimento.

### **SCelta DELLO STANDARD DI RIFERIMENTO**

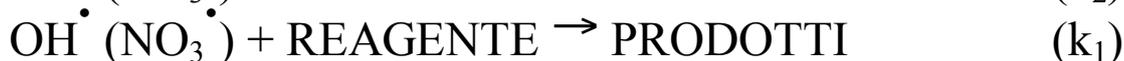
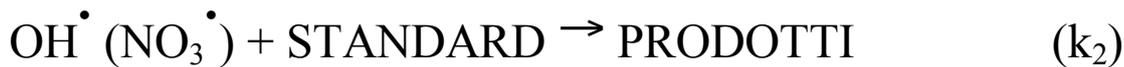
Per quanto riguarda la scelta dello standard, oltre alla caratteristica di non avere bande che si sovrappongono con quelle dei reagenti e dei composti che sono coinvolti per la formazione del radicale nitrato e del radicale ossidrilico, esso *deve avere costante di velocità dello stesso ordine di grandezza* del substrato indagato. Se così non fosse avremmo un consumo di radicale nitrato e del radicale ossidrilico dovuto solo ad uno dei due composti organici, impedendoci di valutare l'effettiva costante di velocità. Deve inoltre presentare *una legge cinetica dello stesso ordine* del nostro substrato.

## DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI VELOCITA'

### METODO DELLE MISURE CINETICHE RELATIVE

\* Utilizzato per la prima volta dal gruppo Atkinson a Riverside (CA, USA)

R. Atkinson, *J. Phys. Chem.*, **1991**, Vol.20, pp. 459.



$\text{OH}^\cdot (\text{NO}_3^\cdot)$  in eccesso per avere una reazione dello PSEUDOPRIMORDINE

$$\ln [\text{STD}]_0 / [\text{STD}]_t = k_1 / k_2 \ln [\text{REA}]_0 / [\text{REA}]_t$$

se  $\ln [\text{STD}]_0 / [\text{STD}]_t = Y$  e  $\ln [\text{REA}]_0 / [\text{REA}]_t = X$

$Y = mX$                        $m = k_1 / k_2$                        $k_2$  nota in letteratura

$$k_1 = m k_2$$

### SCELTA DELLA BANDA

- L'intensità della banda deve essere compresa nell'intervallo di linearità dello strumento
- Deve essere in una regione spettrale in cui non cadono bande di assorbimento IR dei reagenti e di eventuali prodotti.

### SCELTA DELLO STANDARD

- Deve seguire la stessa legge cinetica del reagente
- Deve avere costante di velocità dello stesso ordine di grandezza del substrato

## DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE DI VELOCITA'



Per lo Standard

$$-d[\text{STD}]/dt = k_1 [\text{STD}] \quad -d[\text{STD}]/[\text{STD}] = -k_1 dt$$

$$\ln [\text{STD}] = -k_1 t + C$$

$$t = 0 \rightarrow [\text{STD}]_0 \quad \ln [\text{STD}] = \ln [\text{STD}]_0 - k_1 t$$

$$1) \quad \ln [\text{STD}] / [\text{STD}]_0 = -k_1 t$$

Per il Reagente

$$-d[\text{REA}]/dt = k_2 [\text{REA}] \quad -d[\text{REA}]/[\text{REA}] = -k_2 dt$$

$$\ln [\text{REA}] = -k_2 t + C$$

$$t = 0 \rightarrow [\text{REA}]_0 \quad \ln [\text{REA}] = \ln [\text{REA}]_0 - k_2 t$$

$$2) \quad \ln [\text{REA}] / [\text{REA}]_0 = -k_2 t$$

Se uguagliamo 1 = 2

$$1/k_2 \ln [\text{REA}] / [\text{REA}]_0 = 1/k_1 \ln [\text{STD}] / [\text{STD}]_0$$

$$\ln [\text{STD}] / [\text{STD}]_0 = k_1 / k_2 \ln [\text{REA}] / [\text{REA}]_0$$

