

ISSN 0393-8395

Documenta
dell'Istituto Italiano di Idrobiologia

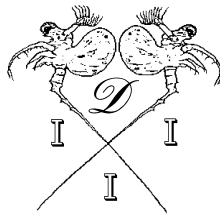
N° 60

**METODOLOGIE ANALITICHE E CONTROLLI DI QUALITÀ
NEL LABORATORIO CHIMICO
DELL'ISTITUTO ITALIANO DI IDROBIOLOGIA**

Gabriele A. TARTARI e Rosario MOSELLO

1997

Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto Italiano di Idrobiologia - 28048 Verbania Pallanza



Supplemento delle *Memorie* dell'Istituto Italiano di Idrobiologia

Direttore responsabile: Dr. Riccardo de Bernardi

Redazione: Dr. Gianluigi Giussani

Composizione: Luciana Adreani, Pierisa Panzani, e Teresa Ruffoni

Autorizzazione Cancelleria del Tribunale di Verbania
N. 58 del 7 Ottobre 1959

INDICE

PRESENTAZIONE	i
1. INTRODUZIONE.....	1
2. SVILUPPO DELLA STRUMENTAZIONE E DELLE METODOLOGIE ANALITICHE.....	5
2.1. SVILUPPO DELLA STRUMENTAZIONE.....	5
2.2. SVILUPPO DELLE METODOLOGIE ANALITICHE.....	8
2.2.1. OSSIGENO DISCIOLTO	9
2.2.2. MISURA DEL pH	10
2.2.3. CONDUCIBILITÀ ELETTRICA	11
2.2.4. ALCALINITÀ TOTALE	12
2.2.5. SOLFATI	14
2.2.6. NITRATI	14
2.2.7. CLORURI	16
2.2.8. CALCIO, MAGNESIO, SODIO E POTASSIO	17
2.2.9. AMMONIO	19
2.2.10. NITRITI.....	20
2.2.11. AZOTO TOTALE	20
2.2.12. FOSFORO REATTIVO AL MOLIBDATO.....	22
2.2.13. FOSFORO TOTALE	23
2.2.14. SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO	23
2.2.15. METALLI PESANTI.....	24
3. METODICHE ATTUALMENTE IN USO.....	27
3.1. PRETRATTAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE.....	27
3.2. OSSIGENO DISCIOLTO.....	29
3.3. MISURA DEL pH.....	31
3.4. CONDUCIBILITÀ ELETTRICA.....	36
3.5. ALCALINITÀ TOTALE.....	41
3.6. ANALISI IN SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO MOLECOLARE	51
3.6.1. AZZERAMENTO STRUMENTALE CON I BIANCHI.....	52
3.6.2. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE.....	53
3.6.3. NITRATI	57
3.6.4. NITRITI.....	59
3.6.5. AMMONIO	61
3.6.6. FOSFORO REATTIVO AL MOLIBDATO.....	63
3.6.7. AZOTO E FOSFORO TOTALE	65
3.6.8. SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO	70
3.7. ANALISI IN FLUSSO CONTINUO.....	72
3.7.1. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE.....	73

3.7.2.	AMMONIO	75
3.7.3.	AZOTO TOTALE	78
3.7.4.	SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO	82
3.8.	ANALISI IN CROMATOGRAFIA IONICA	86
3.8.1.	MODALITÀ DI CALIBRAZIONE.....	87
3.8.2.	CLORURI, NITRATI E SOLFATI	90
3.8.3.	CALCIO, MAGNESIO, SODIO, POTASSIO ED AMMONIO	96
3.9.	ANALISI IN ASSORBIMENTO ATOMICO	102
3.9.1.	MODALITÀ DI CALIBRAZIONE.....	102
3.9.2.	CALCIO, MAGNESIO, SODIO E POTASSIO	103
3.9.3.	METALLI	105
4.	CONTROLLI DI QUALITÀ	108
4.1.	DEFINIZIONI	109
4.2.	CONTROLLI DI QUALITÀ INTERNI AL LABORATORIO	109
4.2.1.	CALIBRAZIONI	110
4.2.2.	CONTROLLO DEI BIANCHI E LIMITI DI DETEZIONE E DI QUANTIFICAZIONE.....	112
4.2.3.	CARTE DI CONTROLLO	116
4.2.4.	PRECISIONE ED ACCURATEZZA	119
4.2.5.	NUMERO DI CIFRE SIGNIFICATIVE	120
4.2.6.	VARIAZIONI DI METODOLOGIE ANALITICHE	120
4.2.7.	CONTROLLO DELLA CONSISTENZA INTERNA DELLE ANALISI.....	129
4.2.8.	CORREZIONE DELLA CONDUCIBILITÀ PER LA TEMPERATURA	134
4.2.9.	VALIDAZIONE DEI DATI.....	136
4.2.10.	ARCHIVIAZIONE DEI DATI	137
4.2.11.	CONFRONTO DEI RISULTATI ANALITICI CON I DATI PRECEDENTI	138
4.2.12.	DOCUMENTAZIONE.....	138
4.3.	CONTROLLI DI QUALITÀ ESTERNI AL LABORATORIO	140
4.3.1.	ESERCIZI DI INTERCALIBRAZIONE.....	140
4.3.2.	CERTIFICAZIONE DI CAMPIONI.....	144
5.	CONCLUSIONI	146
	RIASSUNTO	147
	SUMMARY	148
	ZUSAMMENFASSUNG.....	149
	BIBLIOGRAFIA	151

Indirizzo degli Autori:

C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia, 28048 Verbania Pallanza, Italia

PRESENTAZIONE

In più di cinquanta anni di attività l'Istituto Italiano di Idrobiologia ha visto radicali mutamenti nel modo di concepire gli studi ambientali ed un notevole sviluppo nelle tecnologie di misura.

Lo studio dei laghi, al pari di quello di altri ambienti naturali, agli inizi del secolo era prevalentemente indirizzato alla scoperta e alla quantificazione dei complessi equilibri fisici, chimici e biologici che regolano l'ecologia delle acque. Con sempre maggiore intensità a partire dal dopoguerra, si è imposto l'aspetto dell'ambiente come risorsa. Le acque di laghi e fiumi, pur restando degli ecosistemi interessanti per gli studiosi, sono diventate risorse di acqua potabile, irrigua ed industriale, sono inoltre aumentati gli usi di questi ambienti per la pesca professionale e sportiva e come fonte di attività turistica. Contemporaneamente, come risultato di un aumento, ma non equilibrato sviluppo economico, gli scarichi cloacali, industriali o l'immissione di inquinanti anche attraverso le deposizioni atmosferiche hanno determinato una serie di alterazioni negli ambienti acquatici. La limnologia, scienza che studia le acque interne, è stata così chiamata ad affrontare le situazioni di alterazione degli equilibri ambientali derivanti da questi disturbi e ad assicurare una gestione confacente alle aumentate richieste di una buona qualità delle acque naturali.

Questo ha richiesto l'affiancamento alle ricerche di base di più dettagliati e stringenti studi applicativi, miranti a problemi ben definiti e quasi sempre collegati alle domande: quale è la causa del disturbo e come è possibile eliminarla?

Il lavoro presentato da Tartari e Mosello ripercorre l'intero periodo di attività dell'Istituto così come è stato vissuto nel reparto che si occupa delle analisi chimiche delle acque. In questo settore lo sviluppo tecnologico ha determinato molte innovazioni nell'arco dei pochi decenni considerati, quali l'introduzione della spettrofotometria ad assorbimento molecolare, quindi di quella ad assorbimento atomico e, più recentemente, della cromatografia ionica. Le aumentate possibilità strumentali, se da una parte hanno ampliato lo spettro delle sostanze analizzabili e la precisione delle determinazioni, dall'altro hanno richiesto un aumento della professionalità e dell'impegno da parte degli addetti. Inoltre, le aumentate collaborazioni a livello nazionale ed internazionale, hanno imposto una progressiva formalizzazione delle metodiche e dei controlli di qualità analitica. Questa evoluzione e la situazione attuale delle attività costituisce l'argomento di questo volume, che vuole essere anche la base per una serie di aggiornamenti che puntualizzino con una maggior frequenza l'evoluzione delle metodologie analitiche ed operative previste nei prossimi anni.

Per completare questa introduzione devo ancora accennare a due importanti aspetti. Se pure il compito della stesura di questo lavoro è stato svolto da due persone, questo è stato reso possibile dalle attività di tutti i colleghi che attualmente operano nel settore chimico o che vi hanno operato nel passato. Inoltre, l'esame delle attività del reparto chimico svolto nel volume, non deve fare pensare a questo come ad un settore separato o distinto dagli altri. Al contrario l'integrazione esistente, ad esempio con le ricerche biologiche e di limnologia fisica, è sempre stato elevatissimo, sia per l'approccio multidisciplinare necessario per affrontare efficacemente i problemi limnologici, che per la scelta e la tradizione dei ricercatori e dei tecnici operanti nell'Istituto Italiano di Idrobiologia.

Concludo quindi con l'augurio che questo lavoro possa costituire una ulteriore fase di comunicazione e dialogo con i numerosi Istituti di ricerca, nazionali ed internazionali, con i quali è sempre esistita una ampia e fattiva collaborazione.

Dr. Riccardo de Bernardi
direttore dell'Istituto Italiano di Idrobiologia

1. INTRODUZIONE

L'evoluzione a lungo termine della chimica delle acque superficiali e delle deposizioni atmosferiche costituisce un aspetto fondamentale per la comprensione dei complessi fenomeni che regolano le interazioni fra atmosfera, bacino imbrifero ed acque. Infatti è ormai riconosciuto che alcuni fenomeni avvengono su scala temporale di decenni o secoli, e questi non sono adeguatamente studiati dalle ricerche tradizionali, che normalmente si articolano su base annuale o biennale, raramente quinquennale. Inoltre lo studio dell'evoluzione a lungo termine delle caratteristiche chimiche di un sistema permette una valutazione della variabilità interannuale, che non può essere adeguatamente considerata in ricerche a breve termine. Tale variabilità è particolarmente importante per sistemi che si trovano in uno stato di non equilibrio e la sua stima costituisce una premessa indispensabile per la valutazione della evoluzione del sistema stesso.

Sulla base di queste motivazioni si sono sviluppate, a partire dagli anni cinquanta, numerose iniziative di ricerche pluriennali, la maggior parte delle quali rivolte ai due maggiori problemi ambientali per i laghi nei paesi più sviluppati: l'eutrofizzazione delle acque lacustri e l'acidificazione delle deposizioni atmosferiche e delle acque superficiali.

L'Istituto Italiano di Idrobiologia, nei suoi oltre cinquanta anni di attività (Arnocida 1988), si è occupato estensivamente di entrambi questi campi di indagine, con un approccio interdisciplinare, nell'ambito del quale l'idrochimica ha sempre svolto una parte di rilievo. In particolare, per quanto riguarda questo aspetto, fin dai primi anni di attività, accanto agli studi prevalentemente biologici eseguiti sul L. Maggiore e su altri laghi subalpini ed alpini, è stato affrontato il problema del grave inquinamento industriale del Lago d'Orta. Il primo direttore, Edgardo Baldi, eseguiva campagne di studio nel 1940, 1943, 1946 e 1947-48, realizzando uno studio limnologico completo, nel quale l'idrochimica lacustre assumeva un'importanza rilevante (Baldi 1949c).

Per quanto riguarda l'eutrofizzazione, le ricerche hanno trovato un coordinamento internazionale nell'azione dell'OECD (1968, 1982) e numerosi programmi a lungo termine hanno considerato l'evoluzione trofica delle acque dei laghi più importanti nei diversi Paesi. Inoltre, quando sono state individuate le cause dell'eutrofizzazione lacustre negli eccessivi apporti di fosforo dal bacino imbrifero, iniziarono anche indagini sui fiumi tributari, principalmente mirate ai composti del fosforo e

dell'azoto, ma che generalmente prendevano in considerazione anche altre variabili chimiche.

Nell'ambito di queste ricerche internazionali, l'Istituto Italiano di Idrobiologia ha sviluppato approfonditi studi sulla eutrofizzazione del Lago Maggiore, per il quale si dispone di dati confrontabili con quelli attuali a partire dal 1956 (Corbella, dati non pubblicati). Lo studio dei principali tributari, iniziato con continuità nel 1971, fornisce dati particolarmente interessanti, in quanto considera torrenti e fiumi collocati in bacini con diverse caratteristiche geografiche, geolitologiche e a diverso impatto antropico. Inoltre, sempre nel campo dell'eutrofizzazione, l'Istituto ha raccolto dati chimici a partire dal 1948 sui laghi di Como e Lugano (Baldi *et al.* 1947a, 1947b, 1949, Vollenweider 1964, 1965), dal 1965 sul Lago di Iseo (Bonomi & Gerletti 1967) e dal 1971 sul Lago di Garda (Gerletti 1974). I campionamenti sono stati effettuati su base annuale o semestrale, con l'eccezione di studi più approfonditi, ma limitati nel tempo. Tale frequenza di osservazioni è tuttavia sufficiente a seguire l'evoluzione di questi laghi che, per la loro massa, subiscono variazioni chimiche modeste nel tempo. I prelievi, discontinui negli anni sessanta, si regolarizzarono a partire dal 1974, con la formalizzazione delle indagini nel Progetto Finalizzato per la Promozione della Qualità dell'Ambiente (1974-1980) (Bonomi 1968; Tonolli *et al.* 1975; Bonomi *et al.* 1977; Grimaldi 1980). Negli anni ottanta e novanta le indagini sono proseguite nell'ambito delle ricerche ordinarie del Consiglio Nazionale delle Ricerche ed hanno avuto come risultato numerosi studi sull'evoluzione idrochimica dei laghi profondi (Ruggiu & Mosello 1984; Barbanti *et al.* 1986; Ruggiu *et al.* 1988; Mosello & Calderoni 1990; Mosello *et al.* 1991a; Ambrosetti *et al.* 1983, 1992; Barbieri & Mosello 1992; Garibaldi *et al.* 1995) e del Lago Maggiore in particolare (Mosello *et al.* 1981; de Bernardi *et al.* 1984, Mosello 1988; de Bernardi & Ruggiu 1989; Manca *et al.* 1992; per una rassegna bibliografica vedi de Bernardi & Nobili 1989).

Sulla base di numerosi studi compiuti in campo agronomico nel secolo scorso, (Decet & Mosello 1994), ricerche sistematiche sulla chimica delle deposizioni atmosferiche iniziarono in Svezia nel 1948, estendendosi al resto della Scandinavia nel 1952-54 e ad altri Paesi europei negli anni successivi. Le prime indagini erano svolte in campo agrochimico, prevalentemente indirizzate a quantificare il flusso di nutrienti dall'atmosfera al suolo. Contemporaneamente avevano inizio studi sulla circolazione globale degli ioni in atmosfera, in particolare cloruri, e composti dell'azoto, considerandone le diverse fonti, i meccanismi di trasporto e di deposizione (Eriksson 1952a, 1952b, 1959, 1960). Negli anni sessanta si prese coscienza della problematica dell'acidificazione delle acque e dei suoli e i rilevamenti furono conseguentemente indirizzati allo studio degli ioni principali e del pH (Oden 1976; Cowling 1982). Venne organizzata una rete a livello europeo, originariamente denominata European Air Chemistry Network (EACN), che fu successivamente denominata EMEP (*Cooperative programme for monitoring and evaluation of the long-range transmission of air pollutants in Europe*). Come parte di questa attività furono eseguiti rilievi in nove stazioni italiane dal 1957 al 1960, nell'ambito degli studi promossi dall'Anno Geofisico Internazionale (Bossolasco & Cicconi 1961; Picotti 1963; Riehm *et al.* 1965).

Numerosi altri studi sono stati eseguiti in Italia, con un incremento negli anni sessanta e settanta, in relazione all'aumento dell'interesse per i problemi di acidificazione (per una rassegna vedi Tartari & Mosello 1984, Tartari 1987, Mosello *et al.* 1993b). Tuttavia le diverse metodologie di campionamento ed analisi rendevano scarsamente confrontabili i risultati, impedendo così di ottenere un quadro nazionale della chimica delle deposizioni atmosferiche ed informazioni sull'evoluzione a lungo termine.

L'Istituto Italiano di Idrobiologia ha sviluppato a partire dal 1975 un settore di ricerca sull'acidificazione, inizialmente finalizzato allo studio degli effetti delle precipitazioni sui laghi Mergozzo e Maggiore (Tartari 1980; Mosello & Tartari 1982), accanto a numerosi altri temi (per una rassegna vedi Mosello *et al.* 1988, 1992a), i dati raccolti hanno permesso, in anni successivi, di valutare l'evoluzione della chimica delle deposizioni (Mosello *et al.* 1985, 1988, 1989c, 1993b; Della Lucia *et al.* 1996). Inoltre, a partire dal 1980, vengono raccolti sistematicamente dati chimici su alcuni laghi alpini d'alta quota, con l'obiettivo di valutare le variazioni in relazione ai fenomeni di acidificazione. Tali indagini, dapprima limitate al settore alpino occidentale, si sono successivamente estese all'intero arco alpino, con collaborazioni internazionali nell'ambito di ricerche patrocinate dalla Comunità Europea (Mosello & Wathne 1995).

La risonanza di questi studi, anche in campo internazionale, ha determinato l'affidamento all'Istituto del coordinamento di attività di studio a livello italiano ed internazionale. Fra le prime si può ricordare la rete per lo studio delle caratteristiche chimiche delle deposizioni atmosferiche (RIDEP) patrocinata dal Servizio Valutazione Impatto Ambientale del Ministero dell'Ambiente. Lo studio, svoltosi nel quinquennio 1988-92, ha visto la partecipazione di circa quaranta Istituti di ricerca ed Enti di controllo ambientale, che hanno raccolto dati da circa 140 stazioni, permettendo per la prima volta la definizione dell'entità del fenomeno delle deposizioni anche in Italia (Mosello 1993; Mosello & Marchetto 1995).

A livello internazionale si possono ricordare le numerose ricerche svolte nell'ambito dei programmi CEE (Mosello 1986; Mosello *et al.* 1991b, 1992a; Marchetto *et al.* 1995a). Fra gli scopi di queste indagini, alcune delle quali ancora in corso, vi è l'individuazione dei processi determinanti la chimica e la biologia dei laghi alpini, soprattutto in relazione all'apporto di inquinanti atmosferici. Inoltre uno degli obiettivi è la raccolta di una serie di dati ed informazioni che permettano di valutare l'evoluzione nel tempo delle caratteristiche chimiche e biologiche di questi laghi remoti, in relazione alle variazioni degli apporti inquinanti e del clima.

Un aspetto di estrema importanza negli studi sulle variazioni chimiche a lungo termine è costituito dai cambiamenti nelle metodologie di analisi. Questi vanno incontro ad un'evoluzione nel tempo, in relazione sia ai progressi strumentali che all'individuazione di nuove tecniche analitiche, quali ad esempio la spettrofotometria di assorbimento atomico, la cromatografia ionica e l'elettroforesi capillare. Le nuove metodiche spesso abbassano il limite di quantificazione della variabile in esame; possono inoltre eliminare o, nel caso peggiore, introdurre errori sistematici; infine diversi possono essere i volumi di campione necessari per l'analisi, variando così il numero di eventi che si possono considerare. Quest'ultimo aspetto è di particolare

importanza nel caso delle deposizioni atmosferiche, dove gli eventi con minore volume presentano spesso caratteristiche chimiche estreme. Pertanto il confronto delle metodologie analitiche costituisce una parte indispensabile dell'analisi del *trend* di dati chimici rilevati in diversi periodi di tempo.

Alla luce di queste considerazioni e dell'importanza che gli studi sulla evoluzione a lungo termine hanno assunto fra le attività dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, questo lavoro si propone tre obiettivi:

- descrivere e documentare le metodologie analitiche utilizzate presso il laboratorio di idrochimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia dalla sua fondazione (1938) ad oggi, verificando la confrontabilità dei risultati ottenuti;
- descrivere le metodologie analitiche attualmente in uso;
- riportare le procedure per il controllo della qualità analitica in uso e descrivere le esperienze di intercalibrazione a cui il laboratorio ha partecipato.

2. SVILUPPO DELLA STRUMENTAZIONE E DELLE METODOLOGIE ANALITICHE

In questo capitolo si fa riferimento unicamente alle metodologie di analisi chimiche adottate presso l'Istituto Italiano di Idrobiologia. Un esame dello sviluppo della strumentazione e delle metodologie avvenute nell'ambito più generale delle ricerche limnologiche, esula dagli scopi di questo lavoro. Per approfondire questo argomento si consiglia la consultazione di letteratura specializzata; un'ulteriore guida per seguire l'evoluzione delle metodiche è costituita dalle diverse edizioni di trattati di metodologie chimiche, quali ad esempio lo "Standard Methods for the examination of water and wastewater", curato dalla American Public Health Association, dalla American Water Works Association e dalla Water Pollution Control Federation, che dalla prima edizione (1917) ad oggi ha avuto 18 edizioni.

Le citazioni che verranno fatte in questo capitolo e nei successivi, riguardanti la strumentazione e le relative ditte produttrici, hanno unicamente lo scopo di documentare le condizioni di lavoro presso il laboratorio chimico del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia. Pertanto esse non implicano alcuna qualità superiore di questi prodotti rispetto ad analoghi presenti sul mercato.

Le fonti consultate per la ricostruzione delle metodiche usate in Istituto sono costituite da alcuni lavori scientifici, che hanno esposto con maggior dettaglio gli aspetti relativi alle metodologie analitiche. È stato inoltre consultato materiale non pubblicato conservato negli archivi ed alcune tesi, custodite presso la biblioteca dell'Istituto. Questo materiale sarà citato nella descrizione dell'evoluzione delle singole metodologie. Di particolare utilità sono risultate le "Relazioni sull'attività scientifica" stese dai diversi direttori che si sono succeduti in questo arco di tempo, che hanno documentato sin dai primi anni le principali tappe e le acquisizioni strumentali dell'Istituto (Baldi 1947, 1949b, 1951; Tonolli 1954, 1956, 1958).

2.1. SVILUPPO DELLA STRUMENTAZIONE

I cambiamenti strumentali più significativi all'interno del laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, si sono avuti sugli spettrofotometri per assorbimento molecolare utilizzati per le analisi nell'ultravioletto e nel visibile e negli spettrofotometri in assorbimento atomico in fiamma e fornetto. In genere questo tipo di strumentazione ha visto dagli anni settanta un progressivo miglioramento nella parte elettro-

nica ed ottica, che ha permesso di arrivare fino a lunghezze d'onda del vicino infrarosso (1100 nm); tali migliorie hanno reso gli strumenti otticamente più stabili e di più facile utilizzo per quanto riguarda le procedure di azzeramento e di lettura in concentrazione. Determinante è stata inoltre l'introduzione del *personal computer* per la gestione dello strumento e l'acquisizione dei dati, condizione che ha notevolmente facilitato le operazioni di calibrazione su più punti e la memorizzazione di tutti i parametri operativi in metodi facilmente richiamabili dall'operatore. Nelle tabelle 2.1 e 2.2 vengono riportate le informazioni relative all'evoluzione della strumentazione utilizzata in spettrofotometria di assorbimento molecolare ed atomico all'interno del laboratorio dell'Istituto.

Tab. 2.1. Strumentazione utilizzata per le analisi colorimetriche nell'ultravioletto e nel visibile.

Periodo di utilizzo	Strumento in uso
1939 - '50	Spettrofotometro Coleman 6A
1950 - '56	Colorimetro Lumetron
1956 - '70	Spettrofotometro UV - Spek (200 - 1000 nm)
1970 - '77	Spettrofotometro Optica CF4 (190 - 1000 nm)
1977 - '87	Spettrofotometro Beckman 25 (190 - 900 nm)
1987 - '92	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 1A (190 - 900 nm)
1992 - '94	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2 (190 - 1100 nm) con software PECSS
1994 - '96	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2 (190 - 1100 nm) con software UV Win Lab

Tab. 2.2. Strumentazione utilizzata per l'analisi spettrofotometrica in assorbimento atomico.

Periodo di utilizzo	Strumento in uso
1973 - '77	Spettrofotometro Perkin Elmer modello 403 con fornetto di grafite HGA 72 utilizzato in fiamma e fornetto
1977 - '80	Spettrofotometro Perkin Elmer modello 460 con fornetto di grafite HGA 76 utilizzato in fiamma e fornetto di grafite
1980 - '91	Spettrofotometro Perkin Elmer modello 460 utilizzato in fiamma
1980 - '96	Spettrofotometro Perkin Elmer modello 2380 con fornetto di grafite HGA 400 ed autocampionatore AS 40 utilizzato in fornetto di grafite

Altri aspetti importanti, benché spesso non riconosciuti, nell'assicurare la qualità analitica di un laboratorio, sono servizi quali la produzione e la distribuzione dell'acqua deionizzata, le operazioni di lavaggio della vetreria e la manutenzione delle bilance analitiche.