### CONDIZIONI:

$$[\text{O}_3] = 34 \text{ ppm} = 10,40 * 10^{-2} \text{ mmoli}$$

$$[\text{NO}_2] = 100 \text{ ppm} = 3200 * 10^{-4} \text{ mmoli}$$

$$[\text{REA}] = 11 \text{ ppm} = 1,200 * 10^{-2} \text{ mmoli}$$

## COSTANTI DI VELOCITA'

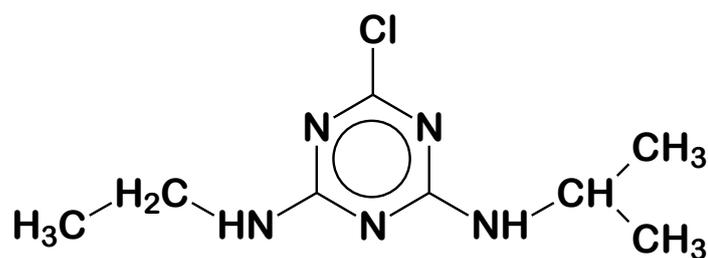
- TRE ESPERIMENTI PER OGNI REAZIONE

- UNO O DUE STANDARD INTERNI PER OGNI REAGENTE

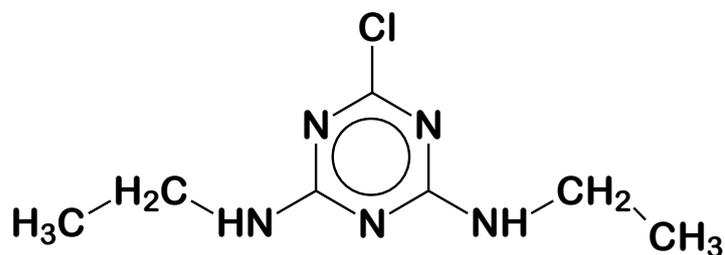
<i>SUBSTRATO</i>	<i>STANDARD</i>	$k(\text{NO}_3^\bullet)$ ( $\text{cm}^3 \text{molecole}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
p-Metossitoluene	1,3,5-trimetilbenzene	$3.12 \pm 0.54 \cdot 10^{-15}$
	4-metiltoluene	$2.16 \pm 0.40 \cdot 10^{-15}$
p-Etossitoluene	1,3,5-trimetilbenzene	$2.67 \pm 0.53 \cdot 10^{-15}$
	4-metiltoluene	$2.00 \pm 0.34 \cdot 10^{-15}$
p-isopropiltoluene	4-metossibenzene	$9.98 \pm 0.15 \cdot 10^{-16}$
p-Tertbutiltoluene	4-metossibenzene	$5.99 \pm 0.45 \cdot 10^{-16}$
	etilene	$7.15 \pm 0.45 \cdot 10^{-16}$
p-Etiltoluene	1,3,5-trimetilbenzene	$7.71 \pm 1.10 \cdot 10^{-16}$
<i>SUBSTRATO</i>	<i>STANDARD</i>	$k(\text{OH}^\bullet)$ ( $\text{cm}^3 \text{molecole}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
p-isopropiltoluene	etilene	$15.94 \pm 1.30 \cdot 10^{-12}$
p-tertbutiltoluene	etilene	$13.96 \pm 0.89 \cdot 10^{-12}$

# STUDIO CINETICO DELL' OZONIZZAZIONE DI ERBICIDI TRIAZINICI

I substrati oggetto di questo studio cinetico sono la 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina e la 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina note con il nome commerciale di atrazina e simazina rispettivamente. Le strutture di tali composti sono di seguito riportate.



**2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina  
(ATRAZINA)**



**2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina  
(SIMAZINA)**

Per una trattazione teorica si prenderà in considerazione l'atrazina (ATR) come modello in quanto gli altri erbicidi triazinici presentano un'identica trattazione cinetica.

Coerentemente con la letteratura (7) si può supporre che la velocità di scomparsa del substrato modello sia data dall' equazione:

$$v = -d[\text{ATR}] / dt = k_{app} [\text{ATR}] [\text{O}_3] \quad (1)$$

che complessivamente rappresenta una cinetica del II ordine. Per rendere possibile l'ottenimento della costante di velocità, si può ritenere che la concentrazione di ozono sia così grande da poterla considerare costante durante lo svolgersi della reazione ed in particolare si considera:

$$[\text{O}_3] = [\text{O}_3]_{eq} = \text{cost}$$

Sotto queste ipotesi la (1) diventa:

$$v = (k_{app} [\text{O}_3]_{eq}) [\text{ATR}] = k' [\text{ATR}] \quad (2)$$

con  $k'$  costante di velocità apparente di pseudo-primo ordine. La costante è "apparente" poichè in realtà è la somma delle costanti derivanti dalle regiochimiche possibili ed è di pseudo-primo ordine perchè ottenuta come prodotto di due grandezze:

$$k' = k_{app} [\text{O}_3]_{eq}$$

Si tenga presente che affermare che:

$$[\text{O}_3] = \text{cost} \quad (3)$$

implica:

$$-d [\text{O}_3] / dt = 0$$

ovvero porsi nelle condizioni di stato stazionario di ozono.

A questo punto è opportuno verificare che le condizioni sperimentali adottate siano corrette.

## VERIFICA DELLE IPOTESI DI STATO STAZIONARIO

Dalla letteratura (8) emerge che numerosi sono i fattori che influenzano la concentrazione effettiva di ozono nel mezzo di reazione. La temperatura, il flusso della miscela  $O_2/O_3$ , la forza ionica, l'agitazione, il pH, sono le principali variabili di cui tener conto. Ovviamente queste considerazioni non sono fondamentali se le indagini condotte sono di tipo qualitativo, come nel caso della determinazione dei prodotti di reazione, mentre lo diventano se si vuole condurre un'analisi quantitativa.

La concentrazione di ozono può essere misurata spettrofotometricamente, valutando l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale l'ozono presenta un massimo d'assorbimento (8). Le concentrazioni sono state ottenute sfruttando la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon [O_3] s \quad \text{con } s = 1 \text{ cm} \quad \text{e} \quad \epsilon = 2930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (4)$$

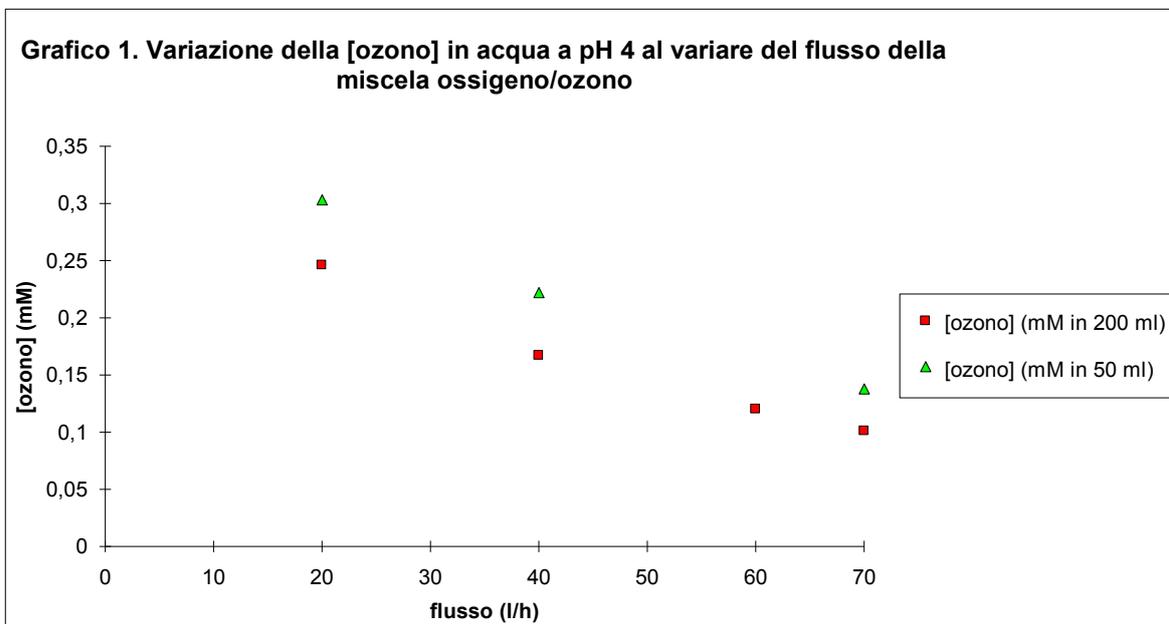
Affinchè l'ipotesi espressa dalla (3) risulti valida dovrà essere:

$$[O_3]_{eq} \gg [ATR] \quad (5)$$

E' evidente pertanto che dovranno essere valide le seguenti condizioni:

- 1) effettivo raggiungimento, nelle condizioni operative, di  $[O_3]_{eq}$  ;
- 2) controllo che le concentrazioni adottate rientrino nei limiti posti dalla (5);
- 3) controllo che l'aggiunta di substrato alla soluzione di ozono non modifichi  $[O_3]_{eq}$  ;

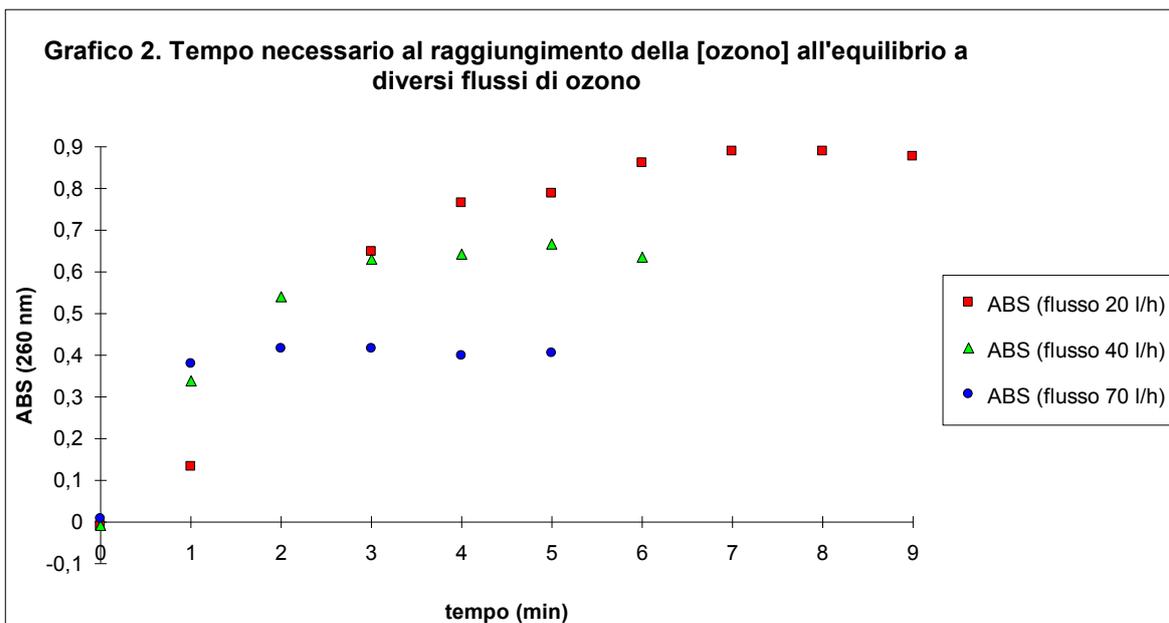
1) Per verificare la validità della prima condizione è necessario misurare la variazione della  $[O_3]$  disciolto in acqua a pH acido al variare del flusso della miscela  $O_2/O_3$ .



Risulta evidente come la  $[O_3]_{eq}$  aumenti al diminuire del flusso di gas.

E' utile a questo punto misurare il tempo necessario affinché si raggiunga la  $[O_3]_{eq}$  a diversi flussi e per diversi volumi di soluzione.

Il tempo richiesto per il raggiungimento dell'equilibrio risulta aumentare all'aumentare del volume di soluzione ed al diminuire del flusso della miscela ozono/ossigeno. La condizione di equilibrio si intende raggiunta quando l'assorbanza dell'ozono resta pressochè costante (le prove sono state condotte su 50 ml di acqua).



I risultati sono riassunti in tabella 3.

Tabella 3. Tempo di saturazione per 50 ml di soluzione in funzione del flusso di ozono.

flusso (l/h)	tempo di sat. (min)
20	6
40	3
70	2

Il comportamento della  $[O_3]_{eq}$  al variare delle diverse condizioni (volume, flusso, tempo) può essere spiegato supponendo che essa non corrisponda alla concentrazione che si avrebbe in una soluzione satura di ozono nelle condizioni date, ovvero non dipende solo dalla costante di Henry:

$$P_{O_3eq} = K_H P_{O_3 \text{ gas}}$$

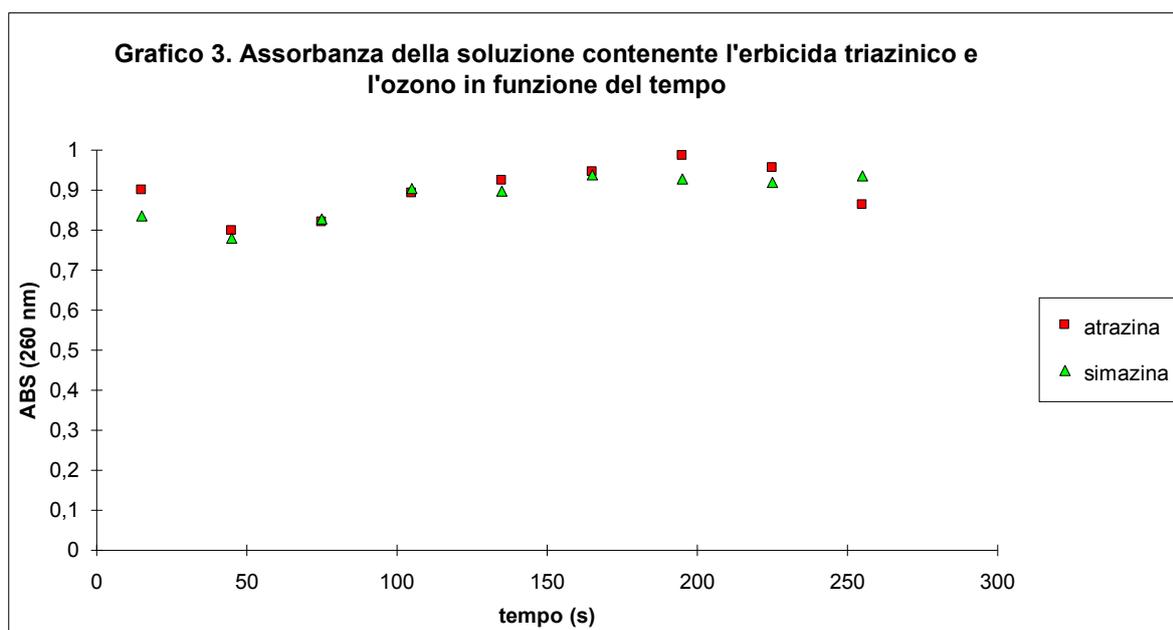
Probabilmente l'energico gorgogliamento della miscela  $O_2/O_3$  instaura condizioni di "stripping" dell'ozono da parte dell'ossigeno; ciò spiegherebbe la diminuzione di  $[O_3]_{eq}$  all'aumentare del flusso. La concentrazione di ozono in fase gas, infatti, non aumenta proporzionalmente a quella di ossigeno, ma subisce una flessione, come dichiarato dal costruttore dell'ozonizzatore.

2) Affinchè sia rispettata la (5) occorre considerare che la  $[O_3]_{eq}$  a  $T_{amb}$  e con flusso di 20 l/h è  $0.327 \cdot 10^{-3}$  M, si può quindi operare con concentrazioni iniziali di atrazina pari a circa 2 mg/l ( $9.27 \cdot 10^{-6}$  M).

3) Un'ultima indagine v  condotta per verificare se l'aggiunta del substrato modifichi o meno la  $[O_3]_{eq}$ . I dati, sempre riferiti a  $T_{amb}$ , sono illustrati nella tabella 4 e nel grafico 3.

Tabella 4. Assorbanza della soluzione contenente ozono ed erbicida triazinico in funzione del tempo.

tempo (s)	atrazina	simazina
15	0.901	0.836
45	0.799	0.780
75	0.821	0.828
105	0.893	0.904
135	0.924	0.898
165	0.946	0.939
195	0.987	0.928
225	0.956	0.919
255	0.864	0.936



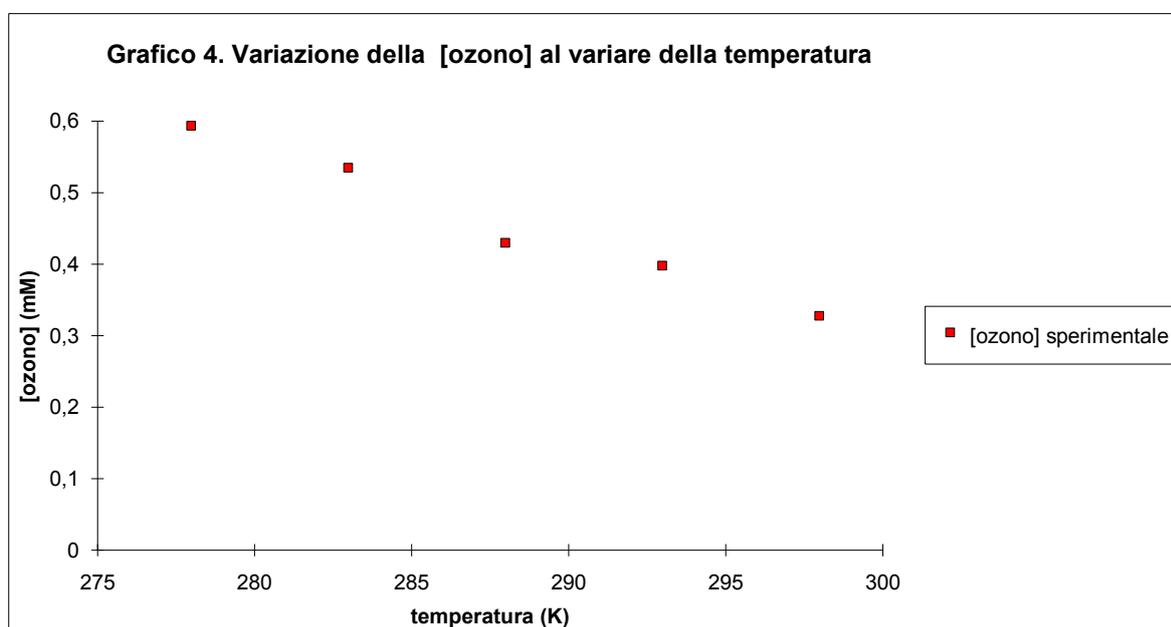
Si pu  constatare come dopo 90-120 secondi la  $[O_3]$  torni ad assumere il valore  $[O_3]_{eq}$ ; la diminuzione di  $[O_3]$  successiva all'aggiunta di substrato   inoltre di modesta entit  per cui si pu  pensare che essa influenzi in modo trascurabile la scomparsa dello stesso.