L'acqua deionizzata è stata prodotta a partire dal 1957 con un deionizzatore Filtra M7, sostituito nel 1965 dal modello successivo Filtra 500. Per alcune determinazioni particolari, quali ad esempio quelle dei silicati, veniva utilizzata acqua distillata in vetreria di quarzo. Nel 1976 è stato installato il deionizzatore Maior 200 della ditta Elettracqua che permetteva di ottenere acqua deionizzata con conducibilità di circa $1 \mu\text{S cm}^{-1}$. Il deionizzatore era collocato in prossimità del laboratorio di chi-

mica, al primo piano dell'edificio. Nel 1986 lo strumento è stato rinnovato e trasferito in cantina, ampliando la distribuzione dell'acqua deionizzata ad altri laboratori dell'Istituto. A partire dal 1984, presso i laboratori di chimica è stato installato il sistema Milli-Q della ditta Millipore per la produzione di acqua ultrapura filtrata a $0,22 \mu\text{m}$, che permette di ottenere acqua con conducibilità minima di $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$ ($18 \text{M}\Omega$); dal 1995 il sistema Milli-Q è stato affiancato dal sistema Elgastat Maxima Analytical della ditta Elga, che produce anch'esso acqua a $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$ ($18 \text{M}\Omega$) filtrata a $0,1 \mu\text{m}$. L'uso di questi sistemi per la produzione di acqua ultrapura filtrata si è reso necessario per le aumentate esigenze di qualità dell'acqua deionizzata derivanti dall'uso della cromatografia ionica.

Il lavaggio della vetreria e dei recipienti in materiale plastico usati per il campionamento e le analisi è stato eseguito manualmente sino al 1983 per immersione in acido cloridrico circa 1 N o in alcuni casi in miscela cromica; successivamente venivano eseguiti ripetuti risciacqui con acqua deionizzata. Dal 1983 è stata utilizzata la lava-vetreria Miele G7733, utilizzando detersivo esente da fosforo Neodisher UV e neutralizzante Neodisher Z e successivi risciacqui con acqua deionizzata. Per oggetti con forme particolari che rendono poco efficace l'uso della lava-vetreria, si procede ad un lavaggio a mano con detersivo Contrad 2000 della ditta BDH oppure Ausilab 101 della Carlo Erba Reagenti. Dal 1987 è stata aggiunta una nuova lava-vetreria modello SMEG GW 3000.

I recipienti in polietilene e la vetreria utilizzata per l'analisi di metalli pesanti sono conservati immersi in acido nitrico al 2% e prima dell'uso vengono risciacquati a mano con acqua deionizzata ultrapura. Infine l'asciugatura delle bottiglie per i campionamenti e di tutta la vetreria è sempre stata eseguita con stufe a circolazione d'aria forzata.

Sistematicamente vengono eseguite verifiche sulla qualità dell'acqua deionizzata utilizzata nei laboratori; le stesse determinazioni dei bianchi nelle analisi di routine permettono di verificare la qualità dell'acqua deionizzata distribuita. Con l'analisi in cromatografia ionica è inoltre possibile determinare tracce dei principali composti inorganici; dalle analisi eseguite sull'acqua ultrapura si è visto che normalmente le concentrazioni di cloruri, solfati, sodio, potassio, magnesio, azoto nitrico ed ammoniacale sono inferiori a $5 \mu\text{g l}^{-1}$, mentre il calcio è generalmente inferiore a $20 \mu\text{g l}^{-1}$.

Un ulteriore aspetto che incide sulla qualità complessiva delle analisi è costituito dalle bilance analitiche, in quanto la preparazione di alcuni *standard* di calibrazione avviene per pesata (vedi la parte relativa a ciascuna metodica di analisi nel capitolo 3). Le bilance usate a partire dal 1961 sono riportate in tabella 2.3; negli ultimi vent'anni è inoltre sempre stato attivo un contratto di assistenza con le ditte produttrici delle bilance che comprende una visita annuale con verifica e taratura.

Sistematiche revisioni e manutenzioni sono state eseguite anche sulle autoclavi utilizzate per la determinazione del fosforo e dell'azoto totale, in questo caso per norma di legge, trattandosi di strumenti che operano a pressioni superiori a quella atmosferica. Il modello utilizzato a partire dal 1965 è della ditta Fedegari Autoclavi con volume interno di 195 litri, affiancato nel 1979 da un modello della stessa ditta con volume interno di 40 litri; entrambe le autoclavi nel 1988 sono state completa-

mente revisionate nella parte valvole di controllo ed è stata sostituita la parte elettronica per la programmazione dei cicli di lavoro.

Tab. 2.3. Bilance analitiche utilizzate nel laboratorio di chimica.

Periodo di utilizzo	Bilance in uso
1961 - '65	Mettler K 5T
1965 - '71	Mettler E 5
1971 - '84	Mettler H20 T (precisione 0,0001g)
1984 - '95	Mettler AE 163 (precisione 0,00001g)
dal 1996	Sartorius MC 210P (precisione 0,00001g)

Per quanto riguarda i prodotti chimici solidi utilizzati per la preparazione di reagenti e *standard* di calibrazione, va sottolineato che sono sempre stati utilizzati prodotti di grado analitico, quindi con titolo normalmente compreso tra il 99,5 ed il 99,9%. Nel capitolo 3 in alcuni casi sono anche indicate le ditte produttrici di quei composti che hanno dato i migliori risultati analitici per la determinazione in esame (ad esempio il sodio salicilato per la determinazione dell'ammonio o il potassio persolfato per le determinazioni di azoto e fosforo totale). Normalmente l'uso di prodotti chimici diversi da quelli indicati si riflette negativamente sulla qualità dei bianchi e causa una diminuzione della sensibilità del metodo. Nella preparazione dei reagenti, al fine di evidenziare eventuali variazioni causate dall'uso di prodotti chimici diversi o dal cambio di confezioni, viene solitamente riportato all'esterno della confezione la data di apertura. Durante l'uso dei reattivi per ogni determinazione analitica, per diminuire le possibilità di inquinamento, i reagenti vengono preparati, conservati e dosati utilizzando sempre gli stessi contenitori e dosatori.

2.2. SVILUPPO DELLE METODOLOGIE ANALITICHE

Nell'esposizione della evoluzione delle metodologie si è cercato di sintetizzare le informazioni in tabella per chiarezza di esposizione, unendo un breve commento a completamento delle informazioni e per descrivere la strumentazione. Le tabelle riportano, per ciascuna metodica analitica esaminata, il periodo di tempo nel quale è stata adottata, i riferimenti bibliografici dei testi o lavori dai quali essa è stata tratta (bibliografia metodo), il principio fisico-chimico della misura (metodo). In alcuni casi due metodologie sono state contemporaneamente utilizzate per una stessa determinazione; si tratta generalmente dei periodi di tempo che precedono la sostituzione di una tecnica analitica con la nuova, miranti ad assicurare l'attendibilità della nuova metodica e la confrontabilità dei dati prodotti. Questo ultimo aspetto è stato sempre considerato con attenzione, anche alla luce delle caratteristiche di stabilità idrochimica di alcuni laghi, quali ad esempio il Lago Maggiore, che imponevano la massima attenzione nelle variazioni di metodica.

Le tabelle riportano inoltre le stime del limite inferiore di quantificazione (LOQ), definito come la più bassa concentrazione di analita che può essere quantificato in maniera affidabile dal metodo (vedi paragrafo 4.2.2.). Questa valutazione è

stata eseguita, a partire dal 1986 secondo la metodologia IUPAC (A.A.V.V. 1980; Analytical Methods Committee 1987), che lo calcola come:

$$\text{LOQ} = S_c - S_b \geq K_d \times \text{D.S.}$$

dove S_c e S_b sono rispettivamente i segnali misurati per il campione ed il bianco, D.S. è la deviazione *standard* ottenuta sul bianco e K_d è una costante arbitrariamente posta uguale o superiore a 10. Per gli anni precedenti al 1986 il valore di LOQ è stato stimato pari alla concentrazione del più basso *standard* utilizzato per la definizione della retta di taratura.

Le tabelle contengono informazioni sulla stima sperimentale della ripetibilità, valutata eseguendo più misure (10÷30) in giorni diversi su una stessa soluzione *standard*, generalmente costituita da una acqua naturale opportunamente stabilizzata, calcolando quindi la deviazione *standard* (D.S.) attorno alla media dei risultati ed il relativo coefficiente di variazione percentuale (C.V.%) rispetto alla media; molti dati di ripetibilità derivano inoltre dall'utilizzo delle carte di controllo preparate ed analizzate come descritto nel paragrafo 4.2.3. Sono infine riportate le fonti dalle quali sono state tratte le indicazioni riguardanti le modalità di utilizzo delle metodiche in Istituto (indicate come Bibliografia metodo) e, quando disponibili, i dati di precisione (vedi Bibliografia riferimento).

La rassegna dei metodi non ha considerato l'analisi del biossido di carbonio, sporadicamente utilizzata sino al 1960 e le analisi della domanda chimica di ossigeno (C.O.D.) e dell'acido solfridico, utilizzate limitatamente ad un ridotto numero di campioni rispettivamente sino al 1975 ed al 1985. Informazioni relative alla prima determinazione sono riportate da Ferrari (1948) e Baldi *et al.* (1953), mentre dettagli sulla misura del C.O.D. sono riportati da Mosello (1973) e Tartari (1980).

2.2.1. OSSIGENO DISCIOLTO

La determinazione dell'ossigeno disciolto è rimasta sostanzialmente invariata nel corso dei circa cinquanta anni di attività dell'Istituto (Tab. 2.4.), basandosi sempre sulla titolazione iodometrica secondo Winkler (1888). La modificazione all'azide (A.P.H.A. 1955), utilizzata dal 1960, è di poca rilevanza nel caso delle acque prevalentemente esaminate (laghi subalpini ed alpini, fiumi) in quanto queste presentano in genere una quantità trascurabile di sostanze riducenti, quali nitriti o ferro bivalente.

Le variazioni più significative nella pratica di laboratorio hanno riguardato le burette utilizzate per la titolazione; sino al 1986 sono state utilizzate burette in vetro da 10 ml, sostituite nello stesso anno con burette a pistone di tipo meccanico con lettura digitale. Le caratteristiche tecniche di queste burette sono riportate in tabella 2.5.

Tab. 2.4. Metodologie utilizzate per la determinazione dell'ossigeno disciolto (mg l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947 - '60	(1)	Titolazione secondo Winkler	0,5				(2)
1960 - '75	(3)	Titolazione secondo Winkler	0,5				(4)
1975 - '96	(5)	Titolazione secondo Winkler	0,5	9,3	0,17	1,8	

(1) Ellis *et al.* 1948; (2) Ferrari 1948; (3) A.P.H.A. 1955; (4) Vollenweider 1962; (5) Golterman 1969.

Tab. 2.5. Caratteristiche delle burette utilizzate per la determinazione dell'ossigeno disciolto.

Periodo di utilizzo	Tipo di buretta	Capacità (ml)	Risoluzione (ml)	Ripetibilità		Accuratezza (%)
				3 ml (%)	10 ml (%)	
1960 - '86	Buretta graduata classe A in vetro	10	0,02	0,2	0,1	
1986 - '90	Buretta a pistone Brand a lettura digitale	25	0,01	0,7	0,3	0,3
1991 - '96	Buretta a pistone Schott Gerate T 80 a lettura digitale	10	0,01	0,05	0,02	0,1

2.2.2. MISURA DEL PH

La variazione più significativa intervenuta nelle misure del pH riguardano il passaggio dalle determinazioni colorimetriche a quelle potenziometriche (Tab. 2.6). Una descrizione delle metodologie di misura con indicatori è riportata da Ellis *et al.* (1948) e da Maldura (1929). L'interesse assunto dalla misura del pH rispetto al fenomeno dell'acidificazione delle acque superficiali ha portato a numerosi lavori di confronto fra le diverse metodologie (per esempio Haines 1981; Blakar & Digernes 1984; Kramer *et al.* 1986). Gran parte di questi lavori evidenziano i limiti delle determinazioni con indicatori, sia per questioni di ordine teorico, legato al fatto che l'aggiunta di indicatore può alterare il valore di pH in acque a bassa forza ionica, sia di ordine pratico. L'aspetto legato alla bassa concentrazione ionica non è importante nel caso delle acque del Lago Maggiore, mentre può assumere qualche rilevanza per quelle del Lago di Mergozzo.

La prima metodica utilizzata in Istituto è stata la determinazione colorimetrica con indicatori della serie dei nitrofenoli di Michaelis, utilizzando un comparatore di Hellige (Ferrari 1948; Baldi *et al.* 1953). Successivamente è stata usata una titolazione con fenilporpora, con comparatore ottico di Lovibond (Baldi *et al.* 1953). La determinazione potenziometrica del pH è stata adottata a partire dal 1956 in uno studio sul Lago Maggiore e sui suoi fiumi tributari (dati non pubblicati, archivio Istituto).

I dati ottenuti in Istituto per potenziometria e colorimetria sono da considerarsi scarsamente confrontabili, per i motivi generali sopra accennati.

Tab. 2.6. Metodologie utilizzate per la determinazione del pH.

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	Strumento	Stima precisione	Bibliografia riferimento
1939 - '48	(1-2)	Colorimetria con indicatori a serie dei nitrofenoli e di Michaelis	Comparatore ottico di Hellige		(3)
1949 - '50	(1)	Titolazione con indicatore fenolporpora	Comparatore ottico Loviebond		(4)
1957 - '60	(5)	Potenziometria	pHmetro Beckman	0,2 u	(6)
1961 - '67	(5)	Potenziometria	pHmetro PHM 24 Radiometer	0,05 u	(6)
1961 - '73	(5)	Potenziometria	TTT 1c Radiometer		(7)
1973 - '79	(8)	Potenziometria	PHM 61 e PHM 29 Radiometer		(9)
1973 - '81	(8)	Potenziometria	TTT 2b Radiometer		
1981 - '95	(10)	Potenziometria	PHM 84 Radiometer	0,02	
1995 - '96	(11)	Potenziometria	PHM 93 Radiometer	0,02	

(1) Maldura 1929; (2) Ellis *et al.* 1948; (3) Ferrari 1948; (4) Baldi *et al.* 1953; (5) A.P.H.A. 1955; (6) Vollenweider 1963; (7) Bonomi & Gerletti 1967; (8) A.P.H.A. 1971; (9) Mosello 1973; (10) A.P.H.A. 1976; (11) A.P.H.A. 1992

2.2.3. CONDUCIBILITÀ ELETTRICA

Le prime misure di conducibilità eseguite sistematicamente in Istituto hanno riguardato le acque del Lago Maggiore e sono state eseguite nel 1956 da Corbella (dati non pubblicati, archivio Istituto) (Tab. 2.7.). Tale misura non figura infatti nelle ricerche idrochimiche svolte nel 1953-54 da Corbella *et al.* (1956). Dal 1960 le misure di conducibilità vengono estese agli altri laghi subalpini (Vollenweider 1965) e svolte con regolarità sul Lago d'Orta (Vollenweider 1963) e sul Lago Maggiore (Bonomi *et al.* 1970). Inoltre dal 1960 la conduttometria viene utilizzata come metodica per la determinazione dell'alcalinità e dei cloruri (Vollenweider 1962); questo indica una notevole attenzione prestata agli aspetti relativi alla strumentazione ed alla metodica di misura della conducibilità.

Tab. 2.7. Metodologie utilizzate per la determinazione della conducibilità elettrica.

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	Strumento	Stima precisione	Bibliografia riferimento
1954 - '59	(1-2)	Ponte di Kolrausch a 18°C			(3)
1960 - '63	(1-2)	Ponte di Kolrausch a 18°C	S.I.S.	1 $\mu\text{S cm}^{-1}$	(4)
1961 - '73	(1-2)	Ponte di Kolrausch a 18°C	CDM 2e Radiometer	1 $\mu\text{S cm}^{-1}$	
1973 - '82	(5)	Ponte di Kolrausch a 18°C	CDM 3c Radiometer	1 $\mu\text{S cm}^{-1}$	(6)
1982 - '94	(7)	Ponte di Kolrausch a 18°C	CDM 83 Radiometer	0,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$	
1995 - '96	(8)	Ponte di Kolrausch a 20°C	CDM 83 Radiometer	0,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$	
1996	(8)	Ponte di Kolrausch a 20°C	CDM 230 Radiometer	0,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$	

(1) Ellis *et al.* 1948; (2) Britton 1934; (3) Corbella *et al.* 1956; (4) Vollenweider 1963; (5) A.P.H.A. 1971; (6) Mosello 1973; (7) A.P.H.A. 1976; (8) A.P.H.A. 1992.

È da segnalare negli anni compresi tra il 1970 e il 1972 una serie di misure di conducibilità errate, verosimilmente dovute ad un mancato controllo della costante

di cella del conduttimetro. Tale errore sistematico, bene evidenziato dai valori rilevati in questo periodo sulle acque del Lago Maggiore (Bonomi *et al.* 1970), venne successivamente corretto.

La temperatura di riferimento per l'espressione dei valori di conducibilità è stata di 18 °C sino al 31 Dicembre 1994. La correzione per la temperatura era effettuata per lettura della temperatura del campione durante la misura e successiva correzione sulla base dei coefficienti riportati da Rodier (1971). Con l'adozione del conduttimetro Radiometer CDM 84, nel 1981, la correzione della temperatura è stata effettuata automaticamente dallo strumento con correzione del 2,3% per grado centigrado di scostamento dalla temperatura di riferimento. Dal 1 Gennaio 1995 la temperatura di riferimento è stata portata a 20 °C, per uniformità con il valore prevalentemente utilizzato in altri Paesi europei. Per una discussione sulla validità e applicabilità delle correzioni per la temperatura ai diversi tipi di acque si rimanda al paragrafo 4.2.8.

2.2.4. ALCALINITÀ TOTALE

Le prime determinazioni sono state effettuate nel marzo-aprile 1943 e nel settembre 1946 sulle acque del Lago Maggiore, il metodo utilizzato era la titolazione acidimetrica con indicatore metilarancio (Pirocchi 1947) (Tab. 2.8). Altre misure sono state eseguite nel 1949-50 nel corso dello studio comparato sui laghi Mergozzo e Maggiore (Baldi *et al.* 1953), utilizzando acido cloridrico 0,1 N ed indicatore metil-porpora di Fleisher. Numerose altre determinazioni sono state eseguite negli anni cinquanta (Corbella *et al.* 1956). Nel 1960 Vollenweider (1962) mette a punto la determinazione dell'alcalinità per titolazione acidimetrica con rilevamento del punto finale con il metodo conduttometrico. Questa metodica è stata utilizzata fino al 1974, successivamente si è passati alla titolazione potenziometrica a due punti finali (pH 4,5 e pH 4,2) secondo A.P.H.A. (1971) o Rodier (1971) considerata più veloce e adeguata all'analisi di routine.

Il metodo a due punti finali è stato utilizzato fino ad oggi sui campioni aventi alcalinità superiore a 0,15 meq l⁻¹ (acque dei laghi subalpini e di fiumi); per i campioni con valori di alcalinità inferiori (acque di pioggia o laghi alpini) la determinazione su due punti finali può non essere sufficientemente attendibile, così dal 1985 si è passati dapprima alla metodica di Henriksen (1982) poi al metodo di Gran (1952) più adatto a valori di alcalinità compresi tra 0,000÷0,150 meq l⁻¹ ed in grado di determinare anche l'acidità. Il passaggio al metodo di Gran, conosciuto già da più di trent'anni, ma mai applicato all'analisi di routine a causa della laboriosità della determinazione, è stato reso possibile dall'introduzione dell'uso del *personal computer* per la gestione del sistema di titolazione (buretta e pHmetro). La tabella 2.9, che riporta l'evoluzione della strumentazione utilizzata per le titolazioni potenziometriche e conduttometriche, mostra che dal 1984 il titolatore è stato affiancato al *personal computer* e che, con la stesura di programmi finalizzati alla determinazione dell'alcalinità, si è potuto passare all'analisi di routine con il metodo di Gran. Per una descrizione approfondita delle metodiche per la determinazione dell'alcalinità e per una discussione degli errori sistematici associati ad alcune tecniche di misura si rimanda a Serrini *et al.* (1995).

Tab. 2.8. Metodologie utilizzate per la determinazione dell'alcalinità (meq l⁻¹).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947 - '48	(1)	Titolazione con acido cloridrico, indicatore metilarancio					(2)
1949 - '56		Titolazione con acido cloridrico, indicatore metilporpora di Fleisher					(3-4)
1960 - '77	(5)	Titolazione conduttometrica	0,05	0,40 0,46 0,58 0,65	0,004 0,004 0,007 0,008	1,0 0,9 1,2 1,2	(6)
1974 - '96	(7-8)	Titolazione potenziometrica punti finali pH 4,5 e 4,2	0,10	0,50 1,06 2,41 0,008 0,171 0,539 0,746 1,894 2,750	0,005 0,007 0,01 0,004 0,004 0,005 0,030 0,018	1,0 0,7 0,4 2,1 0,7 0,7 1,6 0,6	(9)
1985 - '91	(10)	Titolazione potenziometrica punto finale pH 4,5	0,003	0,055	0,004	7,3	
1992 - '96	(11)	Titolazione potenziometrica metodo di Gran	<0,001	0,037 0,539 1,924	0,002 0,004 0,026	5,6 0,7 1,4	

(1) Ellis *et al.* 1948; (2) Ferrari 1948; (3) Baldi *et al.* 1953; (4) Corbella *et al.* 1956; (5) Vollenweider 1962; (6) Mosello 1973; (7) A.P.H.A. 1971; (8) Rodier 1971; (9) De Giuli 1979; (10) Henriksen 1982; (11) Gran 1952.

Tab. 2.9. Strumentazione utilizzata per le titolazioni potenziometriche e conduttometriche.

Periodo di utilizzo	Strumento in uso
1961 - '73	Titolatore Radiometer TTT 1c composto da titolatore TTT 1, buretta a siringa SBU 1 e registratore SBR2. Conduttimetro Radiometer CDM 2c
1973 - '82	Titolatore Radiometer TTT 2b composto da titolatore TTT 2, buretta automatica ABU 12 e registratore SBR3. Conduttimetro Radiometer CDM 3c
1982 - '84	Titolatore Radiometer RTS 822 composto da pHmetro PHM 84, buretta automatica ABU 80, registratore REC 80 ed interfaccia di titolazione TTT 80
1984 - '90	Titolatore Radiometer composto da pHmetro PHM 84, buretta automatica ABU 80 collegati al <i>personal computer</i> Hewlett Packard HP 85; programmi analitici in linguaggio HP, prodotti specificatamente dai tecnici dell'Istituto Italiano di Idrobiologia
1990 - '95	Titolatore Radiometer composto da pHmetro - buretta automatica ABU 91 collegato al <i>personal computer</i> IBM PS2 tramite drive di comunicazione ABU 9X; programmi analitici in linguaggio Microsoft Quick Basic 4.5, prodotti specificatamente dai tecnici dell'Istituto Italiano di Idrobiologia
1995 - '96	Titolatore Radiometer composto da pHmetro - buretta automatica ABU 91 collegato al <i>personal computer</i> IBM PS2 tramite drive di comunicazione ABU 9X; programma analitico wAlk in linguaggio Microsoft Visual Basic 3 in ambiente Windows, prodotto specificatamente dai tecnici dell'Istituto Italiano di Idrobiologia

2.2.5. SOLFATI

La prima metodologia per la determinazione dei solfati nel laboratorio chimico dell'Istituto (Tab. 2.10.) è stata messa a punto da Vollenweider (1962), che modificava quella proposta da Meckeret (1955). L'analisi prevedeva il passaggio del campione attraverso una resina cationica e la successiva misura della conducibilità dell'eluato contenente prevalentemente acidi solforico, nitrico e cloridrico. Il valore di conducibilità veniva quindi corretto per il contributo dovuto agli ioni idrogeno, cloruro, e nitrato, e sulla base della conducibilità equivalente di questi ioni, opportunamente corretta per la temperatura. La concentrazione di solfato veniva quindi calcolata con un normogramma dal valore di conducibilità corretto e della sua conducibilità equivalente. Il metodo risultava piuttosto complesso, anche se la precisione era indubbiamente più elevata di quello dei metodi turbidimetrico e gravimetrico, per il campo di concentrazione riscontrato nelle acque superficiali.

Tab. 2.10. Metodologie utilizzate per la determinazione dei solfati (mg l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1960 - '77	(1)	Titolazione conduttometrica	5			3,0	(1)
1977 - '83	(2)	Turbidimetrico	5	2,35	0,12	5,1	
				8,06	0,13	1,6	
				40,3	0,13	0,3	
1984 - '96	(3-4-5)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,02	1,03	0,03	3,0	(6-7)
				4,66	0,08	1,7	
				9,99	0,06	0,6	
				24,8	0,3	1,2	
				31,9	0,3	1,4	

(1) Vollenweider 1962; (2) I.R.S.A. 1976; (3) A.S.T.M. 1984; (4) A.P.H.A. 1985; (5) Weiss 1986; (6) Mosello *et al.* 1989d; (7) Tartari *et al.* 1995

Nel 1977 è stata messa a punto la determinazione turbidimetrica, secondo la metodologia proposta da IRSA (1976). Questa presentava il vantaggio di essere applicabile ad un numero molto più elevato di campioni, con una buona precisione per concentrazioni superiori ai $10 \text{ mg SO}_4 \text{ l}^{-1}$. I risultati erano meno soddisfacenti sulle acque meteoriche e sui laghi alpini, a causa delle basse concentrazioni. L'introduzione della cromatografia ionica (1984) ha risolto anche questi problemi, abbassando il limite di quantificazione e migliorando la ripetibilità delle misure; l'evoluzione delle condizioni analitiche utilizzate in cromatografia ionica è riportata in tabella 2.13, mentre alcuni valori di ripetibilità, a diverse concentrazioni, sono presentate in tabella 2.10.