Pu  risultare interessante misurare la  $[O_3]_{eq}$  a diverse temperature, verifica condotta, anch'essa, spettrofotometricamente (questa determinazione   ad esempio fondamentale se si intende effettuare uno studio sui parametri di attivazione; in questo caso infatti bisogna calcolare i valori delle  $k_{app}$  alle temperature alle quali vengono condotte le cinetiche).

La misurazione dell'assorbanza deve essere effettuata in triplo per ogni temperatura. Nella tabella 5 e nel grafico 4 sono riportati i valori medi che si ottengono.

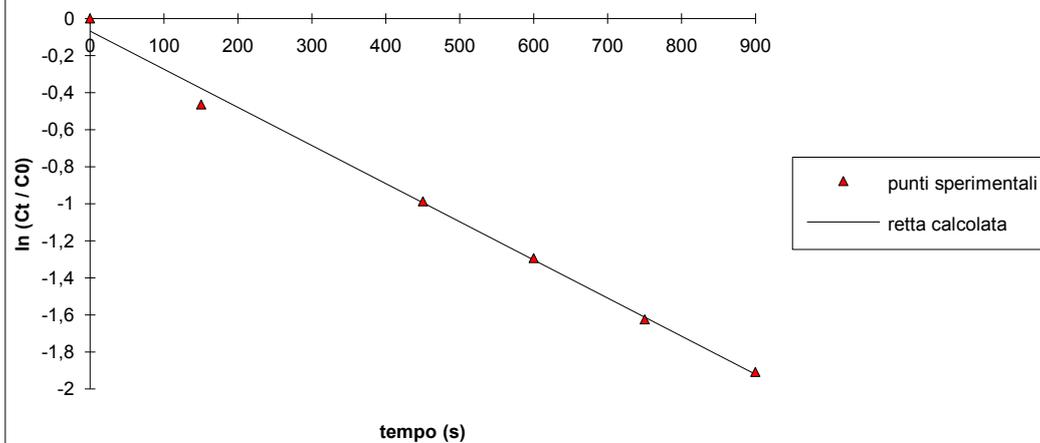
Tabella 5. Assorbanza di una soluzione satura per ozono a diverse temperature.

temperatura (K)	ABS	[ozono] ( $M \cdot 10^{-3}$ )
278.0	1.737	0.593
283.0	1.566	0.534
287.8	1.257	0.429
293.0	1.163	0.397
298.0	0.958	0.327

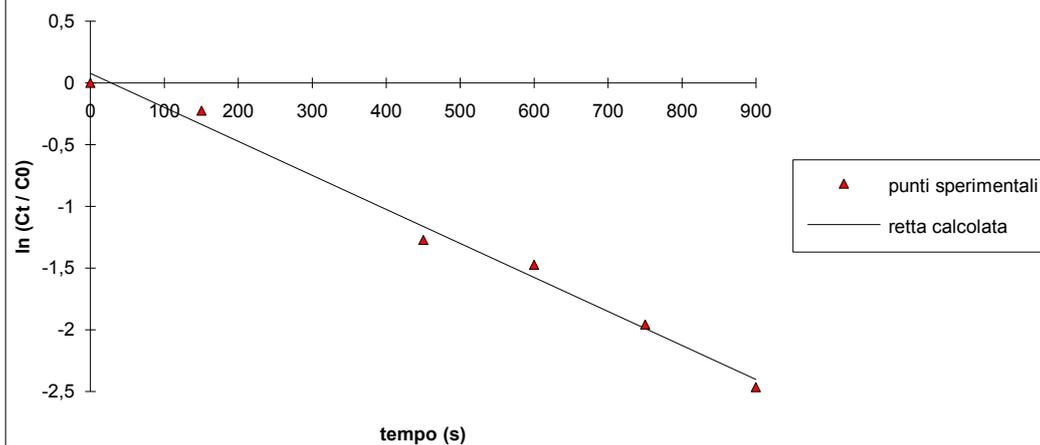


Come si nota, vi è una diminuzione della concentrazione di ozono all'aumentare della temperatura. Questo risultato è in accordo con il comportamento della costante di Henry al variare della temperatura.

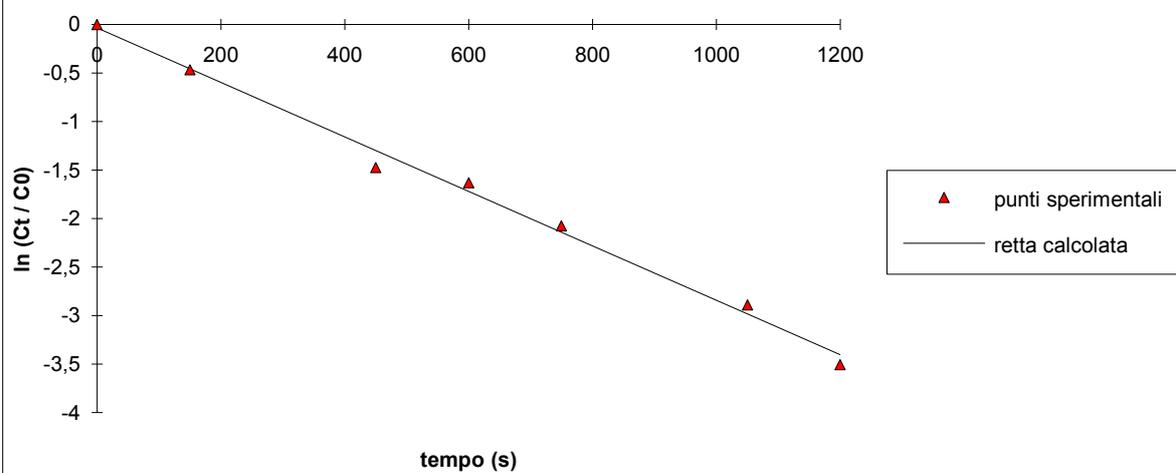
**Grafico 9. Cinetica della reazione di ozonizzazione dell'atrazina a pH 3 senza presaturazione della soluzione. Prova 1**