2.2.6. NITRATI

La determinazione dei nitrati, così come quella dei sali di ammonio, ha ricevuto grande attenzione sin dai primi anni di attività dell'Istituto a causa degli studi eseguiti sul Lago d'Orta. Le metodologie utilizzate sono riportate in tabella 2.11. La confrontabilità dei dati ottenuti con le prime metodiche utilizzate è difficile da valutare, se non confrontando, a partire dal 1953, le concentrazioni misurate sulle ac-

riche e laghi, in modo da comprendere l'intero campo di concentrazioni normalmente misurate, hanno evidenziato un ottimo accordo (vedi paragrafo 4.2.6.). L'evoluzione delle condizioni analitiche utilizzate in cromatografia ionica è riportata in tabella 2.13.

2.2.7. CLORURI

Le prime misure analiticamente attendibili dei cloruri sono state effettuate nel 1960 (Tab. 2.12.), con una metodica che utilizzava la variazione di conducibilità nel corso di una titolazione con nitrato di argento (Vollenweider 1962). Questa metodica è senza dubbio più precisa della titolazione argentometrica con bicromato di potassio come indicatore o secondo Mohr (A.P.H.A. 1960), ma richiede un titolatore automatico con buone caratteristiche tecniche. Lo strumento a quel tempo utilizzato è riportato in tabella 2.9.

Tab. 2.12. Metodologie utilizzate per la determinazione dei cloruri (mg l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947	(1)	Titolazione con nitrato d'argento (metodo di Mohr)					(2)
1960 - '67	(3)	Titolazione conduttometrica	0,5		0,1		(3)
1967 - '73	(4)	Titolazione con nitrato d'argento (metodo di Mohr)					(5)
1973 - '75	(3)	Titolazione conduttometrica	0,5	2,5 5,0		10,0 10,0	(6)
1977 - '81	(7)	Colorimetria, metodo cinetico con formazione del complesso con il tallio	0,04				
1982 - '84	(8)	Potenziometria con elettrodo ione selettivo	0,10	0,12 1,11 3,37 9,92	0,02 0,07 0,20 0,35	16,7 6,3 5,9 3,5	
1984 - '96	(9-10-11)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,02	0,20 0,48 0,96 1,99 2,93	0,02 0,01 0,03 0,02 0,08	8,1 2,8 3,1 1,0 2,7	(12-13)

(1) Ellis *et al.* 1948; (2) Ferrari 1948; (3) Vollenweider 1962; (4) A.P.H.A. 1960; (5) Bonomi & Gerletti 1967; (6) Mosello 1973; (7) Mentasti & Pellizzetti 1975; (8) Migdley & Torrance 1978; (9) A.S.T.M. 1984; (10) A.P.H.A. 1985; (11) Weiss 1986; (12) Mosello *et al.* 1989d; (13) Tartari *et al.* 1995

Nel 1977 si è introdotto un nuovo metodo che utilizza il complesso stabile formato da cloruri (e bromuri) con il tallio (III), inibendo la reazione di ossidazione del 4,4 diidrossidifenile a difenochinone (Mentasti & Pellizzetti 1975). Il metodo presenta il vantaggio di un basso LOQ, ma richiedeva una ottima manualità, sia nella aggiunta della soluzione di tallio, eseguita con autoburetta di precisione, sia nella lettura spettrofotometrica, da effettuarsi immediatamente dopo l'aggiunta.

Di più facile esecuzione e di confrontabile precisione è risultata la misura eseguita con elettrodo ionoselettivo per cloruri, eseguita a partire dal 1982. La precisione delle misure è stata migliorata aggiungendo al campione una soluzione tam-

pone di acetato di ammonio a pH 4,7 e proteggendo dalla luce i recipienti di polietilene dove veniva eseguita la misura.

Dal 1984 le misure vengono eseguite in cromatografia ionica; l'evoluzione delle condizioni analitiche utilizzate è riportata in tabella 2.13.

Tab. 2.13. Colonne di separazione, eluenti e sistema di soppressione utilizzati per la determinazione degli anioni in cromatografia ionica (colonne e soppressori Dionex).

Periodo di utilizzo	Colonne di separazione	Eluente
1984 - '86	AG4 - AS4	carbonato di sodio 1,98 mM bicarbonato di sodio 2,52 mM flusso 2 ml min ⁻¹
1986 - '96	AG4A - AS4A	carbonato di sodio 1,8 mM bicarbonato di sodio 1,7 mM flusso 2 ml min ⁻¹
1996	AG14 - AS14	carbonato di sodio 4,8 mM bicarbonato di sodio 0,6 mM flusso 1,3 ml min ⁻¹
Soppressore chimico		Rigenerante
1984 - '85	AFS	acido solforico 50 mM
1985 - '92	AMMS	acido solforico 25 mM
1993 - '96	ASRS	autorigenerazione elettrochimica

2.2.8. CALCIO, MAGNESIO, SODIO E POTASSIO

Nel periodo fra il 1947 ed il 1973 calcio e magnesio sono stati determinati per titolazione complessometrica, utilizzando EDTA (Tab. 2.14. e 2.15.). L'unico riferimento bibliografico preciso sui dettagli della metodologia viene da Vollenweider (1963), che cita una precisione di 0,1 mg l⁻¹ sia per il calcio che per il magnesio. Le misure venivano comunque eseguite sporadicamente, con la sola eccezione dello studio sull'idrochimica dei laghi insubrici (Vollenweider 1965), che ha considerato le composizioni ioniche di oltre 20 laghi.

Tab. 2.14. Metodologie utilizzate per la determinazione del calcio (mg l⁻¹).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1960 - '73	(1)	Titolazione con EDTA			0,1		(2)
1973 - '90	(3-4)	Spettrofotometria in assorbimento atomico	0,05	1,01 10,0	0,03 0,06	3,1 0,6	(5)
1990 - '96	(6)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,03	11,1 0,54 1,42 2,60 12,8 19,9	0,55 0,03 0,03 0,10 0,24 0,46	5,0 5,6 2,3 3,9 1,9 2,3	(7)

(1) A.P.H.A. 1955 (2) Vollenweider 1963; (3) Slavin 1969; (4) Perkin Elmer 1971; (5) Baudo *et al.* 1979b; (6) Weiss 1986; (7) Tartari *et al.* 1995.

Più scarse le misure di sodio e potassio: ancora una volta il primo riferimento è di Vollenweider (1963), che si limita ad indicare la metodologia spettrofotometrica e una precisione di 0,1 mg l⁻¹ (Tab. 2.16. e 2.17.).

Tab. 2.15. Metodologie utilizzate per la determinazione del magnesio (mg l⁻¹).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1960 - '73	(1)	Titolazione con EDTA			0,1		(2)
1973 - '90	(3-4)	Spettrofotometria in assorbimento atomico	0,01	1,006	0,005	0,5	(5)
				1,58	0,02	1,3	
1990 - '96	(6)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,01	0,29	0,008	2,9	(7)
				1,68	0,03	2,0	
				2,94	0,07	2,4	

(1) A.P.H.A. 1955 (2) Vollenweider 1963; (3) Slavin 1969; (4) Perkin Elmer 1971; (5) Baudo *et al.* 1979b; (6) Weiss 1986; (7) Tartari *et al.* 1995.

Tab. 2.16. Metodologie utilizzate per la determinazione del sodio (mg l⁻¹).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1960 - '73	(1)	Spettrofotometria in emissione			0,1		(2)
1973 - '90	(3-4)	Spettrofotometria in assorbimento atomico	0,03	0,025	0,004	14,2	(5)
				0,051	0,001	2,0	
				4,85	0,13	2,6	
1990 - '96	(6)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,01	0,19	0,02	12,6	(7)
				1,04	0,03	2,9	
				3,98	0,10	2,5	
				5,00	0,08	1,5	

(1) A.P.H.A. 1955 (2) Vollenweider 1963; (3) Slavin 1969; (4) Perkin Elmer 1971; (5) Baudo *et al.* 1979b; (6) Weiss 1986; (7) Tartari *et al.* 1995.

Tab. 2.17. Metodologie utilizzate per la determinazione del potassio (mg l⁻¹).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1960 - '73	(1)	Spettrofotometria in emissione			0,1		(2)
1973 - '90	(3-4)	Spettrofotometria in assorbimento atomico	0,08	0,50	0,03	6,7	(5)
				1,01	0,03	3,3	
1990 - '96	(6)	Cromatografia ionica con soppressione chimica Dionex	0,01	0,12	0,014	11,7	(7)
				0,28	0,012	4,2	
				1,68	0,03	2,0	
				2,95	0,06	2,0	

(1) A.P.H.A. 1955 (2) Vollenweider 1963; (3) Slavin 1969; (4) Perkin Elmer 1971; (5) Baudo *et al.* 1979b; (6) Weiss 1986; (7) Tartari *et al.* 1995.

Il numero e la qualità delle misure migliora sostanzialmente dal 1973, con l'utilizzo della spettrofotometria in assorbimento atomico, che resta l'unica tecnica utilizzata sino al 1990. La successione degli strumenti usati è riportata in tabella 2.2.

A partire dal 1989-90 tutte le determinazioni sono state eseguite per cromatografia ionica, dopo aver effettuato un accurato esame della confrontabilità con i risultati ottenuti con il metodo in spettrofotometria d'assorbimento atomico (vedi paragrafo 4.2.6.). La precisione delle due tecniche di analisi è risultata praticamente uguale; inoltre la cromatografia ionica, con l'impostazione del lavoro di analisi adottato dal 1990, ha reso possibile di ottenere in due o tre giorni le concentrazioni di anioni e cationi che, unitamente ai valori di pH, conducibilità ed alcalinità, consentono il controllo della qualità dei risultati utilizzando i metodi del bilancio ionico e del confronto fra conducibilità misurata e calcolata (vedi paragrafo 4.2.7.). L'evoluzione delle condizioni analitiche utilizzate in cromatografia ionica è riportata in tabella 2.18.

Tab. 2.18. Colonne di separazione, eluenti e sistema di soppressione utilizzati per la determinazione dei cationi in cromatografia ionica (colonne e soppressori Dionex).

Periodo di utilizzo	Colonne di separazione	Eluente
1990 - 6/'92	Fast I e II	acido cloridrico 15 mM acido diammino propionico 0,23 mM flusso 2 ml min ⁻¹
6/1992 - '96	CG12 - CS12	Acido metansolfonico 20 mM flusso 2 ml min ⁻¹
1996	CG12A - CS12A	Acido metansolfonico 20 mM flusso 2 ml min ⁻¹
	Soppressore chimico	Rigenerante
1990 - '92	CMMS	tetrabutylammonio idrossido 100 mM
1993 - '96	CSRS	autorigenerazione elettrochimica

2.2.9. AMMONIO

Sino al 1978 la determinazione dell'ammonio è stata eseguita con la reazione di Nessler, naturalmente con precisione diversa rispetto alle prime determinazioni eseguite dal Baldi (1949c) sulle acque del Lago d'Orta (Tab. 2.19.). La metodica all'indofenolo, introdotta nel 1978, ha il vantaggio di una maggiore sensibilità, senza comportare aggravamenti nella manualità. Nel 1984 questo metodo è stato poi ottimizzato con l'utilizzo del sodio dicloro isocianurato come fonte di cloro attivo e del sodio salicilato in sostituzione del fenolo; l'utilizzo di questi reagenti ha permesso di passare da una frequenza di calibrazione settimanale ad annuale, grazie alla maggiore precisione e stabilità nel dosaggio del cloro attivo. Quest'ultimo metodo colorimetrico è stato poi adattato alla *Flow Injection Analysis* (FIA) nel 1991, automatizzando in gran parte la determinazione ed aumentando così il numero di campioni analizzabili. Dal 1993 la determinazione dell'ammonio viene eseguita anche in cromatografia ionica (IC), grazie ad una ottimizzazione del metodo che ha permesso di ottenere una buona confrontabilità dei risultati (vedi paragrafo 4.2.6.).

Tab. 2.19. Metodologie utilizzate per la determinazione dell'ammonio (mg N l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947 - '60	(1)	Colorimetria, metodo Nessler					(2)
1960 - '78	(3)	Colorimetria, metodo Nessler			0,02		(4)
	(5)	Colorimetria, metodo Nessler	0,30	0,32	0,02	6,3	(6)
				0,44	0,017	3,9	
				1,05	0,026	2,5	
				1,58	0,027	1,7	
1978 - '83	(7)	Colorimetria, metodo indofenolo (sodio ipoclorito e fenolo)	0,020	0,06	0,005	7,8	(8)
				0,63	0,014	2,2	
				2,46	0,049	2,0	
1983 - '96	(9)	Colorimetria, metodo indofenolo (sodio dicloro isocianurato e sodio salicilato)	0,020	0,046	0,004	8,2	(10)
				0,472	0,008	1,7	
				2,053	0,018	0,9	

(1) Ellis *et al.* 1948; (2) Ferrari 1948; (3) A.P.H.A. 1955; (4) Vollenweider 1963; (5) A.P.H.A. 1971; (6) Mosello 1973; (7) Koroleff 1970; (8) De Giuli 1979; (9) Fresenius *et al.* 1988; (10) Mosello *et al.* 1989d.

Attualmente pur con la possibilità di determinare l'ammonio con le metodiche FIA ed IC, le determinazioni di routine vengono eseguite con il metodo colorimetrico manuale in uso dal 1984; il metodo FIA viene utilizzato solo in occasione di analisi su un elevato numero di campioni provenienti dallo stesso ambiente, mentre il metodo IC viene utilizzato nell'analisi di campioni con volume ridotto (minore di 100 ml).

Gli spettrofotometri utilizzati per la determinazione manuale dell'ammonio nei vari periodi di tempo sono elencati in tabella 2.1.

2.2.10. NITRITI

Le determinazioni si sono sempre basate sulla reazione fra l'acido solfanilico e l'alfa-naftilammina, che presenta ottime caratteristiche di sensibilità e precisione; è ormai da circa cinquant'anni che questa metodica è ritenuta la più adatta a questa determinazione. Le principali informazioni disponibili sono riportate in tabella 2.20.

2.2.11. AZOTO TOTALE

Precedentemente al 1978 l'azoto totale era calcolato per somma dell'azoto nitroso, nitrico e Kjeldahl; quest'ultima determinazione è poco precisa a basse concentrazioni, tanto che i valori di azoto Kjeldahl e totale non sono mai stati utilizzati in pubblicazioni. Una più precisa determinazione dell'azoto totale è stata messa a punto nel 1978 (Tab. 2.21.), principalmente per permettere la valutazione dell'azoto organico, per differenza con le tre forme inorganiche misurate. Il principio si basa su una

ossidazione condotta in autoclave a 120°C (2 atmosfere di pressione) utilizzando persolfato di potassio in ambiente basico per sodio idrossido; queste condizioni permettono la completa ossidazione dei composti ammidici e dell'ammonio, che invece si ossidano solo in maniera incompleta in ambiente acido (D'Elia *et al.* 1977). I nitrati prodotti dall'ossidazione erano quindi determinati come nitriti, previa riduzione attraverso colonne contenenti cadmio granulare, trattato mediante deposizione di rame metallico da una soluzione di solfato di rame (II).

Tab. 2.20. Metodologie utilizzate per la determinazione dei nitriti ($\mu\text{g N l}^{-1}$).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947	(1)	Colorimetria diazoreagente					(2)
1960 - '96	(3)	Colorimetria diazoreagente	3	8	0,8	10,0	(4)
	(5-6)			93	2	2,2	(7)

(1) Rider & Mellon 1946; (2) Ferrari 1948; (3) A.P.H.A. 1955; (4) Bonomi & Gerletti 1967; (5) A.P.H.A. 1971; (6) A.P.H.A. 1981; (7) Mosello 1973.

Tab. 2.21. Metodologie utilizzate per la determinazione dell'azoto totale (mg N l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1978 - '82	(1)	Idrolisi basica a 120 °C		0,81	0,058	7,2	(2)
				1,98	0,099	5,0	
				3,74	0,127	3,4	
				6,56	0,197	3,0	
1982 - '96	(3-4)	Idrolisi con scansione di pH da basico ad acido a 120 °C	0,30	0,54	0,03	5,6	(5)
		cuvetta passo ottico 1 cm		1,21	0,04	3,3	
				4,87	0,07	1,4	
		cuvetta passo ottico 2 cm	0,20	0,84	0,03	3,6	
				0,92	0,03	3,1	

(1) D'Elia *et al.* 1977; (2) De Giulii 1979; (3) Valderrama 1981; (4) A.P.H.A. 1981; (5) Vaccarone 1983.

Dal 1982 la miscela ossidante persolfato di potassio - sodio idrossido, con la quale si eseguiva la digestione in autoclave, è stata sostituita dalla soluzione ossidante di persolfato di potassio, acido borico e sodio idrossido (Valderrama 1981). Questa soluzione ha la caratteristica di permettere la simultanea ossidazione dei composti contenenti azoto e fosforo grazie alla scansione da pH 9,7 a pH 5-6; la successiva determinazione dei nitrati viene effettuata sul campione ossidato, dopo acidificazione con acido solforico approssimativamente a pH 2, con lettura diretta dello ione nitrato alla lunghezza d'onda di 220 nm (A.P.H.A. 1981). I nitrati possono essere determinati direttamente solo dopo l'ossidazione che porta alla totale eliminazione dei composti organici che, a 220 nm, interferirebbero nella determinazione, a causa del loro elevato assorbimento. Per i dettagli su questo metodo attualmente in uso vedi il paragrafo 3.6.7, mentre la tabella 2.21. riporta i dati sulla precisione dei metodi fino ad ora descritti. Dal 1994 la lettura a 220 nm può essere eseguita anche in *Flow Injection Analysis* ma l'utilizzo viene limitato alle analisi ese-

guite su un elevato numero di campioni provenienti dallo stesso ambiente, e non per campioni provenienti da laghi con lunghe serie storiche di dati.

2.2.12.FOSFORO REATTIVO AL MOLIBDATO

I primi dati attendibili di fosforo reattivo sono del 1956-57 (Corbella, dati non pubblicati), benché siano state eseguite misure anche precedentemente. Questi dati sono stati ottenuti con il metodo al molibdato, usando cloruro stannoso come riducente. Dal 1960 all'inizio degli anni settanta si è continuato ad utilizzare il metodo con riduzione al cloruro stannoso secondo le indicazioni di A.P.H.A. 1955 e 1960. Dal 1973 si è usato l'acido L-ascorbico come riducente (Strickland & Parson 1968). La confrontabilità fra i dati prodotti in anni diversi è in genere buona, in quanto l'osservazione continua delle concentrazioni del Lago Maggiore e di altri laghi profondi subalpini ha costituito una sorta di controllo interno di qualità.

Le caratteristiche della metodica sono espone in tabella 2.22.

Tab. 2.22. Metodologie utilizzate per la determinazione del fosforo reattivo ($\mu\text{g P l}^{-1}$).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento	
1960 - '67	(1-2)	Colorimetria al molibdato riducente cloruro stannoso					(3)	
1967 - '73	(4)	Colorimetria al molibdato riducente cloruro stannoso					(5)	
1973 - '82	(6)	Colorimetria al molibdato riducente acido L-ascorbico	5	14	1,7	12,3	(7)	
				23	1,7	7,4		
				32	1,7	5,3		
				41	2,4	5,9		
				73	2,1	2,9		
				123	2,4	1,9		
				41	2,1	5,0		
				120	1,8	1,5		
				290	2,6	0,9		
				355	3,8	1,1		
1982 - '96	(9)	Colorimetria al molibdato riducente acido L-ascorbico cuvetta passo ottico 4 cm	8	8	0,9	11,3	(10)	
				37	1,8	4,9		
				355	3,8	1,1		
				10	12	2,1		17,5
				32	2,1	6,6		
				94	1,8	1,9		
				165	1,3	0,8		
				236	2,4	1,0		
				7	12	1,0		8,3
				20	1,5	7,8		
30	1,2	3,9						

(1) Proctor & Hood 1954; (2) A.P.H.A. 1955; (3) Vollenweider 1963; (4) A.P.H.A. 1960; (5) Bonomi & Gerletti 1967; (6) Strickland & Parson 1968; (7) Mosello 1973; (8) De Giuli 1979; (9) Valderrama 1977; (10) Vaccarone 1983.

2.2.13.FOSFORO TOTALE

La determinazione di questa variabile è iniziata nel 1973 (Tab. 2.23.); la prima metodologia prevedeva l'idrolisi in ambiente acido per acido solforico, in presenza di persolfato di potassio (Menzel & Corwin 1965; Golterman 1969) e successiva determinazione come fosforo reattivo con il metodo al molibdato previa neutralizzazione con sodio idrossido; tale neutralizzazione causava però inconvenienti di contaminazione per la presenza di fosforo nel sodio idrossido, con conseguente diminuzione della ripetibilità ed aumento del limite di detezione.

Tab. 2.23. Metodologie utilizzate per la mineralizzazione del fosforo organico a fosforo inorganico per la determinazione del fosforo totale ($\mu\text{g P l}^{-1}$).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1973 - '75	(1)	Idrolisi acida a 120 °C					(2)
1975 - '82	(3)	Idrolisi acida a 120 °C					(4)
		Idrolisi acida a 120 °C	5	19 47 416	1,3 2,8 9,6	6,8 6,0 2,3	(5)
1982 - '96	(6)	Idrolisi con scansione di pH da basico ad acido a 120 °C cuvetta passo ottico 4 cm	14	5	0,8	16,0	
				14	1,6	11,5	
				18	1,0	5,6	
				32	1,1	3,4	
				137	5,4	3,9	
		303	10,9	3,6			
		cuvetta passo ottico 10 cm	9	14	0,8	5,7	
	40			1,6	4,0		

(1) Menzel & Corwin 1965; (2) Mosello 1973; (3) Golterman 1969; (4) Tartari 1980; (5) Vaccarone 1983; (6) Valderrama 1981.

Le modalità dell'ossidazione sono cambiate nel 1982, quando si sono utilizzate le condizioni già descritte per l'azoto totale che permettono la simultanea ossidazione dei composti contenenti azoto e fosforo grazie alla scansione da pH 9,7 a pH 5-6 (Valderrama 1981). Questa metodica, attualmente in uso, è descritta nel paragrafo 3.6.7.

Anche per le concentrazioni di fosforo totale la confrontabilità fra i dati prodotti in anni diversi è molto buona. L'attenzione sempre prestata a questa determinazione analitica è giustificata dalla fondamentale importanza delle concentrazioni di fosforo totale nella problematica dell'eutrofizzazione e dai valori di concentrazioni, spesso molto prossimi al limite di quantificazione.

2.2.14.SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO

La determinazione si basa sulla reazione con molibdato di ammonio in ambiente acido per acido cloridrico; dal 1975 si è aggiunta la riduzione con cloruro di stagno (II) che ha aumentato la sensibilità della determinazione. Dal 1991 questa determinazione viene eseguita in *Flow Injection Analysis* mantenendo gli stessi reattivi utilizzati precedentemente; questo passaggio non ha comportato nessuna variazione

sulla qualità dei risultati prodotti come evidenziato nel paragrafo 4.2.6. La bibliografia e gli altri dati caratteristici sono riportati nella tabella 2.24.

Tab. 2.24. Metodologie utilizzate per la determinazione della silice reattiva (mg Si l^{-1}).

Periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
1947 - '60	(1)	Colorimetria al molibdato					(2)
1960 -'75	(3)	Colorimetria al molibdato			0,1		(4)
1975 - '80	(5)	Colorimetria al molibdato e riduzione con cloruro stannoso	0,05	0,30	0,041	13,7	(6)
				1,60	0,026	1,6	
				2,06	0,037	1,8	
				2,86	0,014	0,5	
				3,86	0,021	0,5	
				0,41	0,050	12,2	(7)
				0,99	0,021	2,1	
				3,23	0,023	0,7	
1980 - '91	(8)	Colorimetria al molibdato e riduzione con cloruro stannoso	0,05	0,42	0,03	7,1	(9)
				1,69	0,05	3,0	
				2,61	0,03	1,1	
				4,21	0,04	1,0	
				4,42	0,08	1,8	
1991 - '96	(10)	Colorimetria al molibdato e riduzione con cloruro stannoso determinazione in <i>Flow Injection Analysis</i> (F.I.A.)	0,05	1,33	0,05	3,8	
				4,07	0,13	3,2	

(1) A.P.H.A. 1936; (2) Ferrari 1948; (3) A.P.H.A. 1955; (4) Vollenweider 1963; (5) A.P.H.A. 1971; (6) Mosello 1973; (7) De Giulì 1979; (8) Golterman *et al.* 1978; (9) Vaccarone 1983; (10) Thomsen *et al.* 1983.

2.2.15. METALLI PESANTI

Le determinazioni dei metalli pesanti sono cominciate nel 1973 con l'acquisizione della strumentazione in assorbimento atomico con fornetto di grafite (Tab. 2.2); poche sono le determinazioni con metodi colorimetrici eseguite negli anni precedenti (Vollenweider 1963, Bonacina 1970). Fino alla fine degli anni settanta l'analisi dei metalli pesanti ha seguito le specifiche esigenze delle ricerche che hanno toccato questo argomento (Mosello 1973; Baudo *et al.* 1979a, 1979b); in questo periodo le determinazioni sono state eseguite sia su campioni di acque di lago che su matrici biologiche.

Dal 1984 il laboratorio di idrochimica dell'Istituto ha cominciato l'analisi sistematica dei metalli pesanti contenuti nelle acque del Lago d'Orta (Mosello *et al.* 1986, 1989a; Calderoni *et al.* 1991, 1994) e su parte dei campioni provenienti dai laghi alpini.

Le tabelle 2.25a. e 2.25b. riassumono le principali determinazioni di metalli pesanti eseguite presso il laboratorio di idrochimica dell'Istituto a partire dagli anni sessanta.

Tab. 2.25(a). Metodologie utilizzate per la determinazione dei metalli pesanti ($\mu\text{g l}^{-1}$).

Elemento e periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
Alluminio 1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	5	100	3,0	3,0	(2)
Cadmio 1977 - '78	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,01	1,14 5,19	0,07 0,16	6,1 3,1	(8)
Cromo 1968 - '74	(3) (11)	Colorimetrico difenilcarbazide	3	6,4 10,5 21,3 33,9 73,5	0,57 0,76 0,77 0,93 1,77	10 8,9 7,2 3,6 2,7 2,4	(4) (6)
1973 - '77	(5)	Assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene	100				(6)
1977 - '83	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,5	4,8 8,9	0,2 0,3	5,0 3,6	
1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,5	5,0	0,5	10,0	(2)
Ferro 1960 - '73	(9)	Colorimetrico fenantrolina	5				(10)
1973 - '77	(5)	Assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene	120				(6)
1977 - '83	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,2	10,2 51,0	3,2 1,4	31 2,8	(8)
1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	5,0	100	5,0	5,0	(2)
Manganese 1960 - '73	(9)	Colorimetrico persolfato	5				(10)
1973 - '77	(5)	Assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene	60				(6)
1977 - '83	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,01	4,89 40,4	0,11 0,47	2,3 1,2	(8)
1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	2	80	2,0	2,5	(2)

(1) Perkin Elmer 1980; (2) Mosello *et al.* 1986; (3) A.P.H.A. 1960; (4) Bonacina 1970; (5) Perkin Elmer 1971; (6) Mosello 1973; (7) Perkin Elmer 1976; (8) Baudo *et al.* 1979b; (9) A.P.H.A. 1955; (10) Vollenweider 1963; (11) A.P.H.A. 1971.

Tab. 2.25(b). Metodologie utilizzate per la determinazione dei metalli pesanti ($\mu\text{g l}^{-1}$).

Elemento e periodo di utilizzo	Bibliografia metodo	Metodo	L.O.Q.	Media	D.S.	C.V. %	Bibliografia riferimento
Nichel 1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	2	20	2,0	10	(2)
Piombo 1977 - '78	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,1	9,8 50,8	0,63 0,97	6,5 1,9	(8)
Rame 1960 - '73	(9)	Colorimetrico dietilcarbammato	10			10	(10)
1973 - '77	(5)	Assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene	100				(6)
1977 - '83	(7)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	0,1	4,7 20,3	0,7 0,4	14,4 2,4	(8)
1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	1	37,0	0,7	1,9	(2)
Zinco 1973 - '74	(5)	Assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene	20				(6)
1984 - '96	(1)	Assorbimento atomico in fornello di grafite	2	60,0	2,0	3,3	(2)

(1) Perkin Elmer 1980; (2) Mosello *et al.* 1986; (3) A.P.H.A. 1960; (4) Bonacina 1970; (5) Perkin Elmer 1971; (6) Mosello 1973; (7) Perkin Elmer 1976; (8) Baudo *et al.* 1979b; (9) A.P.H.A. 1955; (10) Vollenweider 1963; (11) A.P.H.A. 1971.

3. METODICHE ATTUALMENTE IN USO

Negli ultimi dieci anni nel laboratorio di idrochimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia sono state realizzate alcune importanti acquisizioni strumentali, con l'introduzione della cromatografia ionica e dell'analisi in flusso continuo. Queste variazioni, dettagliatamente descritte nel capitolo 2 unitamente alle procedure di controllo di qualità introdotte, hanno permesso di ottimizzare l'attività analitica fino all'attuale (1996) situazione, in cui dal prelievo del campione al termine delle analisi, con verifica ed archiviazione dei risultati, trascorrono mediamente cinque giorni.

L'attività analitica del laboratorio relativa al periodo 1984-1995, è di circa 1300 campioni per anno, la cui suddivisione percentuale per tipologie è riportata in figura 3.1. Il 56% dei campioni provengono da laghi e fiumi (L. Maggiore, L. d'Orta e grandi laghi subalpini, fiumi tributari del L. Maggiore e del L. d'Orta); la pioggia ed i laghi alpini rappresentano rispettivamente il 21 e l'8%, mentre la restante parte, circa il 15%, è rappresentata da altri ambienti lacustri. Questo comporta un carico settimanale per il laboratorio di circa 28-30 campioni suddivisi in circa 45 settimane lavorative. Tenuto conto del numero di determinazioni eseguite per campione (da 12 a 14) si arriva a circa 17000-18000 determinazioni all'anno (350-400 alla settimana). Questa attività analitica viene mediamente svolta da 3-4 persone, di cui due soli dipendenti CNR, che operano a tempo pieno nel laboratorio.

3.1. PRETRATTAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Le procedure di pretrattamento e di conservazione del campione sono finalizzate a garantire la stabilità e la inalterabilità dei suoi costituenti nell'intervallo di tempo che intercorre tra il campionamento e l'analisi, ed a rendere il campione idoneo all'analisi. Questi aspetti possono influire significativamente sui risultati analitici, in particolar modo quando il campione è torbido per la presenza di materiale in sospensione o nell'analisi di variabili particolarmente instabili come l'ammonio od il fosforo. Per un'approfondita trattazione di questi argomenti si rimanda a A.P.H.A. (1992), I.R.S.A. (1994) e per una rassegna sulle tecniche di conservazione e pretrattamento dei campioni a Benoliel (1994) e Kramer (1994).

L'attività di campionamento svolta dall'Istituto Italiano di Idrobiologia prevede per le analisi idrochimiche il prelievo in bottiglie di polietilene da un litro per tutte le determinazioni inorganiche ed in bottiglie di vetro per l'analisi dell'ossigeno disciolto (immediatamente fissato come descritto nel paragrafo 3.2.). L'analisi di pH, conducibilità si esegue all'arrivo dei campioni in laboratorio, ammonio, fosforo

reattivo e totale, azoto nitrico e totale vengono analizzati entro 24-36 ore dal prelievo; in questo periodo i campioni vengono conservati in cella frigorifera a 4 °C senza l'aggiunta di alcun stabilizzante. Le rimanenti determinazioni (calcio, magnesio, sodio, potassio, cloruri, solfati ed alcalinità) vengono portate a termine entro quattro giorni dal prelievo.

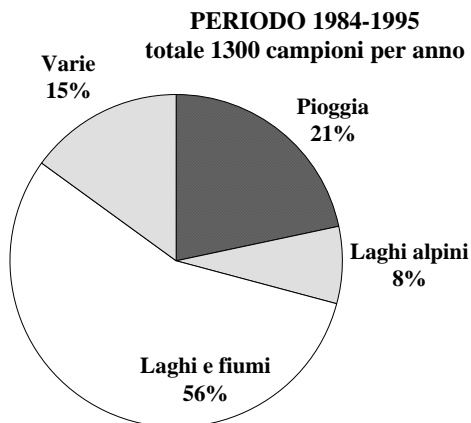


Fig. 3.1. Campioni analizzati nel periodo 1984-1995 presso il laboratorio di idrochimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia.

Sui campioni solitamente non viene eseguito alcun pretrattamento di chiarificazione o filtrazione in quanto generalmente sono incolori e senza materiale particolato. Pertanto le determinazioni principali (pH, conducibilità, alcalinità e tutte le determinazioni colorimetriche) vengono eseguite sul campione tal quale. Nel caso sia presente materiale particolato interferente con le analisi colorimetriche, il campione viene filtrato al momento del riempimento della cuvetta per la lettura spettrofotometrica, dopo l'aggiunta dei reattivi a sviluppo completo del colorante; per queste filtrazioni si utilizzano filtri monouso per siringa con porosità di 5 µm. Questa procedura viene solitamente utilizzata nelle determinazioni di fosforo reattivo e totale eseguite su campioni provenienti da laghi in cui è in corso una fioritura algale, oppure in fiumi campionati in un periodo di piena con molto materiale particolato veicolato a valle. Per le determinazioni in cromatografia ionica una aliquota di circa 10 ml di campione viene filtrata con filtri monouso da siringa con porosità di 0,8 µm; la filtrazione viene eseguita al riempimento del *vial* per l'autocampionatore utilizzato sulla linea cromatografica.

Per l'analisi dei metalli pesanti il campione viene filtrato sul campo con filtri di policarbonato da 0,4 µm, utilizzando recipienti ed apparati di filtrazione lavati in acido nitrico al 2% (Henriksen & Balmer 1977). Giunto in laboratorio il campione viene subito fissato con acido nitrico al 2% al fine di evitare la precipitazione o l'adsorbimento dei metalli da parte delle pareti del contenitore; l'analisi in spettrofotometria di assorbimento atomico viene eseguita una o due volte all'anno sui campioni fissati e conservati in cella frigorifera per un periodo da sei ad otto mesi.

Diversamente avviene per i campioni di pioggia, sui quali solo le analisi di pH e conducibilità vengono eseguite sul campione tal quale, mentre le rimanenti analisi si eseguono sul campione filtrato su filtri in nitrato di cellulosa da 0,45 μm ; per le deposizioni atmosferiche è indispensabile che la filtrazione sia eseguita al più presto, al fine di minimizzare i tempi di contatto tra la pioggia ed il materiale particellato (pulviscolo atmosferico, pollini, ecc.) che causa il rilascio di alcuni dei composti inorganici analizzati, con possibile neutralizzazione dell'acidità. Il dettaglio delle procedure seguite è riportato in Mosello *et al.* (1990b).

In alcuni casi sporadici è stato necessario fissare il campione in quanto non poteva essere analizzato in tempi brevi (meno di una settimana); pertanto è stato necessario provvedere ad un adeguato pretrattamento al fine di posticipare le analisi fino a quattro, sei mesi dopo il campionamento. Tale situazione si è avuta con le analisi eseguite su campioni provenienti da zone remote come l'Antartide o l'Himalaya. In queste occasioni campioni da un litro di acqua sono stati congelati sul posto, oppure frazionati in vari recipienti per poi essere conservati con modalità diverse a seconda delle determinazioni. I trattamenti sui campioni frazionati sono stati i seguenti:

- aggiunta di cloroformio allo 0,2% e conservazione a 4 °C per l'analisi dei principali nutrienti algali (fosforo totale, azoto totale, ammonio, nitrati e silice);
- congelamento per l'analisi dell'alcalinità con titolazione potenziometrica;
- congelamento per le analisi di cloruri, solfati, calcio, magnesio, sodio e potassio con metodi spettrofotometrici in assorbimento molecolare o atomico;
- filtrazione a 0,45 μm in *vial* da 1,5 ml di vetro o polipropilene pronti per l'introduzione in autocampionatore e conservati a 4 °C, nel caso in cui le determinazioni di cloruri, solfati, nitrati, calcio, magnesio, sodio e potassio, vengano eseguite in cromatografia ionica.

3.2. OSSIGENO DISCIOLTO

Principio del metodo

Titolazione volumetrica basata sull'ossidazione dell'idrossido di manganese (II) a stati di valenza superiori da parte dell'ossigeno disciolto nel campione; la reazione avviene in ambiente alcalino. Con la successiva acidificazione in presenza di ioduro, il manganese si riduce a Mn (II), liberando iodio in quantità equivalente all'ossigeno inizialmente disciolto nel campione. Lo iodio liberato viene titolato con sodio tiosolfato in presenza di tiodene come indicatore.

Tab. 3.1. *Range* di utilizzo, LOQ e ripetibilità del metodo per la determinazione dell'ossigeno disciolto: valori di concentrazione espressi in mg l^{-1}

Range di misura	LOQ	Ripetibilità	
		Concentrazione	C.V. %
0,50 - 15,0	0,50	9,3	1,8

Reagenti

- I - Soluzione di cloruro di manganese (II): sciogliere 426 g di cloruro di manganese (II) tetraidrato in circa 700 ml di acqua deionizzata e portare a volume finale di 1000 ml.

II - Soluzione alcalina di ioduro - sodio azide: sciogliere 500 g di sodio idrossido (o 700 g di KOH) e 135 g di sodio ioduro (o 150 g di KI) in circa 900 ml di acqua deionizzata; dopo che la soluzione si è raffreddata aggiungere sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN_3) sciolti precedentemente in circa 40 ml di acqua distillata; portare a volume finale di 1000 ml.

Soluzione titolante - sodio tiosolfato 0,01 N preparato da fiala a titolo esatto.

La verifica del titolo si esegue ogni 3-4 mesi con potassio iodato 0,01 N (0,7133 g KIO_3 in due litri). A circa 40 ml di acqua deionizzata si aggiungono con una pipetta a volume fisso 10 ml di KIO_3 0,01 N, 0,5 ml di soluzione alcalina di ioduro - sodio azide e si acidifica con 1 ml di acido cloridrico al 37%.

Si titola con sodio tiosolfato 0,01 N, il volume teorico necessario è di 10 ml e si calcola la concentrazione reale dalla formula:

$$\text{Conc. reale sodio tiosolfato (N)} = \frac{10 \text{ ml teorici}}{\text{ml sodio tiosolfato 0,01 N erogati}} \times 0,01(\text{N})$$

Acido cloridrico 37% per analisi.

Indicatore: tiodene (complesso amido-urea Prolabo Rhone Poulenc), una punta di spatola (0,5-0,8g) in circa 25 ml di acqua deionizzata.

Apparecchiatura

Per il campionamento sono necessarie bottiglie da 150 ml con tappo in vetro smerigliato tagliato a becco di flauto, tale forma facilita il riempimento totale ed evita il permanere di bolle d'aria quando si chiudono le bottiglie; per l'aggiunta dei reattivi utilizzare delle pipette automatiche a volume fisso di 1000 μl evitando di fare entrare bolle d'aria con i reattivi.

In laboratorio per la titolazione utilizzare una pipetta a svuotamento da 50 ml e titolare con buretta automatica di tipo digitale in grado di misurare aggiunte di 0,01 ml di titolante.

Procedimento

Campionamento: prelevare il campione evitandone l'ossigenazione, prestando attenzione a non fare gorgogliare aria nella bottiglia e riempirla senza lasciare bolle d'aria all'interno.

Fissare immediatamente l'ossigeno aggiungendo 1,0 ml del reagente I (cloruro di manganese II) e 1,0 ml del reagente II (ioduro - sodio azide) immergendo i puntali delle pipette ben al di sotto della superficie del campione, chiudere con il tappo di vetro eliminando tutta l'aria ed agitare.

Il campione così fissato si conserva per circa 48 ore.

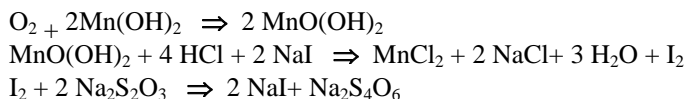
Analisi: quando il precipitato si è depositato lasciando il campione limpido, si toglie il tappo e si aggiunge un volume di acido cloridrico al 37% pari al volume lasciato libero dal tappo; si richiude la bottiglia e la si agita fino a dissoluzione completa del precipitato con corrispondente rilascio di iodio I_2 .

Per la titolazione si pipettano 50 ml di campione in una beuta da 250 ml e si titolano immediatamente con la soluzione di sodio tiosolfato 0,01 N fino a colorazione giallo paglierino, si aggiunge circa 1 ml dell'indicatore tiodene che assume la colorazione blu e si prosegue la titolazione fino a viraggio incolore.

Il volume di sodio tiosolfato erogato dalla buretta verrà utilizzato per il calcolo della concentrazione di ossigeno.

Reazioni e calcoli

Le reazioni che avvengono tra l'ossigeno disciolto nel campione ed i reattivi sono le seguenti:



indicando con N la normalità del sodio tiosolfato e con V il volume in ml di sodio tiosolfato erogato dalla buretta al viraggio del tiodene, sapendo che il peso equivalente dell'ossigeno è 8, si avrà:

$$\text{Ossigeno disciolto (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{V \times N \times 1000 \times 8}{1000 \times 50} \times 1000$$

da cui

$$\text{Ossigeno disciolto (mg l}^{-1}\text{)} = V \times 1,6$$

Riferimenti bibliografici

Golterman, H.L., R.S. Clymo & M.A.M. Ohnstand. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. I.B.P. Handbook No. 8, Blackwell, Oxford. 213 pp.

Winkler, L.W. 1888. The determination of dissolved oxygen in water. *Berlin. Deut. Chem. Ges.* 21: 2843

3.3. MISURA DEL PH

Principio del metodo

Metodo elettrochimico con elettrodo a vetro: l'attività (a) dello ione idrogeno ($\text{pH} = -\log a\text{H}^+$) viene determinata misurando la differenza di potenziale tra l'elettrodo di misura (elettrodo a vetro) e l'elettrodo di riferimento (elettrodo a calomelano saturo) immersi nella cella di misura contenente il campione; la forza elettromotrice che si genera tra gli elettrodi è descritta dall'equazione di Nernst e corrisponde a 58 mV per unità di pH a 20°C.

Strumentazione

Il pHmetro è un potenziometro al quale vengono collegati gli elettrodi di misura ed il sensore della temperatura. I pHmetri descritti in questo paragrafo sono stru-

menti in grado di visualizzare variazioni di 0,001 unità di pH e corrispondono a potenziometri in grado di apprezzare differenze di potenziale di 0,1 mV. Normalmente queste sensibilità non sono necessarie per le misure di *routine* dove è più che sufficiente determinare il pH al centesimo (0,01 u. pH) corrispondenti a potenziometri con sensibilità di 1 mV. Tale precisione, consentita dall'elettronica dell'apparecchio, difficilmente viene raggiunta nelle determinazioni analitiche a causa degli errori associati all'uso dei tamponi, alla calibrazione ed alla stabilità di lettura degli elettrodi. Ad esempio si deve considerare l'incertezza sul valore di pH dei tamponi, generalmente di $\pm 0,01$ o $\pm 0,02$ unità di pH.

La misura del pH si esegue con l'elettrodo ioneselettivo a vetro abbinato ad un elettrodo di riferimento generalmente a calomelano con ponte salino in KCl 3,5 M o in soluzione satura. Si consiglia l'uso di elettrodi con risposta lineare nel campo di pH 1÷13 e giunto salino in quarzo o cono smerigliato ad elevato flusso di soluzione salina, adatti a misure in acque con basse forze ioniche.

Se gli elettrodi sono stati conservati asciutti per lungo tempo, occorre condizionarli nella soluzione di mantenimento per alcune ore prima dell'uso.

Per una descrizione più dettagliata sulla misura del pH e sull'uso degli elettrodi si rimanda a Linnet (1970), Westcott (1978) ed APHA (1992).

Taratura - PHM84 Radiometer

Le seguenti indicazioni riguardano specificatamente il pH metro Radiometer PHM84, con elettrodi a vetro e calomelano (GK2701) e sensore di temperatura (T701).

Lo strumento viene calibrato nell'intervallo di pH comprendente il valore del campione: per questo è comodo utilizzare due strumenti tarati rispettivamente nel range di pH 7-4 (per acque di pioggia) e 9-7 (per acque superficiali).

La taratura si esegue all'inizio di ogni settimana con tamponi commerciali già pronti per l'uso; lo strumento deve essere precedentemente acceso per almeno 30 minuti e può essere utilizzato per le misure sui campioni solo dopo 30 minuti dal termine della calibrazione, in questi intervalli di tempo gli elettrodi restano immersi nella soluzione di conservazione (cloruro di potassio 0,1 M a pH 4).

Le misure vengono eseguite senza agitazione.

In tutte le fasi della taratura o della misura in cui gli elettrodi non sono immersi nelle soluzioni tampone o nei campioni, lo strumento deve essere nella posizione HOLD con *led* giallo acceso. Per la calibrazione procedere come segue:

- controllare che lo strumento sia impostato sulla lettura pH;
- impostare la temperatura del tampone (corrispondente alla temperatura ambiente) con la manopola TEMP°C ;
- lavare accuratamente gli elettrodi con acqua deionizzata;
- avvinare una volta gli elettrodi con il tampone a pH maggiore e successivamente immergerli in un'altra aliquota di tampone per circa 3 cm ed attendere almeno 3 minuti;
- impostare con la manopola ISO pH il valore di pH del tampone in misura;
- agendo sulla manopola BUFFER correggere il valore di pH visualizzato sul *display* fino a leggere il valore di pH del tampone alla temperatura di misura (vedi

- tabella correzione per la temperatura sull'etichetta della bottiglia): lasciare stabilizzare per circa 2 minuti ritoccano eventualmente con la manopola BUFFER;
- lavare accuratamente gli elettrodi con acqua deionizzata, avvinarli con il secondo tampone a pH inferiore ed immergerli in un'altra aliquota di tampone per circa 3 cm ed attendere almeno 3 minuti;
 - agendo sulla manopola SENS correggere il pH visualizzato dal *display* fino a leggere il valore di pH del tampone alla temperatura di misura: lasciare stabilizzare per circa 2 minuti ritoccano eventualmente con la manopola SENS;
 - lavare accuratamente gli elettrodi e lasciarli immersi in acqua deionizzata per circa 10 minuti.

Misura - PHM84 Radiometer

- Sciacquare gli elettrodi con acqua deionizzata;
- avvinare gli elettrodi con il campione e nel caso della prima determinazione lasciare stabilizzare gli elettrodi immersi nel campione per almeno 15 minuti;
- eseguire la misura su un'altra aliquota di campione immergendo gli elettrodi in circa 3 cm di campione ed attendendo almeno 3 minuti prima della lettura; la misura viene eseguita senza agitazione.
- proseguire con le letture avvinando gli elettrodi con il campione successivo ed eseguendo la lettura su un'altra aliquota di campione;

Osservazioni sull'utilizzo del pHmetro PHM93 Radiometer

Le seguenti indicazioni riguardano specificatamente il pHmetro Radiometer PHM93, con elettrodi a vetro e calomelano (GK2701) e sensore di temperatura (T201).

Questo tipo di pHmetro, come altri analoghi di quest'ultima generazione, ha la caratteristica di essere gestito da un processore che controlla tutti i principali parametri che influenzano la misura (temperatura, stabilità e tempo di risposta degli elettrodi, caratteristiche della calibrazione, data e giorni trascorsi dalla calibrazione, ecc.). Il processore permette inoltre di memorizzare tutte le condizioni operative relative alle calibrazioni ed alle determinazioni sui campioni; questi controlli sono finalizzati al miglioramento della qualità interna del laboratorio nella misura del pH. Una descrizione dettagliata delle caratteristiche e delle potenzialità di questo strumento, esula dallo scopo di questo lavoro, pertanto la descrizione considererà solo i parametri inerenti le calibrazioni e le misure sui campioni comunemente analizzati nei laboratori dell'Istituto. Per una trattazione completa sulle potenzialità dello strumento si rimanda al manuale PHM93 *Reference pH Meter, Operating Instruction* della Radiometer.

Il pHmetro PHM93 ha la possibilità di memorizzare fino a cinque metodi di lavoro (A, B, C, D ed E) ognuno dei quali con una propria calibrazione. Nel laboratorio dell'Istituto per le determinazioni su acque di pioggia viene utilizzato il metodo A (acido), per pH compresi tra 7-4, mentre per le acque superficiali viene utilizzato il metodo B (basico), per pH compresi tra 9-7. I metodi C, D ed E normalmente non si utilizzano per le analisi di *routine*.

I parametri strumentali più importanti, relativi alle operazioni di taratura per entrambi i *range* di utilizzo (pH 7-4 e 9-7) e per le misure di pH sui campioni, sono descritti qui di seguito.