**Grafico 10. Cinetica della reazione di ozonizzazione della simazina a pH 3 senza presaturazione della soluzione. Prova 1**



**Grafico 11. Cinetica della reazione di ozonizzazione della 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina a pH 3 presaturando la soluzione con ozono. Prova 1**



**Grafico 12. Cinetica della reazione di ozonizzazione dell 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina a pH 3 presaturando la soluzione con ozono. Prova 1**

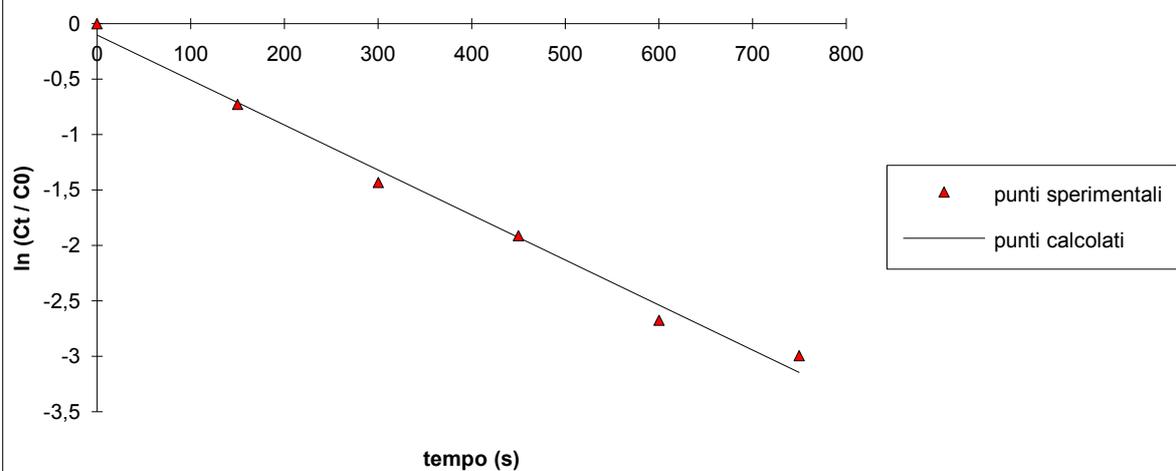


Tabella 16. Valori delle  $k_{app}$  per l'ozonolisi di simazina e atrazina senza presaturare la soluzione.

	$k_{app}$	dev. stand. %
<b>ATRAZINA</b>	6.36	1.47
<b>SIMAZINA</b>	9.19	2.37

Tabella 17. Valori delle  $k_{app}$  per l'ozonolisi di simazina e atrazina presaturando la soluzione.

	$k_{app}$	dev. stand. %
<b>ATRAZINA</b>	7.90	7.80
<b>SIMAZINA</b>	11.93	4.43

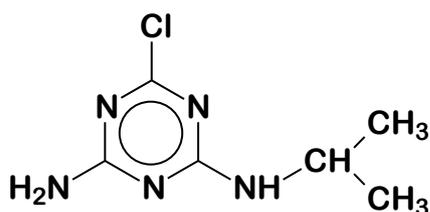
Dall'analisi delle costanti di velocità risulta evidente come le reazioni di ozonizzazione di erbicidi triazinici eseguite su soluzioni presaturate con ozono siano più veloci di quelle effettuate senza presaturazione. In particolare per l'atrazina la differenza è del 19.5% e per la simazina del 23%.

Ciò si può spiegare ipotizzando che nel caso delle reazioni condotte senza presaturazione, l'ozono non si trovi ancora in condizioni di stato stazionario.

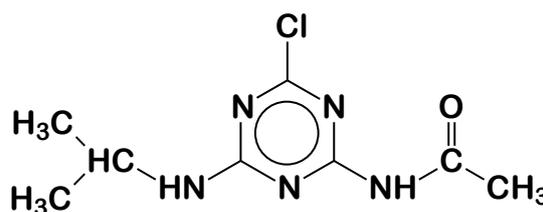
## PRODOTTI DI REAZIONE

Dall'analisi della reazione di ozonizzazione della 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina (atrazina) sono stati identificati:

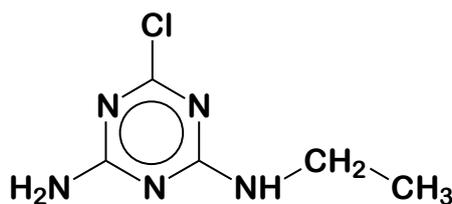
- la 2-cloro-4-ammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina (deetilatrazina) ( 3 )
- la 2-cloro-4-acetammido-6-isopropilammino-1,3,5-triazina ( 4 )
- la 2-cloro-4-ammino-6-etilammino-1,3,5-triazina ( 5 )



( 3 )



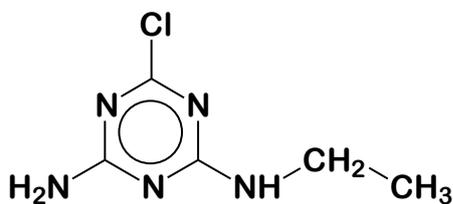
( 4 )



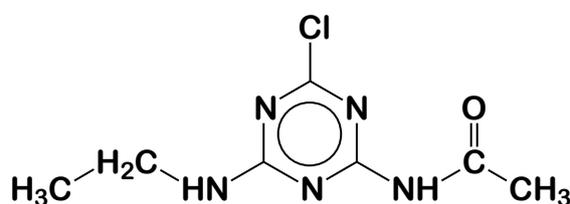
( 5 )

Dall'analisi della reazione di ozonizzazione della 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina (simazina) sono stati identificati:

- la 2-cloro-4-ammino-6-etilammino-1,3,5-triazina (deisopropilatrazina) ( 5 )
- la 2-cloro-4-acetammido-6-etilammino-1,3,5-triazina ( 6 ).