Taratura - PHM93 Radiometer

- La taratura si esegue all'inizio di ogni settimana con tamponi commerciali già pronti per l'uso; lo strumento deve essere precedentemente acceso per almeno 30 minuti e può essere utilizzato per le misure sui campioni solo dopo 30 minuti dal termine della calibrazione, in questi intervalli di tempo gli elettrodi restano immersi nella soluzione di conservazione (cloruro di potassio 0,1 M a pH 4).
- Le misure vengono eseguite senza agitazione.
- Per la scelta del metodo e per l'impostazione delle opzioni vengono utilizzati i tasti di spostamento in alto (▲), in basso (▼), a destra (▶) e a sinistra (◀).
- Impostazioni per le calibrazioni nei *range* di pH 7-4 (metodo A) e *range* pH 9-7 (metodo B):

posizionarsi sul metodo da editare (*Method A* o *Method B*)
tenendo premuto 5" il tasto *Method* si accede alle impostazioni

Calibration

tipo *Free*

2 *Buffers*

Stability Crit. 2 mPH/min

Accept Time 300 sec

Stability Alarm 900 sec

Min. ZeropH Limit 6.8 pH

Max. ZeropH Limit 7.2 pH

Min Sens Limit 95%

Max Sens Limit 105%

Min Temp Limit 17°C

Max Temp Limit 27°C

Calibrate every 144 h

Per terminare ed uscire dalla modalità impostazioni premere il tasto *Method*

Per la calibrazione procedere come segue:

- scegliere il metodo utilizzando i tasti di spostamento a destra (▶) e a sinistra (◀);
- premere il tasto *CAL*
- lavare accuratamente gli elettrodi con acqua deionizzata;
- avvicinare una volta gli elettrodi con il tampone a pH maggiore e successivamente immergerli in un'altra aliquota di tampone (*Dip Electrode in Buffer 1*) per circa 3 cm, attendere almeno 1 minuto prima di dare inizio alla lettura premendo il tasto di conferma (✓);
- a lettura avvenuta vengono visualizzati sul *display* il valore di pH e temperatura determinati ed agendo sui tasti ◀ ▶ viene impostato il pH del tampone alla tem-

- peratura di misura (vedi tabella correzione per la temperatura sull'etichetta della bottiglia);
- lavare accuratamente gli elettrodi con acqua deionizzata, avvinarli con il secondo tampone a pH inferiore ed immergerli in un'altra aliquota di tampone (*Dip Electrode in Buffer 2*) per circa 3 cm, attendere almeno 1 minuto prima di dare inizio alla lettura premendo il tasto di conferma (✓);
 - a lettura avvenuta vengono visualizzati sul *display* il valore di pH e temperatura determinati ed agendo sui tasti ◀ ▶ viene impostato il pH del tampone alla temperatura di misura, premere il tasto conferma (✓) per continuare;
 - a fine calibrazione vengono visualizzati i risultati di *Zeroph* e *Sens.%*, i cui valori sono solitamente compresi rispettivamente tra 6,9÷7,1 e 95÷105%, premendo il tasto *METHOD* si ritorna al *menù* principale;
 - lavare accuratamente gli elettrodi ed immergerli in acqua deionizzata per circa 10 minuti prima di iniziare le letture sui campioni.

Misura - PHM93 Radiometer

Per la scelta del metodo e per l'impostazione delle opzioni vengono sempre utilizzati i tasti di spostamento in alto (▲), in basso (▼), a destra (▶) e a sinistra (◀).

- Impostazioni per le misure di pH sui campioni:
 - posizionarsi sul metodo da editare (*Method A* o *Method B*)
 - tenendo premuto 5" il tasto *Method* si accede alle impostazioni
 - Sample*
 - Autoread*
 - Stability Crit.* 3 *mpH/min* per il metodo A, 5 per il metodo B
 - Accept Time* 350 *sec*
 - Stability Alarm* 900 *sec*
 - Min. pH Alarm* 3.5 per il metodo A, 6.9 per il metodo B
 - Max. pH Alarm* 7.5 per il metodo A, 9.5 per il metodo B
 - Min Temp Limit* 17°C
 - Max Temp Limit* 27°C

Per le misure sui campioni procedere come segue:

- Scegliere il metodo (A o B) utilizzando i tasti di spostamento a destra (▶) e a sinistra (◀);
- sciacquare gli elettrodi con acqua deionizzata;
- avvinare gli elettrodi con il campione e nel caso della prima determinazione lasciare stabilizzare gli elettrodi nel campione per almeno 15 minuti;
- eseguire la misura su un'altra aliquota di campione immergendo gli elettrodi in circa 3 cm di campione; la misura viene eseguita senza agitazione;
- premendo il tasto *SAMPLE* seguito dal tasto conferma (✓) viene visualizzata la data e l'ora dell'ultima calibrazione eseguita, premere conferma per iniziare la misura sul campione;
- durante la misura viene visualizzato il pH del campione, il tempo trascorso dall'inizio della misura e la temperatura del campione;

- quando la misura si è stabilizzata entro i valori impostati (*Stability Crit.* 3 *mpH/min* per il metodo A, 5 per il metodo B), sul *display* compare la scritta *STAB* assieme ai valori di pH e temperatura ottenuti;
- proseguire con le letture avvinando gli elettrodi con il campione successivo ed eseguendo la lettura su un'altra aliquota di campione;
- per terminare le misure o cambiare metodo premere il tasto *METHOD*.

Nel caso il campione in misura sia fuori dal *range* di calibrazione è sufficiente premere *METHOD* per interrompere la lettura, cambiare metodo e riprendere le letture con il tasto *SAMPLE*.

Analisi di campioni simili

Nel caso si analizzino campioni molto simili con piccole variazioni di pH tra un campione e l'altro (ad esempio campioni provenienti dallo stesso lago) al fine di migliorare la precisione e la velocità di stabilizzazione degli elettrodi, si consiglia di immergere gli elettrodi nel primo campione e di lasciarli condizionare per almeno 30 minuti; trascorso questo tempo sostituire il campione e procedere nelle determinazioni sostituendo i campioni senza risciacquare gli elettrodi con acqua deionizzata, ma avvinando solo con il campione in misura.

Conservazione degli elettrodi

Al termine delle misure sciacquare gli elettrodi con acqua deionizzata e conservarli immersi in una soluzione di mantenimento composta da cloruro di potassio 0,1 M in acido cloridrico 0,0001 M corrispondente a pH 4. Questa soluzione si prepara con 7,5 g di KCl e 2 ml di acido cloridrico 0,05 M in un litro di acqua deionizzata.

Riferimenti bibliografici

PHM93 Reference pH Meter, operating instruction. Radiometer Analytical S.A. France.
Linnet, N. 1970. *pH measurements in theory and practice*. Radiometer A/C, Copenhagen. 188 pp.

Westcott, C.C. 1978. *pH measurements*. Academic Press, New York. 172 pp.

3.4. CONDUCIBILITÀ ELETTRICA

La conducibilità elettrica è il reciproco della resistenza elettrica e rappresenta la capacità di una soluzione acquosa di trasferire la corrente elettrica. Essa dipende dall'attività e dal tipo degli ioni presenti nel campione, la cui mobilità è notevolmente influenzata dalla temperatura.

Il metodo elettrochimico si basa sulla determinazione della resistenza elettrica della cella di misura, costituita da due elettrodi di platino, inserita in un ponte di Kohlrausch a corrente alternata; la conducibilità elettrica viene espressa in $\mu\text{S cm}^{-1}$, corrispondenti a $\mu\text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ o $\mu\text{mho cm}^{-1}$, alla temperatura di 20°C.

Correzione della conducibilità alla temperatura di riferimento

Volendo esprimere la conducibilità alle temperature di riferimento sotto riportate, si possono utilizzare i seguenti fattori di trasformazione, ottenuti utilizzando i valori percentuali per grado centigrado riportati tra parentesi:

$$\begin{aligned} \text{Cond. a } 18\text{ }^{\circ}\text{C} &= \text{Cond. } 20\text{ }^{\circ}\text{C} \times 0,956 && (2,3\%) \\ \text{Cond. a } 20\text{ }^{\circ}\text{C} &= \text{Cond. } 18\text{ }^{\circ}\text{C} \times 1,046 && (2,3\%) \\ \text{Cond. a } 20\text{ }^{\circ}\text{C} &= \text{Cond. } 25\text{ }^{\circ}\text{C} \times 0,900 && (2,0\%) \\ \text{Cond. a } 25\text{ }^{\circ}\text{C} &= \text{Cond. } 18\text{ }^{\circ}\text{C} \times 1,147 && (2,1\%) \end{aligned}$$

Il fattore di trasformazione (f) può essere calcolato dalla seguente equazione che tiene conto della differenza tra la temperatura di riferimento (t_{rif}) e la temperatura del campione (t_{mis}) dove:

$$f = 1 + \text{Coefficiente } ^{\circ}\text{C} \times (t_{\text{rif}} - t_{\text{mis}})$$

I valori del coefficiente per grado centigrado variano a seconda degli ioni presenti nel campione ed in funzione della temperatura. Valori indicativi per le acque naturali sono: 0,023 a 18°C, 0,022 a 20°C e 0,019 a 25°C, corrispondenti rispettivamente a 2,3%, 2,2% e 1,9% per grado centigrado (Rodier 1984; A.P.H.A. 1992). Per una discussione più approfondita sui fattori di correzione per la temperatura si rimanda al paragrafo 4.2.8.

Tab. 3.2. Range di utilizzo e ripetibilità del metodo per la determinazione della conducibilità elettrica.

Range di misura ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Ripetibilità	
	$\mu\text{S cm}^{-1}$	C.V. %
0,50 - 1500	14,3	1,4
	186,1	0,6

Misura - CDM83 Radiometer

Le seguenti indicazioni riguardano specificatamente il conduttimetro Radiometer CDM83 con cella conduttometrica CDC304 da 1,0 cm e sensore di temperatura T801; le misure vengono eseguite senza agitazione.

Lo strumento è impostato sulla temperatura di riferimento t_{REF} di 20°C ed il fattore di correzione percentuale per grado centigrado impostato in T.C.% è di 2,30.

Questi parametri insieme al valore di costante di cella sono normalmente già impostati sullo strumento e vengono mantenuti in memoria anche dopo il suo spegnimento.

Lo strumento così impostato fornisce valori di conducibilità corretti per la costante di cella alla temperatura di 20 °C, le misure comunque devono essere eseguite su campioni con temperatura compresa tra 17 e 23 °C. Valori di ripetibilità come quelli riportati in tabella 3.2, si possono ottenere procedendo come descritto in seguito:

- sciacquare due volte la cella conduttometrica con un'aliquota di campione;

- eseguire la misura su un'altra aliquota di campione, immergendo completamente, fino ai fori laterali superiori, la cella conduttometrica, evitando di lasciare bolle d'aria all'interno della cella;
- passando da un campione all'altro é importante sciacquare sempre due volte la cella con il campione successivo.

Misura - CDM230 Radiometer

Le seguenti indicazioni riguardano specificatamente il conduttimetro Radiometer CDM230 con cella conduttometrica CDC641IT da 1,0 cm con sensore di temperatura; le misure vengono eseguite senza agitazione.

Questo tipo di conduttimetro, come altri analoghi di quest'ultima generazione, è gestito da un processore che controlla tutti i principali parametri che influenzano la misura (temperatura, stabilità e tempo di risposta, verifica della costante di cella, data e giorni trascorsi dalla calibrazione, ecc.). Il processore permette inoltre di memorizzare tutte le condizioni operative relative alle calibrazioni ed alle determinazioni sui campioni; questi controlli sono finalizzati al miglioramento della qualità interna del laboratorio nella misura della conducibilità. Una descrizione dettagliata delle caratteristiche e delle potenzialità di questo strumento esula dallo scopo di questo lavoro, pertanto la descrizione considererà solo i parametri inerenti le calibrazioni e le misure sui campioni comunemente analizzati nel laboratorio dell'Istituto. Per una trattazione completa sulle potenzialità dello strumento si rimanda al manuale CDM230 *Conductivity Meter* della Radiometer.

Il conduttimetro CDM230 può memorizzare fino a tre metodi di lavoro (A, B e C) ognuno dei quali con proprie caratteristiche operative, tra cui oltre alle misure in conducibilità anche misure in resistività, salinità, solidi totali disciolti e concentrazione (mg/l). Nel laboratorio dell'Istituto per le determinazioni su acque superficiali e di pioggia viene utilizzato il metodo A in *Autorange* per misure di conducibilità espresse in $\mu\text{S cm}^{-1}$. I metodi B e C normalmente non vengono utilizzati per le analisi di *routine*.

I parametri strumentali più importanti relativi all'uso di questo conduttimetro con il metodo A, sono descritti di seguito.

Per la scelta del metodo e per l'impostazione delle opzioni vengono utilizzati i tasti di spostamento in alto (\blacktriangle), in basso (\blacktriangledown), a destra (\blacktriangleright) e a sinistra (\blacktriangleleft) ed il tasto conferma (\blacktriangledown).

- Impostazioni di *Method*
 - posizionarsi sul metodo A da editare (*Method A*)
 - tenendo premuto 5" il tasto *Method* si accede alle impostazioni
 - Use Cell 1*
 - Conductivity*
 - Autorange*
 - Unit selection S/cm*
 - Printout format ALL*
 - Warning beep YES*
 - Result beep YES*

- Impostazioni di *Cal*
posizionarsi sul metodo A da editare (*Method A*)
tenendo premuto 5" il tasto *Cal* si accede alle impostazioni
Cell 1 constant enter below
valore ottenuto dalla determinazione della costante di cella, ad esempio
 0.8215 cm^{-1}
Cable resistance 0 Ω
Cab. Capacitance 0 pF
- Impostazioni di *Tref*
posizionarsi sul metodo A da editare (*Method A*)
tenendo premuto 5" il tasto *Tref* si accede alle impostazioni
Temp. correction enter below
temperatura a cui vengono riferite le misure $20 \text{ }^\circ\text{C}$
Temperature coef. 2.3 %/°C
- Impostazioni di *Sample*
posizionarsi sul metodo A da editare (*Method A*)
tenendo premuto 5" il tasto *Sample* si accede alle impostazioni
Autoread
Stability crit. 0.5 %/min
Accept. time 120 s, è il tempo entro il quale si vuole eseguire la misura, se in questo tempo non si raggiunge la stabilità dello 0,5 %/min, la misura viene ritenuta instabile
Pure water correction NO

Lo strumento così impostato fornisce valori di conducibilità corretti per la costante di cella alla temperatura di 20°C , le misure comunque devono essere eseguite su campioni con temperatura compresa tra 17 e 23°C .

Per le determinazioni sui campioni procedere come descritto in seguito:

- scegliere il metodo A
- premere il tasto *sample* ed eventualmente portare al valore 1 il contatore dei campioni utilizzando la freccia a sinistra (\blacktriangleleft);
- sciacquare due volte la cella conduttometrica con un'aliquota di campione;
- eseguire la misura su un'altra aliquota di campione, immergendo completamente la cella conduttometrica, evitando di lasciare bolle d'aria all'interno della cella;
- in fase di lettura lo strumento visualizzerà la temperatura di misura, il tempo trascorso ed una scritta STAB che appare gradualmente con il progredire della stabilizzazione della lettura;
- a fine lettura verrà visualizzata la temperatura di riferimento (20°C) a cui è riportato il valore di conducibilità e la temperatura effettiva del campione determinato;
- passando da un campione all'altro è importante sciacquare sempre due volte la cella con il campione successivo.

Premendo il tasto GLP e spostandosi con le frecce (\blacktriangleright , \blacktriangleleft , \blacktriangleup , \blacktriangledown) in *Sample*, è possibile visualizzare, nel range di misura utilizzato, tutte le informazioni relative alle ultime cinquanta determinazioni eseguite per ciascun metodo; le informazioni

riportate sono: valore di conducibilità, temperatura del campione, tempo necessario alla stabilizzazione, temperatura di riferimento, correzione percentuale per grado centigrado, cella di misura, data ed ora della misura.

Conservazione della cella conduttometrica

Al termine delle misure la cella conduttometrica deve essere lavata accuratamente con acqua deionizzata e conservata immersa in una soluzione di acqua deionizzata e alcool etilico 1:1.

Determinazione della costante di cella

La costante di cella è un parametro caratteristico di ogni cella di misura. Essa solitamente si discosta poco dal valore nominale fornito dalla ditta costruttrice; è tuttavia opportuno un controllo periodico (circa ogni 6 mesi) da eseguire utilizzando le soluzioni di cloruro di potassio a conducibilità nota preparate come descritto in seguito.

Utilizzando cloruro di potassio per analisi essiccato in stufa a 140°C per almeno 1 ora, preparare la seguente soluzione madre di KCl 0,1 M:

3,7279 g di KCl in matraccio tarato da 500 ml

Dalla soluzione madre per diluizione in matracci tarati, si ottengono le soluzioni di riferimento con conducibilità teorica riportata in tabella 3.3, con le quali si procede con la misura della conducibilità secondo il seguente schema:

- disattivare la compensazione per la temperatura (T.C.% = 0) ed impostare il valore della costante di cella uguale ad 1,0000;
- misurare la conducibilità dell'acqua deionizzata (C_{acq}) utilizzata per preparare le soluzioni di KCl, termostatandola alla temperatura di 20 e 25°C;
- termostatare alla temperatura riportata in tabella 3.3 le soluzioni di cloruro di potassio precedentemente preparate e misurarne la conducibilità (C_m);
- sottrarre il valore di conducibilità dell'acqua deionizzata (C_{acq}) da tutte le misure effettuate sulle soluzioni di cloruro di potassio e determinare il valore di costante di cella per ogni soluzione:

$$\text{Costante di cella} = \frac{\text{Conducibilità teorica}}{C_m - C_{acq}}$$

Il valore medio della costante di cella ottenuto da questa serie di misure va impostato sul conduttimetro nella funzione costante di cella, al fine di correggere automaticamente tutte le letture eseguite sui campioni.

Tab. 3.3. Modalità di preparazione e valori di conducibilità a diverse temperature di riferimento delle soluzioni di KCl utilizzate per la taratura della cella conduttometrica.

KCl 0.1 M volume prelevato	Volume finale (ml)	Concentrazione KCl	Conducibilità teorica a		Riferimento bibliografico
			20 °C	25 °C	
1000 µl	1000	0,0001 N		14,9	A.P.H.A. 1985
5000 µl	1000	0,0005 N	66,8		EPA 1981
5000 µl	500	0,0010 N		146,9	A.P.H.A. 1985
15 ml	1000	0,0015 N	196,0		Rodier 1984
25 ml	1000	0,0025 N	325,2		Rodier 1984
20 ml	500	0,0040 N	512,8		Rodier 1984

Riferimenti bibliografici

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1985. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., Washington. 1268 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Amer. Publ. Health Ass., Washington.
- Environmental Protection Agency. 1981. *Quality Assurance Handbook for Air Pollution Measurement Systems: Volume V. Manual for precipitation Measurement Systems*. EPA-600/4-82-042a.
- Rodier, J. 1984. *L'analyse de l'eau*. Dunod, Paris. 1365 pp.

3.5. ALCALINITÀ TOTALE

Principio del metodo

Titolazione volumetrica acido base dove gli ioni alcalini (in grado di accettare protoni) presenti nel campione vengono neutralizzati dall'aggiunta di titolante (acido cloridrico) eseguita da una buretta automatica.

La lettura in continuo del pH permette di dosare le aggiunte di titolante fino ai punti finali di pH 4,5 e pH 4,2; nei campioni con alcalinità superiore a 0,15 meq l⁻¹ i volumi di acido necessario per raggiungere questi due punti finali sono utilizzati per estrapolare il valore di alcalinità (A.P.H.A. 1992). Campioni con alcalinità inferiori a 0,15 meq l⁻¹ vengono titolati fino a circa pH 3,5 e l'alcalinità ricalcolata per regressione lineare secondo Gran (Gran 1952; Migdley & Torrance 1978) utilizzando almeno 6 aggiunte di titolante nel range di pH 4,2-3,5.

In assenza di alcalinità (pH minore di 5,5) viene determinata l'acidità forte per titolazione con il metodo di Gran.

La determinazione dell'alcalinità e dell'acidità viene qui proposta con il programma di gestione della buretta *wAlk*, appositamente studiato per queste determinazioni ed operante in ambiente Microsoft Windows. La determinazione dell'alcalinità con il metodo di Gran, può essere eseguita anche manualmente; in questo caso la procedura risulterà più lunga e laboriosa in quanto si devono registrare i valori come proposto negli esempi delle tabelle 3.4. e 3.5., successivamente si deve calcolare la regressione lineare ed estrapolare il punto di flesso dal quale si ricava l'alcalinità.

Definizione di alcalinità totale

L'alcalinità totale è la capacità di un'acqua di neutralizzare gli acidi, corrispondente alla somma delle basi titolabili da un acido. In acque naturali con pH inferiore

a 8,5 l'alcalinit  totale   prevalentemente dovuta al contenuto di bicarbonati, mentre a pH superiori essa rappresenta il contenuto di bicarbonati, carbonati e ioni idrossido; all'alcalinit  totale possono contribuire anche borati, fosfati, silicati o altre basi, quando presenti nel campione.

La figura 3.2. riporta gli andamenti di pH, concentrazione idrogenionica e derivata prima ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{ml}$), relativi alla titolazione di un'acqua naturale con acido cloridrico.

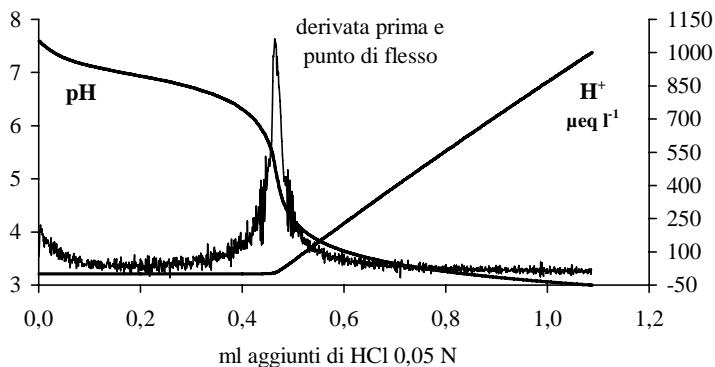


Fig. 3.2. Andamento del pH e della concentrazione idrogenionica durante la titolazione con acido; la derivata prima evidenzia il punto di flesso della titolazione.

Determinazione del punto di equivalenza con il metodo a due punti finali

La lettura in continuo del pH, contemporanea all'aggiunta del titolante, permette di condurre la titolazione ad un primo punto finale (*end point*) avente pH compreso tra 4,5 e 3,5 (valore comunemente utilizzato pH 4,5), raggiunto questo primo *end point*, e memorizzato il volume di acido erogato V_1 , la titolazione prosegue fino al secondo punto finale, rigorosamente di 0,3 unit  di pH inferiori al primo *end point*, memorizzando il volume erogato V_2 .

La diminuzione di 0,3 unit  di pH corrisponde ad un raddoppio della concentrazione idrogenionica, cos  che il punto di equivalenza della titolazione pu  essere calcolato per semplice estrapolazione come riportato in figura 3.3; l'alcalinit  totale viene poi calcolata dalla seguente equazione dove N_{Ac}   la normalit  dell'acido titolante:

$$\text{Alcalinit  totale (meq l}^{-1}\text{)} = \frac{(2V_1 - V_2) \times N_{Ac} \times 1000}{\text{volume campione titolato (ml)}}$$

Questo metodo pu  essere considerato come una titolazione di Gran ottenuta per regressione su due punti opportunamente scelti al fine di rendere i calcoli pi  semplici; tale semplificazione tuttavia rende la determinazione meno precisa rispetto al metodo di Gran, in quanto un piccolo errore nei valori di V_1 e V_2 si ripercuote pesantemente sul calcolo dell'alcalinit . Per questo motivo nell'analisi di campioni a

basso contenuto di alcalinità è consigliabile utilizzare il metodo di Gran; a questo scopo nel programma *wAlk* è stato introdotto un valore soglia di alcalinità sotto il quale la titolazione prosegue oltre i due punti finali con la regressione secondo Gran eseguita su sei aggiunte.

Valori di alcalinità totale superiori alla soglia di Gran (solitamente $0,15 \text{ meq l}^{-1}$) vengono calcolati solo con il metodo a due punti finali.

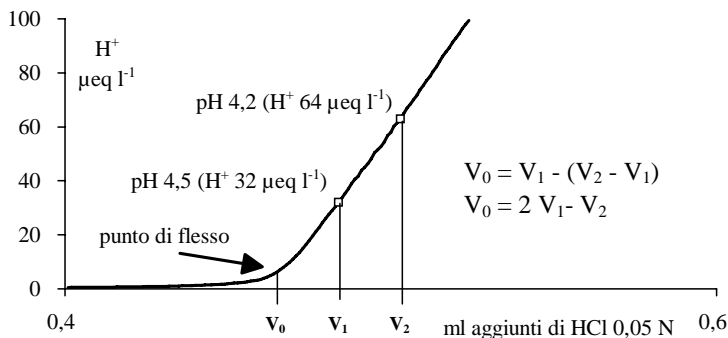


Fig. 3.3. Particolare dell'andamento della concentrazione idrogenionica in prossimità dei punti finali a $\text{pH } 4,5$ e $\text{pH } 4,2$ con il calcolo per l'estrapolazione del punto di flesso della titolazione con il metodo a due punti finali.

Determinazione del punto di equivalenza con il metodo di Gran

La titolazione con regressione secondo Gran costituisce il metodo più preciso per la determinazione dell'alcalinità totale, ed è particolarmente indicata a basse concentrazioni.

Il metodo prevede di eseguire una serie di aggiunte costanti del titolante acido oltre il punto di flesso ($\text{pH } 4,5$) al fine di eseguire una regressione lineare tra il volume aggiunto e la funzione F_1 di Gran che è direttamente correlata alla concentrazione idrogenionica.

Nel programma la lettura in continuo del pH , contemporanea all'aggiunta di titolante, permette di procedere nella titolazione con aggiunte costanti fino a quando non viene superato il pH di inizio del metodo di Gran (punto di flesso a $\text{pH } 4,5$); superato questo valore il metodo provvede ad una serie di aggiunte costanti pari al numero di punti specificati (5-20), registrando per ciascuna aggiunta il volume ed il corrispondente valore di pH .

Il valore di F_1 secondo Gran viene calcolato per ogni aggiunta dall'equazione seguente:

$$F_1 \text{ di Gran} = (\text{volume titolato} + \text{volume aggiunto}) \times 10^{-\text{pH}}$$

Per regressione lineare tra le aggiunte di titolante, eseguite sotto il pH di inizio, ed i valori F_1 di Gran, si ottiene una retta che interseca l'asse del volume V_0 al punto di equivalenza (Fig. 3.4.).

L'alcalinità totale viene quindi calcolata dalla seguente equazione:

$$\text{Alcalinit\`a totale (meq l}^{-1}\text{)} = \frac{V_0 \times N_{Ac} \times 1000}{\text{volume campione titolato (ml)}}$$

Un esempio di determinazione dell'alcalinit\`a totale con regressione di Gran viene riportato in tabella 3.4; le condizioni analitiche sono le seguenti:

Volume del campione titolato	30 ml
pH iniziale del campione	7,39
Titolante acido cloridrico	0,0508 N

Tab. 3.4. Valori di pH misurati sul campione in corrispondenza del volume di acido erogato e valore di F_1 di Gran per il calcolo dell'alcalinit\`a.

pH	Volume di HCl erogato (ml)	F_1 di Gran $\times 1000$
4,07	0,150	2,57
3,94	0,170	3,46
3,85	0,190	4,26
3,78	0,210	5,01
3,72	0,230	5,76
3,67	0,250	6,47
3,62	0,270	7,26

Dai dati analitici riportati in tabella 3.4. per regressione lineare fra il volume di titolante ed il corrispondente valore di F_1 si ricava:

$$F_1 \text{ di Gran} = 0,0377 \times \text{volume HCl in ml} - 0,0030$$

coefficiente di correlazione lineare $r = 0,9996$

$$\text{volume all'intercetta } V_0 = \frac{0,003}{0,0377} = 0,080 \text{ ml}$$

$$\text{Alcalinit\`a totale} = \frac{0,080 \times 0,0508 \times 1000}{30} = 0,136 \text{ meq l}^{-1}$$

In figura 3.4. viene riportata l'estrapolazione grafica del volume di acido cloridrico all'intercetta.

Definizioni di acidit\`a

L'acidit\`a forte, o acidit\`a libera, \`e il contenuto di acidi forti (dissociati) quali gli acidi minerali solforico, nitrico e cloridrico e di eventuali altri acidi completamente dissociati; pu\`o essere determinata per titolazione con il metodo delle aggiunte utilizzando un acido forte.

Nella maggior parte delle acque l'acidit\`a forte corrisponde all'attivit\`a dello ione idrogeno ed \`e calcolabile dal pH ($[H^+] = 10^{-pH}$).

Al fine di chiarire meglio il concetto di acidit\`a, vengono di seguito riportate le definizioni di acidit\`a debole e totale.

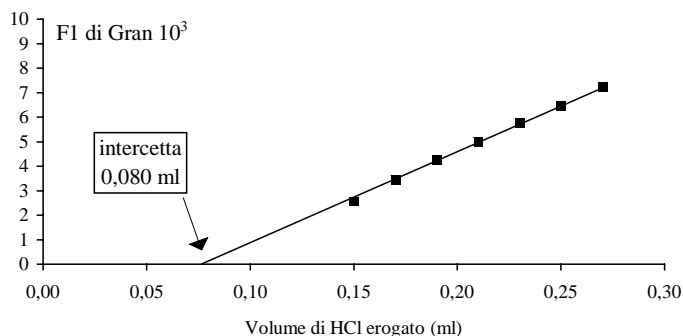


Fig. 3.4. Esempio di estrapolazione del valore dell'intercetta con il metodo di Gran nel caso di un campione contenente alcalinità

L'acidità debole è rappresentata dal contenuto di acidi o basi deboli (parzialmente dissociati) in grado di accettare ioni idrossido.

L'acidità totale è la somma dell'acidità forte (acidi dissociati) e dell'acidità debole (parzialmente dissociati) e rappresenta la capacità di un'acqua di neutralizzare le basi forti; viene normalmente determinata per titolazione con una base forte.

Per ulteriori chiarimenti sulla determinazione dell'acidità debole e totale si rimanda a Galloway *et al.* 1979, Molvaersmyr & Lund 1983 e McQuarcker *et al.* 1983.

Determinazione dell'acidità forte

Il programma *wAlk* utilizzato con il metodo di Gran su campioni a pH inferiore a 5,5 è in grado di determinare l'acidità forte. In questo caso il metodo di Gran è utilizzato come metodo ad aggiunte costanti, con regressione lineare sulle aggiunte, ed estrapolazione dell'acidità forte ad aggiunta zero.

Un esempio di determinazione dell'acidità forte con regressione di Gran viene riportato in tabella 3.5; le condizioni analitiche sono le seguenti:

Volume del campione titolato	74,3 ml
pH iniziale del campione	4,56
Titolante acido cloridrico	0,0508 N

Tab. 3.5. Valori di pH misurati sul campione in corrispondenza del volume di acido erogato e valore di F_1 di Gran per il calcolo dell'acidità.

pH	Volume di HCl erogato (ml)	F_1 di Gran $\times 1000$
4,44	0,020	2,70
4,32	0,040	3,56
4,24	0,060	4,28
4,17	0,080	5,03
4,11	0,100	5,78
4,05	0,120	6,63

Dai dati analitici riportati in tabella 3.5. si ricava:

Regressione lineare: F_1 di Gran = $0,0392 \times \text{volume HCl in ml} + 0,0019$
 coefficiente di correlazione lineare $r = 0,9999$

$$\text{volume all'intercetta } V_0 = \frac{-0,0019}{0,0392} = -0,049 \text{ ml}$$

$$\text{Acidità forte} = -\frac{-0,049 \times 0,0508 \times 1000}{74,3} = 0,034 \text{ meq l}^{-1}$$

In figura 3.5 viene riportata l'estrapolazione grafica del volume negativo di acido cloridrico all'intercetta.

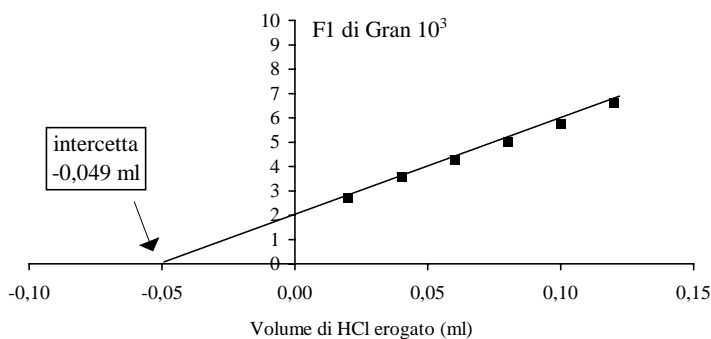


Fig. 3.5. Esempio di estrapolazione del valore dell'intercetta con il metodo di Gran nel caso di un campione contenente acidità minerale.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.6. Range di utilizzo e ripetibilità dell'alcalinità a diverse concentrazioni espresse in meq l^{-1}

Alcalinità totale Range di misura	Ripetibilità	
	Concentrazione	C.V. %
Metodo di Gran 0,000 - 5,000	0,037	5,6
	0,539	0,7
	1,924	1,4
Metodo a due punti finali 0,150 - 5,00	0,171	2,1
	0,525	0,3
	0,746	1,2
	1,894	1,6
	2,750	0,6

Soluzione titolante

Per le determinazioni nel *range* 0-5 meq l⁻¹ titolando un volume di campione compreso tra 30 e 75 ml con una buretta da 1 ml, risulta adeguata una concentrazione di acido cloridrico pari a 0,05 Normale.

Il titolante è ottenuto per diluizione di una fiala commerciale contenente l'esatto volume di acido per preparare 1000 ml di acido cloridrico 0,05 N.

Strumentazione utilizzata

Buretta automatica Radiometer ABU91 comprensiva di scheda per il collegamento con gli elettrodi a vetro e di riferimento per la misura di pH ed il sensore di temperatura, supporto per elettrodi SAM90 con agitatore meccanico, *personal computer* collegato alla buretta tramite la porta seriale COM1.

Programma per la determinazione dell'alcalinità totale e dell'acidità forte denominato *wAlk* scritto in linguaggio Microsoft Visual Basic per l'ambiente Microsoft Windows.

Descrizione del programma wAlk

Il programma *wAlk* permette la gestione completa del processo di titolazione con la buretta Radiometer ABU 91; esso è composto da un modulo per la sessione di titolazione e da alcuni moduli di utilità per le operazioni accessorie e dalla documentazione. I diversi moduli sono richiamabili separatamente da menù, ma la tipica sequenza operativa è quella riportata nella figura 3.6.

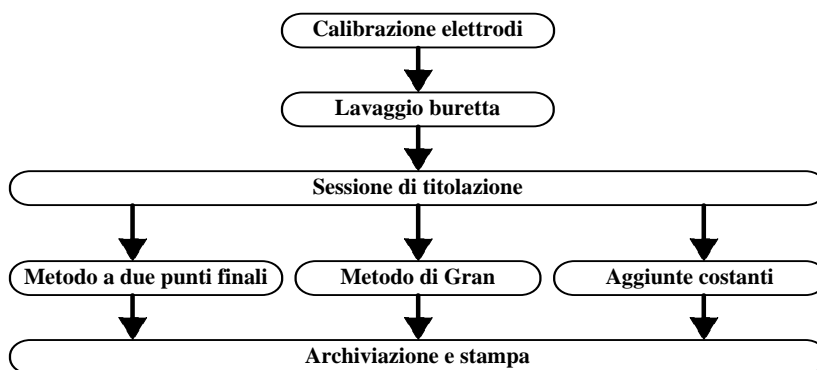


Fig. 3.6. Diagramma dei vari moduli richiamabili dal programma *wAlk*.

La calibrazione degli elettrodi permette di leggere due soluzioni tampone e di aggiornare ed archiviare i coefficienti della retta di taratura; ad ogni sessione di titolazioni la calibrazione viene richiamata avvisando l'operatore della data dell'ultima taratura e imponendo una nuova calibrazione nel caso sia trascorsa più di una settimana dall'ultima calibrazione.

L'operazione di lavaggio della buretta permette l'eliminazione di eventuali bolle d'aria formatesi nel pistone o nei tubi di erogazione del titolante.

La sessione di titolazione consiste in una serie di determinazioni consecutive su un gruppo di campioni condotte dallo stesso operatore nella stessa data, con il medesimo titolante e con gli stessi parametri di calibrazione degli elettrodi. All'interno della sessione di titolazione per ogni campione analizzato si potrà scegliere il metodo da utilizzare (due punti finali, Gran o aggiunte costanti), il volume di campione titolato (prelevato con una pipetta o per pesata) ed altri parametri caratteristici del metodo utilizzato (primo volume aggiunto, numero di punti per il metodo di Gran, ecc.).

Le titolazioni con i metodi a due punti finali e di Gran vengono condotte secondo i principi teorici precedentemente descritti, mentre la titolazione ad aggiunte costanti non è un metodo per la determinazione dell'alcalinità, ma ha lo scopo di produrre una curva di titolazione con punti equidistanti al fine di trasferire i dati ad un foglio elettronico del tipo Microsoft Excel per successive elaborazioni matematiche e per lo studio in dettaglio del processo di titolazione.

Tutti i risultati delle titolazioni vengono automaticamente archiviati su disco in coda ad un file chiamato GIORNALE.MDB; l'utilizzatore ha poi la possibilità di creare un nuovo *giornale* archiviando quello precedente con un altro nome (ad es. APRILE95.MDB). Il GIORNALE.MDB ed i vecchi giornali rinominati restano disponibili su disco e possono essere richiamati e stampati in ogni momento con il programma *wAlk* o con il programma Microsoft Access.

Operazioni preliminari

In questa descrizione si fa specificatamente riferimento alla strumentazione precedentemente descritta. Per quanto riguarda le modalità di conservazione e manutenzione degli elettrodi, fare riferimento alla metodica per la determinazione del pH.

Verificare che gli elettrodi siano correttamente installati sul supporto SAM90 e che il cloruro di potassio dell'elettrodo di riferimento non sia impaccato sul setto poroso.

Portare i campioni da analizzare alla temperatura ambiente (18-24 °C); qualora si debba tarare il pHmetro utilizzare tamponi conservati a temperatura ambiente.

Accendere la buretta ABU91 ed il *personal computer* ed attivare il programma *wAlk* dall'ambiente Microsoft Windows.

Procedimento

Di seguito vengono sommariamente descritte le principali fasi della determinazione, maggiori chiarimenti relativi alle singole parti del programma ed alle possibili condizioni operative, sono approfonditamente descritti nella guida di *wAlk* (tasto F1) organizzata per argomenti e contestualmente all'operazione in via di svolgimento.

Prima di procedere con le titolazioni dei campioni, lo strumento deve essere tarato con le soluzioni tampone; alla taratura si accede dal menù Opzioni. La taratura consiste in una regressione lineare fra il potenziale elettrico in mV misurato dagli elettrodi ed il pH delle soluzioni tampone a pH 7 e 4.

La taratura viene solitamente eseguita all'inizio di ogni settimana e viene utilizzata per un periodo massimo di 7 giorni.

In tutte le fasi della taratura bisogna prestare molta attenzione al risciacquo degli elettrodi prima con acqua deionizzata poi con il tampone da utilizzare.

La titolazione dei campioni ha inizio con l'apertura di una nuova sessione di lavoro, con la visualizzazione della data dell'ultima taratura e la possibilità di procedere con una nuova calibrazione.

Vengono poi impostati i principali parametri della sessione riguardanti la titolazione a due punti finali, il metodo di Gran e per le aggiunte costanti; il tasto DEFAULT permette di reimpostare i valori base delle titolazioni.

All'interno della sessione di lavoro vengono visualizzati tutti i principali parametri della sessione: la data di analisi, la normalità del titolante, gli *end point* per il metodo a due punti finali, le condizioni per la regressione di Gran e la taratura degli elettrodi del pHmetro con la data, la temperatura dei tamponi, l'equazione della retta, i tamponi utilizzati ed il loro potenziale in mV e la pendenza (mV per unità pH) il cui valore deve avvicinarsi al valore teorico di 59,16 mV a 25 °C.

Prima di iniziare un ciclo di titolazioni dal menù Opzioni eseguire un lavaggio della buretta, al fine di eliminare eventuali bolle d'aria formatesi nel sistema di erogazione del titolante.

La scelta del metodo di titolazione da utilizzare avviene dal menù Titolazioni ed è lasciata all'operatore in quanto entrambi i metodi (a due punti finali e di Gran) danno risultati analoghi per le determinazioni di alcalinità superiori a 0,15 meq l⁻¹, mentre sotto questo valore è preferibile utilizzare il metodo di Gran, più preciso in quanto utilizza un maggiore numero di punti (tra 5 e 20). Il metodo ad aggiunte costanti solitamente non viene utilizzato per le determinazioni di *routine* dell'alcalinità, ma è utile per seguire in dettaglio un intero processo di titolazione al fine di approfondire ed ottimizzare le condizioni operative, od esportare ad altri programmi i dati necessari per eseguire successivamente ulteriori o particolari elaborazioni.

Con il metodo a due punti finali se l'alcalinità è inferiore al valore impostato nella soglia di Gran (0,15 meq l⁻¹) il programma *wAlk* prosegue automaticamente la titolazione utilizzando il metodo di Gran su sei aggiunte di titolante; a fine titolazione vengono riportati i risultati ottenuti con entrambi i metodi.

Con il metodo di Gran è possibile determinare l'acidità forte presente nei campioni con pH minore di 5,5; per questa misura il programma chiede conferma all'operatore prima di proseguire con la determinazione dell'acidità forte.

La procedura analitica da seguire per ogni titolazione è la seguente:

- lavare accuratamente gli elettrodi ed il puntale con acqua deionizzata ed asciugare leggermente con carta da filtro;
- prelevare con pipetta o per pesata il volume di campione preventivamente termostato a temperatura ambiente, immergervi gli elettrodi ed attivare l'agitazione;
- dal menù Titolazioni scegliere il tipo di titolazione da eseguire, impostare il nome del campione ed il volume titolato e premere il tasto OK per iniziare la titolazione che da questo momento procederà automaticamente;
- a fine titolazione dopo il segnale acustico si può proseguire con il tasto GO per analizzare un altro campione con lo stesso metodo oppure tornare alla finestra principale con il comando Esci dal menù Opzioni;

- togliere il campione titolato e riprendere con il campione successivo dal lavaggio degli elettrodi;
- al termine delle titolazioni riporre il puntale del titolante nell'apposita sede sul tappo della bottiglia, chiudere la sessione di titolazioni e spegnere l'agitatore e la buretta.

La stampa dei risultati delle titolazioni di una sessione di lavoro può essere eseguita prima di chiudere la sessione dal menù File, Stampa, oppure dal menù principale con il comando File, Stampa dal quale si può selezionare la stampa delle sessioni contenute nel file di archivio denominato GIORNALE.MDB.

Al fine di verificare l'attendibilità delle titolazioni, vengono stampati tutti i parametri utilizzati nei calcoli ed il coefficiente di correlazione della retta di regressione lineare secondo Gran.

Verifica della concentrazione dell'acido cloridrico

La concentrazione reale del titolante deve essere verificata immediatamente dopo la preparazione e periodicamente ogni due mesi; se conservato in bottiglia ermetica. L'acido si può conservare ed utilizzare fino a sei mesi dalla data di preparazione.

Il controllo della concentrazione viene eseguita con le seguenti soluzioni di sodio carbonato a concentrazione nota che vengono titolate con la stessa procedura seguita per i campioni.

La normalità reale dell'acido cloridrico è quindi calcolata dalla media delle titolazioni eseguite sulle soluzioni *standard*.

$$\text{Conc. reale} = \frac{\text{conc. standard}}{\text{conc. ottenuta dalla titolazione}} \times \text{conc. nominale}$$

Soluzione madre:

Essiccare 3-5 g di sodio carbonato di grado analitico a 250°C per 4 ore, raffreddare in essiccatore e procedere con la seguente pesata:

1,0599 g di sodio carbonato in un matraccio da 1000 ml = 20 meq l⁻¹

Soluzioni *standard*:

0,100 meq l⁻¹ diluizione di 5 ml di soluzione madre in matraccio da 1000 ml;

0,500 meq l⁻¹ diluizione di 25 ml di soluzione madre in matraccio da 1000 ml;

2,000 meq l⁻¹ diluizione di 50 ml di soluzione madre in matraccio da 500 ml.

Calcolo della concentrazione:

$$\text{Conc. reale (N)} = \frac{\text{conc. standard (meq l}^{-1}\text{)}}{\text{conc. ottenuta dalla titolazione (meq l}^{-1}\text{)}} \times 0,05 \text{ (N)}$$

Riferimenti bibliografici

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (Method 2320 B). Amer. Publ. Health Ass., Washington.
- Galloway J. N., B. J. Cosby & G. E. Likens. 1979. Acid precipitation: measurement of pH and acidity. *Limnol. Oceanogr.*, 24 (6): 1161-1165.
- Gran G. 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titration II. *Analyst* 77: 661-671.
- Migdley, D. & K. Torrance. 1978. *Potentiometric water analysis*. Wiley & Sons, Chichester: 409 pp.
- McQuarke N.R., P.D. Kluckner & D.K. Sandelberg. 1983. Chemical analysis of acid precipitation: pH and acidity determinations. *Environ. Sci. Technol.* 17: 431-435.
- Molvaersmyr K. & W. Lund. 1983. Acid and bases in fresh-water: interpretation of results from Gran plot. *Water Res.*, vol. 17, N° 3: 303-307.
- Serrini, G., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, H. Muntau, G. Serrini Lanza, G.A. Tartari & R. Mosello 1995. Problemi e metodi nella determinazione dell'alcalinità. *Acqua Aria*. 4; 27-36.
- Marchetto, A., M. Bianchi, H. Geiss, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini-Lanza, G.A. Tartari & R. Mosello. 1997. Performances of analytical methods for freshwater analysis assassted through intercomparison exercises. I. Total alkalinity. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 56: 1-13.

3.6. ANALISI IN SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO MOLECOLARE

In questo capitolo vengono trattate alcune determinazioni spettrofotometriche in assorbimento molecolare nella zona di lunghezze d'onda del visibile (380-750 nm), dell'ultravioletto (200-380 nm) e del vicino infrarosso (750-900 nm). Queste determinazioni si basano sulle reazioni che intervengono fra l'analita ed i reattivi progressivamente aggiunti che portano alla formazione di composti che assorbono energia luminosa in quantità proporzionale alla concentrazione dell'analita; il composto formato deve essere stabile per un periodo sufficientemente lungo (1-3 ore) per permettere la determinazione spettrofotometrica.

Il processo analitico si può così sintetizzare: prelievo del campione, aggiunta del primo reattivo, eventuale attesa per la reazione, aggiunta di eventuali altri reattivi, attesa fino a formazione completa e stabile del composto assorbente, lettura spettrofotometrica del valore di assorbanza a lunghezza d'onda fissa e calcolo della concentrazione utilizzando una retta di calibrazione.

Le analisi in assorbimento molecolare di seguito descritte sono quelle risultate più adatte all'uso in campo limnologico, sulla base dell'esperienza acquisita, e sono attualmente in uso presso il laboratorio di idrochimica del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia.

Ogni metodo viene introdotto con una breve descrizione sul principio della determinazione; in forma tabellare viene poi riportato il passo ottico delle cuvette utilizzate, il *range* comunemente utilizzato all'interno del laboratorio in riferimento al passo ottico delle cuvette, i valori di LOD ed LOQ, calcolati come descritto nel paragrafo 4.2.2, e le informazioni riguardanti la ripetibilità del metodo a diverse concentrazioni, ottenuti sulla base delle carte di controllo utilizzate nel laboratorio nel periodo 1992 - 96. I valori riportati nelle tabelle si riferiscono alle condizioni ottimizzate per l'analisi di routine presso il laboratorio dell'Istituto, eventuali adattamenti ad altri *range* di utilizzo richiedono adeguate verifiche analitiche. Vengono poi descritti i reagenti necessari per la determinazione, il procedimento analitico e gli *standard* utilizzati per la preparazione e la verifica della calibrazione; al termine

si riportano i calcoli ed i riferimenti bibliografici da cui sono tratte le metodiche. Nelle descrizioni verrà fatto riferimento esclusivamente agli aspetti pratici più direttamente collegati all'uso dei metodi; per una trattazione più approfondita dei concetti di base riguardanti i metodi spettrofotometrici e le caratteristiche strumentali si rimanda a Saini & Liberti (1980), Denney & Sinclair (1987) e Fresenius *et al.* (1988).

3.6.1. AZZERAMENTO STRUMENTALE CON I BIANCHI

L'azzeramento dello spettrofotometro è una fase molto delicata che richiede il rispetto di alcune regole, indispensabili per ottenere dati analitici attendibili e confrontabili. Questa fase viene spesso sottovalutata perché non si conoscono a fondo le informazioni che si possono trarre da questa procedura.

Per la procedura di azzeramento lo spettrofotometro e la lampada ad incandescenza per le letture nel visibile, o la lampada a deuterio utilizzata nell'ultravioletto, devono essere accesi per almeno 15 minuti prima di iniziare le misure, al fine di ottenere una buona stabilità strumentale.

Le cuvette o celle per lettura spettrofotometrica possono essere di vario tipo: in commercio vi sono molti modelli a diversa forma e dimensione. I passi ottici sono generalmente compresi tra 5 e 100 mm, ma i più utilizzati sono 10, 20 e 40 o 50 mm. Per l'utilizzo con i metodi descritti in questo capitolo si consiglia l'uso di cuvette rettangolari possibilmente otticamente appaiate, ricordando che devono essere in vetro per le analisi nel visibile, ed in quarzo per l'analisi nell'ultravioletto (al di sotto di 350 nm). Sconsigliato è l'uso di cuvette monouso in materiale plastico che possono dare risultati poco attendibili a causa della variabilità costruttiva. Le cuvette vanno sempre maneggiate con cura senza toccare la parte ottica attraversata dal raggio di lettura; per la loro pulizia si consiglia il lavaggio con acqua deionizzata, dopo ogni serie di letture, ed un periodico lavaggio ad immersione in acido solforico diluito 1:1 o in detergenti per il lavaggio della vetreria, seguito da un risciacquo in acqua deionizzata. L'asciugatura prima dell'uso in lettura si esegue con morbida carta assorbente e senza eccessivi sfregamenti, evitando assolutamente di lasciare impronte digitali sulle parti ottiche. Per la conservazione tra una lettura e l'altra si consiglia l'immersione in acqua deionizzata. Altre attenzioni durante l'uso delle celle per spettrofotometria riguardano l'utilizzo di soluzioni fredde che possono provocare condensa sulle superfici ottiche, la formazione di bollicine sulle pareti interne della cella che possono alterare la misura e l'inserimento delle celle nello spettrofotometro, che deve avvenire sempre nella stessa posizione e con lo stesso orientamento.