( 5 )



( 6 )

## MECCANISMO DI REAZIONE

Data la bassa solubilità del substrato in acqua risulta più facile lavorare in grande eccesso di ozono. Ciò consente quindi l'analisi diretta in HPLC, dopo eliminazione dell'eccesso di ozono con azoto, di ogni prelievo effettuato riducendo così gli errori sperimentali nel trattamento del campione.

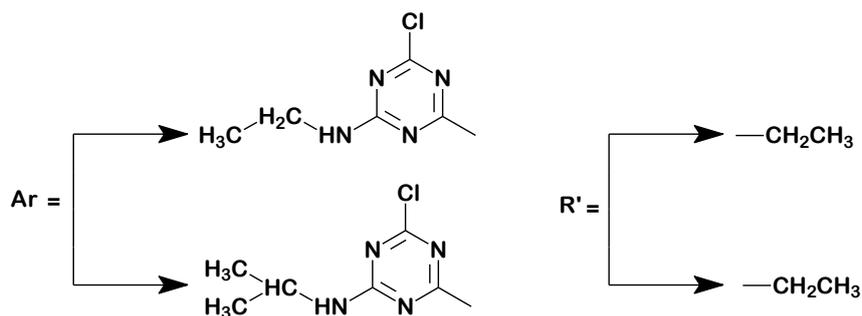
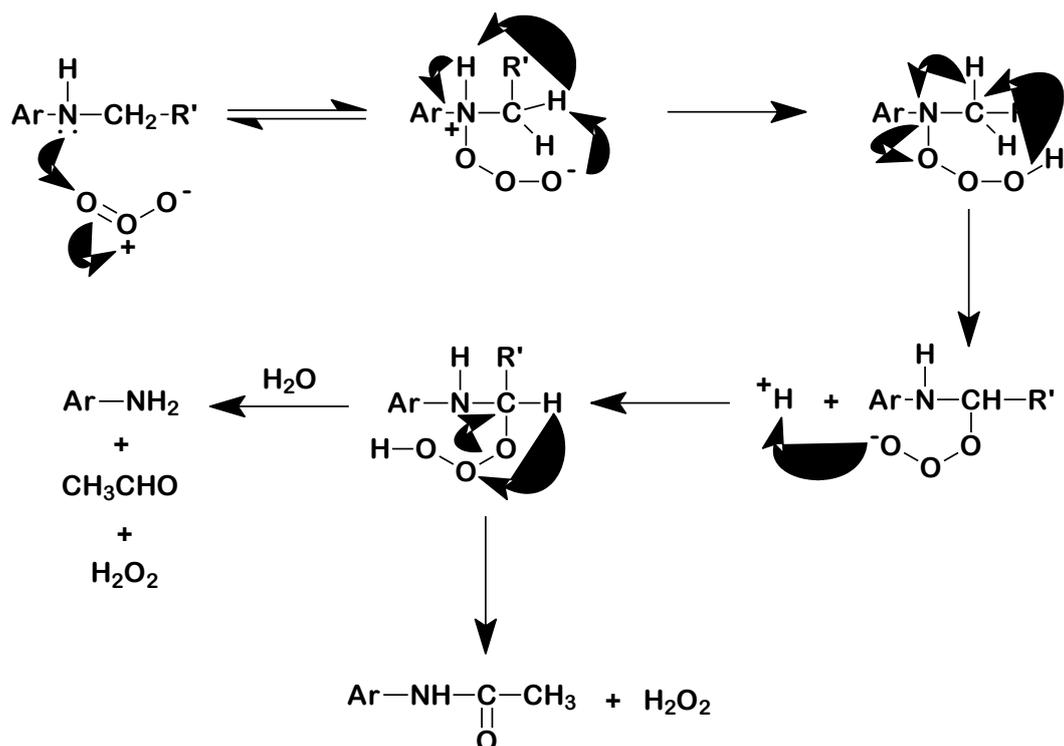
Si noti come l'ordine di reattività espresso dalle  $k_{app}$  sia:



Ciò è giustificato dal fatto che la simazina presenta due catene alchiliche sull'azoto identiche quindi un doppio sito di attacco per l'ozono. Dall'analisi dei prodotti ottenuti dalla reazione di ozonizzazione a pH 3 si possono trarre diverse conclusioni.

In primo luogo poichè non sono stati identificati come prodotti di degradazione composti derivanti dalla rottura dell'anello, si può ipotizzare che l'attacco elettrofilo dell'ozono (9 e 10) avvenga sull'atomo di azoto esociclico. Tale ipotesi può essere confermata sperimentalmente effettuando la cinetica della reazione di ozonizzazione della 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina a pH 0. A questo pH gli atomi di azoto esociclici sono protonati (la  $pK_a$  dell'atrazina è  $< 1,6$ ) e quindi non possono subire attacco elettrofilo dell'ozono; infatti non si rileva alcuna reattività.