Prima di passare alle modalità di azzeramento chiariamo il concetto di bianco: esso è generalmente costituito da un volume di acqua ultrapura uguale al volume prelevato da ogni campione per l'analisi; il bianco segue tutta la procedura prevista dal metodo analitico (pretrattamento, aggiunta di reattivi, attese per la formazione del colorante, ecc.). Assumendo che l'analita non sia presente nell'acqua ultrapura, ne deriva che il valore di assorbanza del bianco rappresenta la somma di tutti i possibili inquinamenti avvenuti durante la manipolazione e dell'eventuale inquinamento dei prodotti chimici costituenti i reattivi. Il valore del bianco deve quindi essere sottratto dal valore in assorbanza di ogni campione in quanto non fa parte del campione. Normalmente per ogni serie di campioni analizzata vengono determinati tre

bianchi ed il loro valore medio viene sottratto a tutti i campioni con la procedura di azzeramento dello spettrofotometro. Per un'ulteriore approfondimento sull'utilizzo delle informazioni derivanti dai bianchi si veda il capitolo 4.2.2.

Le procedure di azzeramento dello spettrofotometro e di lettura dei bianchi vengono qui elencate in modo consecutivo insieme al loro diverso significato:

- azzeramento con aria in assenza delle cuvette: permette di verificare la stabilità dello spettrofotometro verificandone l'eventuale deriva fino alla stabilizzazione;
- azzeramento con le cuvette contenenti acqua deionizzata: permette di controllare la qualità ottica delle cuvette (appaiamento, superfici difettate o altro); normalmente l'assorbimento di una singola cuvetta rispetto all'azzeramento con aria oscilla tra 0,020 e 0,100 u.A a seconda del passo ottico (da 1 a 10 cm) e della lunghezza d'onda;
- lettura dei valori di assorbanza ottenuti da tre bianchi: permette di verificare la qualità della procedura analitica (reattivi e manipolazioni varie), i valori possono variare a seconda delle determinazioni e dei passi ottici delle cuvette, normalmente oscillano tra 0,001 e 0,050 u.A;
- azzeramento con il bianco più rappresentativo o vicino al valore medio; permette di sottrarre dai campioni le varie fonti di inquinamento derivanti dai reattivi o dalle manipolazioni inerenti alla determinazione.

Terminato l'azzeramento con i bianchi, prima di iniziare le letture dei campioni, è consigliabile annotarsi il valore di assorbanza negativa che lo spettrofotometro visualizza in assenza della cuvetta di lettura (pari alla somma di tutti i precedenti azzeramenti rispetto all'azzeramento con aria, ad esempio -0,078 u.A); questo valore deve restare costante per tutto il tempo della lettura dei campioni come indice di stabilità dello strumento; qualora vi fosse una deriva si deve eseguire un altro azzeramento con lo stesso bianco precedentemente utilizzato (il più significativo).

3.6.2. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE

Vengono qui trattati alcuni concetti generalizzabili a tutte le determinazioni in assorbimento molecolare, quali la frequenza di calibrazione, la linearità ed il confronto della retta di calibrazione attuale con le precedenti calibrazioni.

Le determinazioni spettrofotometriche descritte in questo capitolo sono caratterizzate da una notevole ripetibilità nel tempo, determinata dalla stabilità del composto generato per reazione tra l'analita ed i reattivi aggiunti. Per questi motivi le calibrazioni eseguite in anni diversi risultano perfettamente confrontabili, pertanto risulta sufficiente eseguire delle calibrazioni annuali allo scopo di verificare la confrontabilità della determinazione ed in particolare la stabilità della risposta strumentale dello spettrofotometro.

Tutte le determinazioni spettrofotometriche descritte hanno andamento lineare nel *range* di concentrazioni usato. La condizione ottimale per eseguire con buona precisione la regressione lineare è l'utilizzo di almeno sei *standard* distribuiti con maggior dettaglio sulle basse concentrazioni (Fig. 3.7.). Lo *standard* a concentrazione più elevata non deve superare i valori di 1,2-1,5 unità di assorbanza corrispondenti al 6-3% di trasmittanza; oltre questi valori si superano le condizioni di linearità di quasi tutti gli spettrofotometri e della Legge di Lambert e Beer (Denney & Sin-

clair 1987). Come esempio di regressione si riporta la retta di calibrazione del fosforo totale eseguita con una cuvetta a passo ottico di 4 cm alla lunghezza d'onda di 882 nm, utilizzando gli *standard* descritti nel metodo al paragrafo 3.6.7. Dai valori di assorbanza ottenuti dall'analisi di ciascun *standard* e riportati in tabella 3.7. ed in figura 3.7, si ottiene la seguente retta di regressione:

$$\mu\text{g P l}^{-1} = 0,37 + 395,16 \text{ u.A}$$

con coefficiente di correlazione lineare: $r = 0,99999$

La qualità della retta viene evidenziata dal coefficiente di correlazione lineare (r), il cui valore tende all'unità quando si ha una perfetta correlazione. Un'ulteriore verifica della qualità della regressione può essere eseguita ricalcolando dalla retta il valore di concentrazione degli *standard* partendo dalle assorbanze misurate; come si può vedere in tabella 3.7, nel caso considerato le differenze fra concentrazione dello *standard* e concentrazione calcolata, non superano mai il valore di $1 \mu\text{g P l}^{-1}$.

Un controllo ancora più accurato sulla regressione lineare può essere effettuato calcolando per ogni *standard* il fattore di risposta (RF) per unità di concentrazione (Green 1996, Dorschel *et al.* 1989).

$$\text{RF} = \frac{\text{segnale u.A}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

Valori di RF costanti indicano un'ottima correlazione lineare (Tab. 3.7. e Fig. 3.7.), mentre significative variazioni sul valore di RF indicano una bassa correlazione lineare tra *standard* e segnale; tali condizioni possono essere indice di errori nella preparazione delle soluzioni calibranti o di andamenti non lineari che richiedono altri tipi di calibrazione, ad esempio quella quadratica.

Tab. 3.7. Valori di assorbanza misurati alla lunghezza d'onda di 882 nm, relativi alla concentrazione degli *standard* utilizzati per la calibrazione del fosforo totale, concentrazioni calcolate dalla retta di calibrazione (a , intercetta, b , pendenza) e fattore di risposta (RF) per unità di concentrazione.

Assorbanza cuvetta 4 cm u.A	Concentrazione <i>standard</i> $\mu\text{g P l}^{-1}$	Concentrazione calcolata $\mu\text{g P l}^{-1} = a + b \text{ u.A}$	Fattore di risposta per unità di concentrazione $\text{RF} = \text{u.A} / \mu\text{g P l}^{-1} \text{ standard}$
0,0099	4	4	0,00245
0,0202	8	8	0,00253
0,0306	12	12	0,00256
0,0403	16	16	0,00252
0,0754	30	30	0,00251
0,1490	60	59	0,00248
0,2515	100	100	0,00252
0,5018	200	199	0,00251
1,0133	400	401	0,00253

Al fine di mantenere la confrontabilità dei risultati nel tempo, è necessario procedere anche al confronto delle assorbanze ottenute per i diversi *standard* nell'attuale calibrazione con quelle delle precedenti calibrazioni. Come esempio vengono riportati in tabella 3.8. gli *standard* di calibrazione ed i valori di assorbanza ottenuti in dieci anni di calibrazioni del fosforo totale. I parametri statistici evidenziano piccole

variazioni, giustificabili con gli errori associati alla preparazione degli *standard* e con le variazioni intervenute nello spettrofotometro utilizzato per le letture. Infatti come già descritto nella tabella 1.1, dal 1985 al 1996 sono stati utilizzati tre spettrofotometri diversi. In particolare l'evidente aumento del valore di assorbanza, che si è avuto nell'anno 1992 per gli *standard* a concentrazione più elevata, è attribuibile al diverso spettrofotometro avente *range* di lavoro più ampio dei precedenti (190-1100 nm rispetto a 190-900 nm); tale strumento è in grado di eseguire misure più accurate alla lunghezza d'onda di lettura del fosforo (882 nm), valore al limite delle possibilità strumentali dei precedenti spettrofotometri.

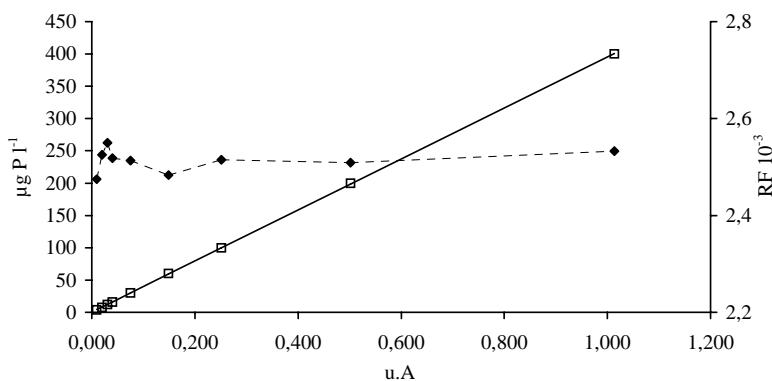


Fig. 3.7. Esempio di retta di regressione lineare (□) per la determinazione del fosforo totale con il metodo spettrofotometrico e visualizzazione del fattore di risposta (RF ◆) per unità di concentrazione (cuvetta da 4 cm).

Tab. 3.8. Valori di assorbanza (u.A) relativi agli *standard* utilizzati per la calibrazione del fosforo totale in anni diversi con cuvetta da 4 cm di passo ottico. Statistica con media, deviazione *standard* (D.S.) e coefficiente di variazione percentuale (C.V.%).

Standard di calibrazione µg P l ⁻¹	1985	1987	1989	1990	1991	1992	1993	1995	Statistica		
									Media	D.S.	C.V.%
4	0,012	0,010	0,011	0,008	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,001	11.1
8	0,024	0,017	0,020	0,019	0,017	0,020	0,020	0,020	0,020	0,002	11.2
16	0,041	0,037	0,039	0,039	0,035	0,031	0,031	0,031	0,031	0,004	11.6
30	0,077	0,069	0,073	0,073	0,067	0,076	0,076	0,075	0,073	0,004	4.9
60	0,152	0,146	0,146	0,146	0,139	0,150	0,151	0,149	0,147	0,004	2.8
100	0,241	0,243	0,241	0,243	0,235	0,251	0,253	0,252	0,245	0,006	2.6
200	0,484	0,485	0,488	0,489	0,476	0,498	0,504	0,502	0,491	0,010	2.0
400	0,950	0,955	0,958	0,965	0,950	1,002	1,006	1,013	0,975	0,027	2.8

Un'ulteriore verifica della stabilità delle calibrazioni può essere effettuata confrontando i valori di pendenza ed intercetta ottenuti dalle calibrazioni eseguite nel corso degli anni con lo stesso metodo e nello stesso *range* di concentrazioni; la tabella 3.9. riporta l'esempio del fosforo totale con le rette eseguite nel periodo 1985-1995.

Tab. 3.9. Valori di pendenza ed intercetta ottenuti dalle calibrazioni lineari eseguite dal 1985 al 1995 nella determinazione del fosforo totale con cuvetta da 4 cm di passo ottico. Statistica con media, deviazione *standard* (D.S.) e coefficiente di variazione percentuale (C.V. %).

Data della calibrazione	Pendenza	Intercetta
17/01/85	422	-2,3
08/06/87	417	-0,7
11/01/89	417	-0,7
31/05/90	414	-0,2
30/04/91	420	+1,1
06/08/92	400	-0,1
23/11/93	398	-0,2
25/01/95	395	+0,4
Media	410	-0,3
D.S.	11	1,0
C.V. %	2,7	

Come si può vedere le variazioni sono molto contenute ed in particolare il coefficiente di variazione percentuale sulla pendenza è molto basso (2,7%). Analoghi risultati si ottengono dal confronto delle rette di regressione lineare ottenute dalle calibrazioni dei metodi in assorbimento molecolare descritti in questo capitolo; la tabella 3.10. riassume per ogni metodo i valori medi e le deviazioni *standard* di pendenza ed intercetta delle calibrazioni eseguite a partire dall'inizio degli anni ottanta, evidenziando una notevole stabilità di risposta delle metodiche nel tempo (coefficienti di variazione percentuale compresi tra 1 e 5%).

Tab. 3.10. Valori medi e deviazioni *standard* (D.S.) della pendenza e dell'intercetta delle rette di regressione lineare eseguite per ogni variabile analizzata con i metodi in assorbimento molecolare descritti nel capitolo 3.6; (*range* di calibrazione; periodo di confronto; n° cal., numero di calibrazioni nel periodo; p.o., passo ottico della cuvetta).

Variabile e unità di misura	Range	Periodo	n° cal.	p.o. cm	Pendenza		Intercetta		
					media	D.S.	media	D.S.	
NO ₃	µg N l ⁻¹	100 - 2000	1982 - '87	10	2	1491	21	-15	5
NO ₃	mg N l ⁻¹	1,00 - 6,00	1985 - '86	3	0,5	5,94	0,01	-0,10	0,01
NO ₂	µg N l ⁻¹	1 - 100	1982 - '95	9	4	71	3	-0,1	0,5
NH ₄	µg N l ⁻¹	5 - 200	1983 - '95	15	4	252	13	0,89	0,97
NH ₄	µg N l ⁻¹	100 - 1400	1983 - '95	12	1	991	34	-7,0	8,9
PO ₄	µg P l ⁻¹	4 - 400	1984 - '95	11	4	370	12	-0,05	1,19
PO ₄	µg P l ⁻¹	4 - 30	1989 - '95	6	10	147	3	0,6	0,4
PT	µg P l ⁻¹	4 - 400	1985 - '95	8	4	410	11	-0,3	1,0
PT	µg P l ⁻¹	4 - 30	1989 - '95	6	10	162	6	0,2	0,2
NT	mg N l ⁻¹	0,40 - 6,00	1983 - '95	12	1	4,6	0,2	-0,11	0,17
NT	mg N l ⁻¹	0,40 - 2,00	1992 - '95	3	2	2,31	0,03	-0,0011	0,001
Si	mg Si l ⁻¹	0,05 - 1,00	1983 - '90	7	2	0,93	0,02	-0,005	0,003
Si	mg Si l ⁻¹	0,40 - 5,00	1982 - '90	10	0,5	3,7	0,2	-0,0001	0,0161

In conclusione le modalità di calibrazione per le determinazioni spettrofotometriche descritte in questo capitolo si possono così sintetizzare:

- calibrazione lineare (6-8 punti) eseguita utilizzando sempre gli *standard* preparati alle stesse concentrazioni e con le stesse modalità (quantità di sale pesata e diluizioni);
- frequenza di ricalibrazione ogni 12-18 mesi, avente lo scopo di confrontare e verificare la stabilità della procedura analitica e della risposta dello spettrofotometro nel *range* di utilizzo della metodica.

3.6.3. NITRATI

Principio del metodo

Gli ioni nitrato reagiscono con il sodio salicilato con formazione del sodio nitrosalicilato avente colorazione gialla il cui spettro di assorbimento presenta un massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.11. *Range* di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi dei nitrati con il metodo spettrofotometrico a diverse concentrazioni espresse in mg N l^{-1}

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
2	0,050 - 2,000	0,030	0,090	0,200	3,2
				0,984	1,2
				1,464	0,9
1	1,00 - 6,00		0,90	2,84	2,4
				3,01	2,0

Reagenti

- I - Sodio salicilato al 2,5%: sciogliere 0,75 g di sodio salicilato per analisi in 30 ml di acqua deionizzata; questa soluzione va preparata giornalmente.
- II - Acido solforico concentrato (densità 1,84) per analisi.
- III - Sodio idrossido 8 N (32%) per analisi.
- IV - Sodio idrossido 2,5 N preparato per diluizione di 320 ml di sodio idrossido 8 N a litro con acqua deionizzata.

Procedimento

Per queste analisi utilizzare capsule di porcellana a forma bassa di circa 8 cm di diametro, precedentemente lavate con acido solforico concentrato e risciacquate con acqua deionizzata. Sono inoltre necessari dei matracci tarati da 25 ml da utilizzare solo per questa determinazione.

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco come verifica della procedura analitica.

Con una pipetta prelevare in doppio 10 ml di campione ed aggiungere 0,2 ml di sodio salicilato al 2,5% (I), il campione va portato a secco utilizzando un bagnomaria a 80 °C e deve essere rimosso non appena l'acqua è evaporata completamente.

Il residuo viene ripreso con 1 ml di acido solforico concentrato (II) lavando le pareti della capsula mediante inclinazione e rotazione; dopo circa dieci minuti aggiungere 9 ml di acqua deionizzata, lasciare raffreddare e aggiungere 7 ml di sodio idrossido 8 N (III).

Versare in un matraccio tarato da 25 ml e lavare due volte la capsula con 3 ml di sodio idrossido 2,5 N (IV) versando poi nel matraccio, portare a volume con sodio idrossido 2,5 N ed agitare.

La lettura spettrofotometrica si esegue alla lunghezza d'onda di 420 nm azzeando lo strumento con acqua deionizzata.

Al termine della lettura lavare capsule e matracci con acqua calda e risciacquarli con acqua deionizzata, per le capsule è consigliabile la conservazione in acido solforico concentrato.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di potassio nitrato con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.12 e prelevarne in doppio 10 ml, avendo cura di procedere in ordine crescente dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Soluzioni madre:

- A - 0,72185 g KNO₃ in 1000 ml = 100 µg N ml⁻¹
 B - 10 ml di A in 100 ml = 10 µg N ml⁻¹

Tab. 3.12. Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo spettrofotometrico dei nitrati.

Concentrazione mg N l ⁻¹	Prelievo		Volume finale ml
	madre A	madre B	
0,050		1000 µl	200
0,100		2000 µl	200
0,200		2000 µl	100
0,500		5000 µl	100
1,000	1000 µl		100
1,500	3000 µl		200
2,00	5000 µl		250
3,00	3000 µl		100
5,00	5000 µl		100
6,00	6 ml		100

Si riportano come esempio le equazioni delle regressioni lineari ed i coefficienti di correlazione lineare (r) relativi a due diversi *range* di lavoro.

Range 50 - 2000 µg N l⁻¹ (utilizzati i primi 7 *standard* riportati in tabella 3.12).
 Cuvetta con passo ottico di 2 cm

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 1460 \text{ u.A} - 22,3 \quad r = 0,99987$$

Range 1,00 - 6,00 mg N l⁻¹ (utilizzati i 6 standard da 1,00 a 6,00 mg l⁻¹, riportati in tabella 3.12).

Cuvetta con passo ottico di 1 cm

$$\text{mg N l}^{-1} = 3,14 \text{ u.A} - 0,006 \quad r = 0,99953$$

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,005 e 0,015 u.A per le cuvette da 2 cm e tra 0,002 e 0,010 u.A per le cuvette da 1 cm); si calcola poi la concentrazione mediante la retta di taratura.

Riferimenti bibliografici

Rodier, J. 1978. *L'analyse de l'eau*. Dunod, Paris: 1136 pp.

3.6.4. NITRITI

Principio del metodo

In ambiente acido per diazotazione dell'acido solfanilico con l'azoto nitroso si ha la formazione dell'acido para-diazobenzene-solfonico; successivamente l'aggiunta di N-(1 naftil)etilendiammina bicloridrato porta alla formazione di un composto rosso-violetto il cui spettro di assorbimento presenta il massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 543 nm.

Range di utilizzo

Tab. 3.13. Range di utilizzo, LOD e LOQ dell'analisi dei nitriti con il metodo spettrofotometrico a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g N l}^{-1}$

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ
4	1 - 100	1	3

Reagenti

I - Aggiungere a 25 ml di acido cloridrico 37%, diluiti con circa 150 ml di acqua deionizzata, 2,5 g di sulfanilammide e dopo dissoluzione portare al volume finale di 250 ml.

Questa soluzione è stabile per circa sei mesi se conservata in frigorifero a 4 °C.

II - Sciogliere 0,25 g di N-(1 naftil)etilendiammina bicloridrato in 250 ml di acqua deionizzata.

Questo reattivo è stabile per un mese se conservato in bottiglia scura in frigorifero a 4°C.

Procedimento

Per queste analisi utilizzare beute da 50 ml lavate con normale detersivo da laboratorio.

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco come verifica della seguente procedura analitica.

Con una pipetta prelevare 25 ml di campione e agitando dopo ogni aggiunta, aggiungere nell'ordine 0,5 ml di reattivo I, attendere 10 minuti e 0,5 ml di reattivo II.

La lettura spettrofotometrica si esegue dopo 15 minuti ed entro 2 ore alla lunghezza d'onda di 543 nm azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sodio nitrito con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.14. e prelevarne in doppio 25 ml, avendo cura di procedere in ordine crescente dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione. Continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Per la preparazione degli *standard* utilizzare matracci tarati lavati con acqua deionizzata.

Soluzioni madre:

- A - 0,98518 g NaNO₂ in 1000 ml = 200 µg N ml⁻¹
 B - 5 ml di A in 1000 ml = 1 µg N ml⁻¹

Tab. 3.14. Diluizioni della soluzione madre B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo spettrofotometrico dei nitriti

Concentrazione µg N l ⁻¹	Prelievo madre B	Volume finale ml
1	500 µl	500
3	1500 µl	500
5	5000 µl	1000
10	1000 µl	100
30	3000 µl	100
50	5000 µl	100
70	7 ml	100
100	10 ml	100

Si riporta come esempio l'equazione della regressione lineare ed il coefficiente di correlazione lineare (r), relativi al *range* di lavoro 1-100 µg N l⁻¹, utilizzando una cuvetta con passo ottico da 4 cm.

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 70,5 \text{ u.A} - 0,078 \quad r = 0,99997$$

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,002 e 0,008 u.A) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura.

Esprimere la concentrazione in $\mu\text{g N l}^{-1}$ arrotondando all'unità.

Riferimenti bibliografici

A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1981. *Standard methods for the examination of water and wastewater (Method 419)*. Am. Publ. Health Ass., Washington: 1134 pp.

3.6.5. AMMONIO

Principio del metodo

In presenza del catalizzatore sodio nitroprussiato lo ione ammonio reagisce con il gruppo fenolico presente nel sodio salicilato; l'azione ossidante del sodio dicloro isocianurato porta alla formazione del composto blu indofenolo il cui spettro presenta un massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 690 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.15. Range di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi dell'ammonio con il metodo spettrofotometrico a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g N l}^{-1}$

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
4	5 - 200	5	20	46	8,2
				177	2,1
1	100 - 1500		100	320	3,4
				475	2,0
				940	2,4
				1055	1,5

Reagenti

- I - 200 g di sodio citrato tribasico biidrato e 20 g di sodio idrossido in gocce vengono sciolti in 1000 ml di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo è stabile per sei mesi.
- II - 0,5 g di sodio nitroprussiato e 42,5 g di sodio salicilato (Merck n. 6601) vengono sciolti in 250 ml di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo va conservato al buio ed è stabile per due settimane.
- III - 0,116 g di sodio dicloro isocianurato (Kodak n. 10511) vengono sciolti in 20 ml di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.
- IV - miscela ossidante: 80 ml della soluzione I vengono miscelati con 20 ml della soluzione III. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.

Procedimento

Per queste analisi utilizzare beute da 50 ml con tappo a vite, precedentemente risciacquate con acqua deionizzata ultrapura; periodicamente (ogni 2-3 mesi) si consiglia un lavaggio più energico con acido solforico concentrato seguito da un risciacquo con acqua deionizzata.

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco come verifica della procedura analitica.

Con una pipetta prelevare 25 ml di campione ed, agitando dopo ogni aggiunta di reattivo, aggiungere nell'ordine 1 ml della soluzione II e 1 ml della soluzione ossidante IV. Tappare le beute ed attendere un'ora prima della lettura spettrofotometrica.

La lettura spettrofotometrica si esegue alla lunghezza d'onda di 690 nm, azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sale con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.16 e prelevare in doppio 25 ml, avendo cura di procedere in ordine crescente dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Per la preparazione degli *standard* utilizzare matracci tarati lavati con acido solforico e risciacquati con acqua ultrapura.

Soluzioni madre:

$$\begin{aligned} \text{A} - & 0,76378 \text{ g NH}_4\text{Cl in 1000 ml} & = & 200 \mu\text{g N ml}^{-1} \\ \text{B} - & 10 \text{ ml di A in 1000 ml} & = & 2 \mu\text{g N ml}^{-1} \end{aligned}$$

Si riportano come esempio le equazioni delle regressioni lineari ed i coefficienti di correlazione lineare (*r*) relativi a due diversi *range* di lavoro.