Inoltre se si escludono gli erbicidi triazinici aventi uguali catene alchiliche sui due atomi di azoto esociclici, che quindi non presentano possibilità di distinzione da parte dell'ozono fra i due atomi di azoto, la regiochimica verificata è sempre la stessa. L'attacco dell'ozono avviene principalmente sull'atomo di azoto a cui è legata la catena alchilica meno ramificata e quindi su atrazina si verifica maggiormente l'attacco sull'atomo di azoto recante il gruppo etilico. Questo potrebbe essere imputabile ad un differente impedimento sterico dovuto alle diverse dimensioni delle catene alchiliche sugli atomi di azoto esociclici. La formazione dell'acetammide, che può derivare soltanto dall'attacco dell'ozono sull'atomo di azoto esociclico meno impedito stericamente, convalida ulteriormente la tesi dell'attacco esociclico. La reazione di ozonolisi di questa classe di erbicidi triazinici potrebbe però dipendere oltre che dall'effetto sterico delle catene alchiliche, anche dal loro effetto elettronico. Il meccanismo di reazione più accreditato è di seguito riportato.



Il primo stadio di questo meccanismo comporta l'attacco elettrofilo dell'ozono all'atomo di azoto esociclico portante la catena alchilica meno ramificata con formazione di un preequilibrio di coordinazione. Il passaggio successivo vede l'attacco del doppietto elettronico dell'ossigeno ad un atomo di idrogeno del carbonio in  $\alpha$  all'azoto con formazione di un idrotriosso, il quale a sua volta riarrangia, con formazione dell'idrotriosso finale dal quale derivano entrambi i prodotti di reazione.

In realtà tutti i passaggi di questo meccanismo avvengono in un unico step, trattandosi di un meccanismo di tipo concertato, che porta solamente alla formazione dell'idrotriosso da cui derivano i prodotti di reazione.

# PARTE SPERIMENTALE

## PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI

Le soluzioni degli erbicidi triazinici analizzati sono state preparate disperdendo una quantità nota dei composti in acqua Milli-Q (Milli-Q Reagent Water System; Millipore Corp. Bedford, Ma) e ponendo tale soluzione sotto agitazione magnetica per 24 ore a temperatura ambiente. Le sospensioni sono state filtrate sotto vuoto con filtri Millipore (porosità 0.45  $\mu\text{m}$ ) per eliminare il particolato indisciolto e la concentrazione è stata determinata in HPLC dopo aver effettuato le corrispondenti rette di taratura. Le concentrazioni sono risultate pari a circa  $10^{-6}$  M.

## OZONIZZAZIONE

Le reazioni di ozonizzazione senza presaturazione a pH 3 sono state eseguite in 50 ml di soluzione acidificata con acido solforico 0.05 M. Le reazioni con presaturazione sono state condotte saturando con ozono 40 ml di acqua Milli-Q (acidificata a pH 3 per acido solforico 0.05) ed aggiungendo 10 ml di soluzione acquosa delle s-triazine. L'ozonizzazione è stata eseguita saturando la soluzione con ossigeno, fatto fluire alla velocità di 20 l/h per 5 minuti attraverso l'ozonizzatore (Fisher 501 e impianto pilota n. 18 TP Monotubo, Ozono Eletronic) e, successivamente, sottoponendo ad una corrente di 200 mA un ugual flusso di ossigeno per 10 minuti. Prove preliminari eseguite determinando per via spettrofotometrica la concentrazione di  $\text{O}_3$  in acqua Milli-Q avevano dimostrato che un trattamento con ozono della durata di 10 minuti garantiva con largo margine di sicurezza il raggiungimento dello stato stazionario.

## TECNICA ANALITICA

La cinetica delle reazioni di degradazione con ozono è stata eseguita facendo gorgogliare ozono nelle soluzioni in esame con la stessa velocità di flusso descritta per la presaturazione.

A partire dall'accensione dell'ozonizzatore sono state prelevate aliquote di 1 ml ad opportuni intervalli di tempo in funzione del composto in esame. Per le prove a pH 3, nel caso particolare della 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina e della 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina è stato eseguito un prelievo ogni 150 secondi. Le aliquote prelevate sono state trattate con azoto, flussato per 5 minuti, per allontanare l'ozono residuo e per arrestare la reazione. L'analisi è stata eseguita direttamente in HPLC analitico (Spectra Physics modello SP 8800) senza alcuna procedura di estrazione, iniettando 10 µl nel caso della 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina e della 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina.

La colonna utilizzata è una Merck RP-C18 di 25 cm di lunghezza, 4 mm di diametro interno, 5 µm di granulometria sferica con 100 Å di porosità.

Come fase eluente è stata utilizzata una miscela di acetonitrile 40% e acqua Milli-Q 60% per la 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina e la 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina con una velocità di flusso di 0.8 ml/min. Come rivelatore si è utilizzato un detector UV (Waters 484) monitorando l'assorbanza dei composti alla lunghezza d'onda di 223 nm corrispondente al massimo di assorbimento dell'anello triazinico.

## RETTE DI TARATURA

Per determinazioni di tipo quantitativo si è fatto uso di apposite rette di taratura. Per la 2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina e la 2-cloro-4,6-di(etilammino)-1,3,5-triazina le soluzioni utilizzate per la costruzione di tali rette sono state preparate sciogliendo i composti standard di partenza in metanolo (Merck per HPLC) alla concentrazione di 2 ng/µl ed allestendo successive diluizioni in acqua Milli-Q fino ad ottenere concentrazioni di 0.5-1-2-3-4-5 ng/µl. Queste soluzioni sono state iniettate, per quanto riguarda le rette di taratura comprendenti un range tra 10 e 50 ng, nello stesso volume dei campioni ignoti, 10 µl, in ordine crescente di diluizione. Per la retta di taratura avente un range 0-10 ng, si sono iniettati volumi crescenti della soluzione avente concentrazione di 0.5 ng/µl.