Range 5-200 $\mu\text{g N l}^{-1}$ (utilizzati i primi 7 *standard* riportati in tabella 3.16.).

Cuvetta con passo ottico di 4 cm

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 249,79 \text{ u.A} - 0,037 \quad r = 0,99985$$

Range 100 - 1400 $\mu\text{g N l}^{-1}$ (utilizzati i 6 *standard* da 100 a 1400 $\mu\text{g N l}^{-1}$, riportati in tabella 3.16.).

Cuvetta con passo ottico di 1 cm

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 974,15 \text{ u.A} - 0,409 \quad r = 0,99993$$

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,010 e 0,035 u.A per le cuvette da 4 cm e tra 0,002 e

0,010 u.A per le cuvette da 1 cm) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura.

Esprimere la concentrazione in $\mu\text{g N l}^{-1}$ arrotondando all'unità.

Tab. 3.16. Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo spettrofotometrico dell'azoto ammoniacale

Concentrazione $\mu\text{g N l}^{-1}$	Prelievo		Volume finale ml
	madre A	madre B	
5		500 μl	200
10		1000 μl	200
20		2000 μl	200
40		2000 μl	100
60		3000 μl	100
100		10 ml	200
200		20 ml	200
400		40 ml	200
600	3000 μl		1000
1000	5000 μl		1000
1400	7 ml		1000

Riferimenti bibliografici

- Grasshoff K. & H. Johannsen. 1972. A new sensitive and direct method for the determination of ammonia in sea water. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 34: 516-521
- Fresenius W., K.E. Quentin & W. Schneider (Eds). 1988. *Water Analysis*. Springer-Verlag, Berlin. 804 pp.

3.6.6. FOSFORO REATTIVO AL MOLIBDATO

Principio del metodo

La determinazione si basa sulla reazione dell'ortofosfato con l'ammonio molibdato ed il potassio antimonio tartrato con formazione del complesso antimonio fosfomolibdico, a sua volta ridotto dall'acido L-ascorbico al colorante blu di molibdeno il cui spettro presenta il massimo di assorbanza a 882 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.17. *Range* di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi del fosforo reattivo a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g P l}^{-1}$

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
10	4 - 30	3	7	5	38
				12	8,3
				20	7,8
				30	3,9
				4	12,4
4	8 - 400	5	10	8	4,9
				37	0,8
				165	1,0
				236	1,1
				355	1,1

Reagenti

I - Miscela di reagenti:

- 0,340 g di potassio antimonio tartrato $\text{KOOC}(\text{CHOH})_2 \text{COOSb } \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, sciolti in circa 50 ml di acqua deionizzata;
- 8,1 g di ammonio eptamolibdato $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sciolti in circa 100 ml di acqua deionizzata;
- 100 ml di acido solforico concentrato (densità 1,84) in circa 200 ml di acqua deionizzata: attenzione aggiungere l'acido all'acqua e contemporaneamente raffreddare;
- dopo aver sciolto separatamente, unire il tutto in un matraccio tarato da 500 ml portando a volume con acqua deionizzata.

II - Soluzione riducente:

In un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 35 g di acido L-ascorbico e 0,150 g di EDTA- Na_2 in circa 400 ml di acqua deionizzata, aggiungere 3 ml di acido formico e portare a volume con acqua deionizzata.

Questi reagenti sono stabili per un mese se conservati in cella frigorifera a 4 °C ed al buio.

Vetreteria

La vetreria utilizzata per queste analisi deve essere lavata con detersivi da laboratorio esenti da fosforo, oppure con acido solforico al 25%.

Procedimento

Prima di iniziare a prelevare dai campioni l'aliquota da analizzare, preparare tre prove in bianco (acqua ultrapura più i reattivi) come verifica della seguente procedura analitica.

Con un cilindro graduato da 50 ml prelevare 50 ml di campione stabilizzato alla temperatura ambiente di 20÷25 °C e versarli in una beuta da 100 ml, aggiungere 1,5 ml di miscela di reagenti (I), agitare, e dopo circa 2 minuti aggiungere 1,5 ml di soluzione riducente (II) ed agitare nuovamente; dopo 15 minuti ed entro 1 ora dall'aggiunta dei reattivi, si esegue la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 882 nm azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sale con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.18. e prelevare in doppio 50 ml in beute lavate di fresco avendo cura di procedere in ordine dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Soluzione madre:

$$\begin{aligned} \text{A - } & 0,87874 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ in } 1000 \text{ ml} = 200 \text{ } \mu\text{g P ml}^{-1} \\ \text{B - } & 10 \text{ ml di A in } 1000 \text{ ml} = 2 \text{ } \mu\text{g P ml}^{-1} \end{aligned}$$

Tab. 3.18. Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione del fosforo reattivo.

Concentrazione $\mu\text{g P l}^{-1}$	Prelievo		Volume finale ml
	madre A	madre B	
4		1000 μl	500
8		1000 μl	250
12		1500 μl	250
16		2000 μl	250
30		15 ml	1000
60		15 ml	500
100		25 ml	500
200	1000 μl		1000
400	1000 μl		500

Si riportano come esempio le equazioni delle regressioni lineari ed i coefficienti di correlazione lineare (r) relativi a due diversi *range* di lavoro.

Range 4 - 30 $\mu\text{g P l}^{-1}$ (utilizzati i primi 5 *standard* riportati in tabella 3.18).
Cuvetta con passo ottico di 10 cm

$$\mu\text{g P l}^{-1} = 149,86 \text{ u.A} + 0,747 \quad r = 0,99984$$

Range 4 - 400 $\mu\text{g P l}^{-1}$ (utilizzati i 9 *standard* riportati in tabella 3.18.).
Cuvetta con passo ottico di 4 cm

$$\mu\text{g P l}^{-1} = 410,87 \text{ u.A} - 0,3 \quad r = 0,99999$$

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,002 e 0,010 u.A) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura.

Esprimere la concentrazione in $\mu\text{g P l}^{-1}$ arrotondando all'unità.

Riferimenti bibliografici

Valderrama J.C. 1977. *Methods used by the Hydrographic Department of the National Board of Fisheries*. Goteborg, Sweden.

3.6.7. AZOTO E FOSFORO TOTALE

Principio del metodo

I composti organici contenenti azoto e fosforo vengono contemporaneamente ossidati a nitrato ed ortofosfato con la miscela ossidante potassio persolfato, acido bórico e sodio idrossido; l'ossidazione è simultanea grazie alla variazione tra pH 9,7 e 5 ottenuta durante l'ossidazione dal sistema acido bórico - sodio idrossido.

Dopo l'ossidazione l'azoto totale si determina per lettura diretta del nitrato alla lunghezza d'onda di 220 nm, questa determinazione è possibile solo sul campione ossidato perché l'ossidazione disgrega i composti organici interferenti sulla lettura a 220 nm. Il fosforo totale viene invece determinato per reazione dell'ortofosfato con l'ammonio molibdato ed il potassio antimonio tartrato che porta alla formazione di un complesso antimonio fosfomolibdico, a sua volta ridotto dall'acido L-ascorbico al complesso blu di molibdeno che presenta il massimo di assorbanza a 882 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.19. Range di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi del fosforo totale a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g P l}^{-1}$.

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
10	4 - 60	4	9	7	17,5
				15	9,5
				22	6,5
				40	4,0
				4	11,5
4	8 - 400	6	14	14	5,6
				18	3,4
				32	3,9
				137	2,3
				246	3,6
				303	

Tab. 3.20. Range di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi dell'azoto totale a diverse concentrazioni espresse in mg N l^{-1} .

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
2	0,30 - 2,00	0,13	0,20	0,92	3,1
				1,47	2,9
1	0,40 - 6,00	0,20	0,30	0,54	5,6
				0,84	3,6
				1,21	3,3
				4,85	0,8

Reagenti

I - Miscela ossidante

50 g di potassio persolfato ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) allo 0,001% massimo di azoto (Merck n. 5092), 30 g di acido borico, 14 g di sodio idrossido in gocce portati a 1000 ml con acqua deionizzata.

II - Acido solforico 98% contenente al massimo 0,0005% di azoto (Merck n° 748).

III - Miscela di reagenti:

- 0,340 g di potassio antimonio tartrato $\text{KOOC}(\text{CHOH})_2\text{COOSb } \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, sciolti in circa 50 ml di acqua deionizzata;
- 8,1 g di ammonio eptamolibdato $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sciolti in circa 100 ml di acqua deionizzata;
- 100 ml di acido solforico concentrato (densità 1,84) in circa 200 ml di acqua deionizzata; attenzione aggiungere l'acido all'acqua e contemporaneamente raffreddare;
- dopo aver sciolto separatamente, unire il tutto in matraccio tarato da 500 ml e portare a volume con acqua deionizzata.

IV - Soluzione riducente

In un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 35 g di acido L-ascorbico e 0,150 g di EDTA- Na_2 in circa 400 ml di acqua deionizzata, aggiungere 3 ml di acido formico e portare a volume con acqua deionizzata.

Questi reagenti sono stabili per un mese se conservati in cella frigorifera a 4°C ed al buio.

Vetreteria

La vetreria utilizzata per queste analisi deve essere lavata con detersivi esenti da fosforo, oppure con acido solforico al 25 %.

Per l'ossidazione in autoclave utilizzare bottiglie ermetiche da 100 ml con tappo a vite e guarnizione resistenti alla temperatura di 120°C (SCHOTT DURAN con tappo blu GL45 massima temperatura di utilizzo 140°C).

Procedimento

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco (acqua ultrapura più i reattivi) come verifica della seguente procedura analitica.

Ossidazione in autoclave

Prelevare separatamente per l'analisi del fosforo e dell'azoto totali 50 ml di campione con un cilindro graduato da 50 ml, si versano nelle bottiglie per l'ossidazione e si aggiungono 7 ml della miscela ossidante (I); le bottiglie ben tappate si mettono in autoclave e si procede con l'ossidazione a 120 °C per 30 minuti.

Estrarre i campioni quando la temperatura dell'autoclave è scesa sotto i 60 °C, proseguire con le analisi solo quando i campioni si sono raffreddati alla temperatura ambiente.

Determinazione dell'azoto totale

Dopo l'ossidazione in autoclave i campioni vanno acidificati con 0,85 ml di acido solforico 98% (II) ed agitati; la lettura spettrofotometrica si esegue alla lunghezza d'onda di 220 nm in cuvette di quarzo da 1 o 2 cm, l'azzeramento dello strumento si esegue con 57 ml di acqua ultrapura acidificata con 0,85 ml di acido solforico 98% allo 0,0005% di N.

Attenzione: accendere lo spettrofotometro e la lampada per l'ultravioletto almeno 15 minuti prima della lettura.

Determinazione del fosforo totale

Ai campioni ossidati in autoclave e raffreddati alla temperatura ambiente di 20÷25 °C si aggiungono 1,5 ml di soluzione riducente (IV), si agita, e dopo circa 2 minuti si aggiungono 1,5 ml di miscela di reagenti (III) e si agita nuovamente; dopo 15 minuti, ed entro 1 ora, si esegue la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 882 nm azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sale con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* contenenti entrambi i composti di azoto e fosforo procedendo come indicato in tabella 3.21. Prelevare in doppio 50 ml di soluzione *standard* in beute lavate di fresco avendo cura di procedere in ordine dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore, avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; aggiungere ad ogni beuta 7 ml di miscela di riferimento costituita da 50,4 g di KHSO₄, 30 g di H₃BO₃ e 14 g di NaOH portati al volume di un litro con acqua deionizzata.

Le soluzioni *standard* così trattate rappresentano il campione al termine della ossidazione in autoclave, ipotizzando che il processo di ossidazione abbia una resa del 100% per tutti i composti organici contenenti azoto e fosforo presenti nel campione, con completa minaralizzazione a nitrato e fosfato.

La procedura di calibrazione continua poi con le singole determinazioni di azoto e fosforo totali come descritto nel procedimento.

Soluzioni madre per il fosforo:

A -	0,87874 g KH ₂ PO ₄ in 1000 ml	=	200 µg P ml ⁻¹
B -	10 ml di A in 1000 ml	=	2 µg P ml ⁻¹

Soluzione madre per l'azoto:

C -	0,61286 g NaNO ₃ in 1000 ml	=	0,10 mg N ml ⁻¹
-----	--	---	----------------------------

Si riportano come esempio le equazioni delle regressioni lineari ed i coefficienti di correlazione lineare (r) relativi a due diversi *range* di lavoro di fosforo ed azoto totale.

Range 4 - 30 µg P l⁻¹ (utilizzati i primi 5 *standard* riportati in tabella 3.21.).

Cuvetta con passo ottico di 10 cm

$$\mu\text{g P l}^{-1} = 159,69 \text{ u.A} - 0,043 \quad r = 0,99996$$

Range 4 - 400 µg P l⁻¹ (utilizzati i 9 *standard* riportati in tabella 3.21.).

Cuvetta con passo ottico di 4 cm

$$\mu\text{g P l}^{-1} = 395,16 \text{ u.A} + 0,369 \quad r = 0,99999$$

Range 0,40 - 2,00 mg N l⁻¹ (utilizzati i primi 5 *standard* riportati in tabella 3.21.).
Cuvetta con passo ottico di 2 cm

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 2,33 \text{ u.A} - 0,012 \quad r = 0,99998$$

Range 0,4 - 6,00 mg N l⁻¹ (utilizzati i 9 *standard* riportati in tabella 3.21.).
Cuvetta con passo ottico di 1 cm

$$\mu\text{g N l}^{-1} = 4,68 \text{ u.A} - 0,018 \quad r = 0,99999$$

Tab. 3.21. Diluizioni delle soluzioni madre A , B e C per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione contenenti azoto e fosforo per la determinazione dell'azoto e del fosforo totale.

mg N l ⁻¹	Azoto		μg P l ⁻¹	Fosforo		Volume finale ml
	Prelievo	Madre		Prelievo	Madre	
0,40	2000 μl	C	4	1000 μl	B	500
0,80	4000 μl	C	8	2000 μl	B	500
1,00	5000 μl	C	12	3000 μl	B	500
1,50	15 ml	C	16	8 ml	B	1000
2,00	20 ml	C	30	15 ml	B	1000
3,00	15 ml	C	60	15 ml	B	500
4,00	20 ml	C	100	25 ml	B	500
5,00	25 ml	C	200	50 ml	B	500
6,00	30 ml	C	400	1000 μl	A	500

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,002 e 0,015 u.A per il fosforo con cuvetta da 4 cm e tra 0,005 e 0,020 u.A per l'azoto con cuvetta da 1 cm) e trasformati in concentrazione mediante le rette di taratura.

Esprimere la concentrazione dell'azoto totale in mg l⁻¹ di azoto arrotondando al centesimo, ed in μg l⁻¹ di fosforo arrotondando all'unità.

Riferimenti bibliografici

Per le condizioni di ossidazione e la determinazione del fosforo totale:

Valderrama J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109 - 122.

Valderrama J.C. 1977. *Methods used by the Hydrographic Department of the National Board of Fisheries*. Goteborg, Sweden.

Per la determinazione dell'azoto totale:

A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1981. *Standard Methods for the examination of water and wastewater. (Method 418 A)*. Am. Publ. Healt Ass., Washington. 1134 pp.

3.6.8. SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO

Principio del metodo

Il metodo colorimetrico per la determinazione della silice reattiva disciolta, si basa sulla reazione della silice con il sodio molibdato in condizioni acide, per formare il complesso silicomolibdico poi ridotto dal cloruro stannoso al colorante blu di molibdeno che viene determinato alla lunghezza d'onda di 815 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.22. Range di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi dei silicati a diverse concentrazioni espresse in mg Si l⁻¹.

Cuvetta cm	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
				Concentrazione	C.V. %
2	0,05 - 1,00	0,02	0,05	0,42	7,1
0,5	0,60 - 5,00		0,60	1,69	3,0
				2,61	1,1
				4,21	1,0

Reagenti

Nella determinazione dei silicati, quando si fa riferimento ad acqua ultrapura, si intende acqua prodotta con un processo di ultrapurificazione con eliminazione anche dei silicati; si è constatato che questa condizione non si verifica sempre in tutti gli strumenti per la produzione di acqua ultrapura, in alcuni casi sono state riscontrate concentrazioni di silice fino ad 1 mg l⁻¹. Per verificare l'assenza dei silicati preparare reagenti e bianchi con acqua ultrapura che è stata successivamente distillata al fine di eliminare completamente l'eventuale silice presente.

- I - in un matraccio tarato da 200 ml versare circa 150 ml di acqua deionizzata ultrapura ed aggiungervi 2,8 ml di acido solforico concentrato, a questa soluzione aggiungere 11,16 g di sodio molibdato biidrato e portare a volume con acqua deionizzata ultrapura; questa soluzione va preparata 24 ore prima dell'utilizzo ed è stabile una settimana se conservata al buio a temperatura ambiente.
- II - acido solforico concentrato diluito 1:1 con acqua deionizzata ultrapura; attenzione aggiungere l'acido all'acqua e contemporaneamente raffreddare; la soluzione è stabile.
- III - 40 g di cloruro stannoso sciolti in 100 ml di acido cloridrico al 37%, dopo la preparazione lasciare a riposo per 24 ore prima dell'uso; la soluzione è stabile.
- IV - diluire al momento dell'analisi 1 ml della soluzione III in 100 ml di acqua deionizzata ultrapura; la soluzione deve essere preparata ed utilizzata al momento dell'analisi, non è conservabile.

Procedimento

Per queste analisi utilizzare beute da 50 ml in polietilene, risciacquate con acqua deionizzata ultrapura esente da silice.

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco (acqua deionizzata ultrapura esente da silice) come verifica della seguente procedura analitica.

Con una pipetta prelevare 20 ml di campione e, agitando dopo ogni aggiunta, aggiungere 2 ml di reagente I, attendere 15 minuti, aggiungere 5 ml di reagente II, attendere 2 minuti, ed infine aggiungere 1 ml di reagente III.

La lettura spettrofotometrica si esegue dopo 15 minuti ed entro 2 ore alla lunghezza d'onda di 815 nm azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

Al termine della lettura le beute vanno risciacquate accuratamente con acqua deionizzata ultrapura esente da silice.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sodio esafluorosilicato con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.23 e prelevarne in doppio 20 ml, avendo cura di procedere in ordine crescente dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Per la preparazione degli *standard* utilizzare matracci tarati, risciacquati recentemente con acqua ultrapura.

Soluzioni madre:

Attenzione, il sodio esafluorosilicato si scioglie lentamente, scaldare leggermente.

- A- 0,67142 g Na_2SiF_6 in 1000 ml = 100 $\mu\text{g Si ml}^{-1}$
 B- 10 ml di A in 1000 ml = 10 $\mu\text{g Si ml}^{-1}$

Tab. 3.23. Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione dei silicati.

Concentrazione mg Si l ⁻¹	Prelievo		Volume finale ml
	madre A	madre B	
0,05		1000 μl	200
0,10		1000 μl	100
0,20		2000 μl	100
0,40		4000 μl	100
0,60		6 ml	100
0,80	2000 μl		250
1,00	1000 μl		100
2,00	2000 μl		100
3,00	3000 μl		100
4,00	4000 μl		100
5,00	5000 μl		100

Range 0,05 - 1,00 mg Si l⁻¹ (utilizzati i primi 7 *standard* riportati in tabella 3.23.).
 Cuvetta con passo ottico di 2 cm

$$\text{mg Si l}^{-1} = 0,94 \text{ u.A} - 0,006 \text{ r} = 0,99992$$

Range 0,40 - 5,00 mg Si l⁻¹ (utilizzati gli 8 *standard* da 0,40 a 5,00 mg l⁻¹ riportati in tabella 3.23.).

Cuvetta con passo ottico di 0,5 cm

$$\text{mg Si l}^{-1} = 3,9 \text{ u.A} - 0,03 \text{ r} = 0,99995$$

Calcoli

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,002 e 0,015 u.A per le cuvette da 2 cm e tra 0,001 e 0,005 u.A per le cuvette da 0,5 cm) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura.

Esprimere la concentrazione in mg Si l⁻¹ arrotondando al secondo decimale.

Riferimenti bibliografici

Golterman, H.L., R.S. Clymo & M.A.M. Ohnstand. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. I.B.P. Handbook No. 8, Blackwell, Oxford. 213 pp.

3.7. ANALISI IN FLUSSO CONTINUO

L'analisi in flusso continuo (*Flow Injection Analysis*, FIA) è una tecnica analitica in uso dalla seconda metà degli anni settanta come evoluzione della tecnica a flusso segmentato (bolla d'aria - campione - bolla d'aria). La tecnica FIA, come quella a flusso segmentato, si presta particolarmente per le determinazioni colorimetriche di *routine* in quanto permette di svolgere un elevato numero di analisi in tempi molto brevi ed in modo automatico.

Le metodiche FIA prevedono l'iniezione di un campione liquido in un flusso continuo di acqua ultrapura (*carrier*), generato da pompe peristaltiche, al cui termine viene posto un rivelatore generalmente di tipo spettrofotometrico. Nel flusso del *carrier* vengono aggiunti in successione, e miscelati nelle spire dei tubi di reazione, i reattivi necessari per la determinazione dell'analita. Il campione iniettato con il *loop*, si sostituisce al *carrier* miscelandosi ai reattivi che producono la reazione con formazione del colorante; il rivelatore spettrofotometrico posto alla fine del flusso permette di determinare le dimensioni della banda del colorante formatasi. Questo processo avviene in tempi molto brevi (circa 30-60 secondi). Agendo sul diametro dei tubi delle pompe peristaltiche o sulla loro velocità di rotazione, si possono variare i rapporti di miscelazione fra reattivi e *carrier* o campione; variando inoltre le lunghezze delle spire dei tubi di reazione si possono aumentare o diminuire i tempi di reazione necessari per la formazione del composto colorato, reazione che comunque non viene quasi mai condotta fino alla formazione completa e stabile del colorante. Su questo sistema analitico si possono trasferire o adattare quasi tutte le determinazioni spettrofotometriche, con evidenti vantaggi di automazione e di velocità nella determinazione. Per un approfondimento dei concetti generali riguardanti le tecniche FIA si rimanda a Ruzicka & Handersen (1988) e a Tecator (1988).

Come per le metodiche spettrofotometriche, anche in questo capitolo per ogni metodo vengono riportate le informazioni riguardanti il principio della determinazione, il *range* di utilizzo e la ripetibilità del metodo a diverse concentrazioni, ottenute sulla base delle carte di controllo utilizzate nel laboratorio negli ultimi tre anni. I valori riportati in queste tabelle si riferiscono alle condizioni ottimizzate per l'analisi di routine presso il laboratorio dell'Istituto; tali metodiche possono essere ottimizzate per altri *range* di utilizzo a condizione che vengano eseguite le necessarie verifiche analitiche. Vengono quindi descritti i reagenti necessari per la determinazione, il procedimento analitico e gli *standard* utilizzati per la preparazione e la verifica della calibrazione; al termine si riportano gli eventuali calcoli necessari ed i riferimenti bibliografici da cui sono tratte le metodiche. Nelle descrizioni degli aspetti pratici più direttamente collegati all'uso dei metodi, si farà riferimento esclusivamente alla strumentazione in uso nel laboratorio dell'Istituto.

3.7.1. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE

Le determinazioni FIA descritte in questo capitolo utilizzano un rivelatore spettrofotometrico che copre il *range* di lunghezza d'onda da 190 a 800 nm. Il suo scopo è quello di rilevare il passaggio nella cella di misura, della banda del composto assorbente generato dalla reazione. Per ottimizzare il sistema di integrazione del segnale questo rivelatore, come altri simili per l'utilizzo in cromatografia liquida, ha la possibilità di operare a diverse sensibilità, selezionabili dai diversi valori di assorbanza in fondoscala, corrispondenti sempre ad una uscita massima di segnale elettrico di 1 Volt; i valori di fondoscala più utilizzati in queste determinazioni sono 0,1, 0,2, 0,5 ed 1,0 u.A, ognuno dei quali corrisponde sempre al segnale massimo di 1 Volt. Questa caratteristica del sistema di rivelazione impone, prima della calibrazione, la scelta di un valore di assorbanza in fondoscala sufficientemente elevato per comprendere il segnale dello *standard* più alto utilizzato per la calibrazione.

Nelle determinazioni FIA il sistema analitico (pompe, *carrier*, reagenti, rivelatore) può avere piccole oscillazioni che si ripercuotono sul segnale misurato dal rivelatore. Per questo motivo è consigliabile procedere ad una accurata calibrazione all'inizio dell'analisi di ogni gruppo di campioni, seguita dalla lettura di uno *standard* di controllo ogni 5-7 campioni analizzati. Questo *standard* di verifica ha lo scopo di correggere la pendenza della retta di calibrazione, adeguandola alle eventuali oscillazioni, normalmente del 2-5 %, che possono intervenire nel corso dell'analisi del gruppo di campioni. Un esempio di retta di calibrazione per la determinazione dei silicati con il metodo descritto nel paragrafo 3.7.4, viene riportato in figura 3.8. Dai valori del segnale in Volt della tabella 3.24 si ottiene la seguente retta di regressione:

$$\text{mg Si l}^{-1} = 6,176 \text{ Volt} - 0,034$$

con coefficiente di correlazione lineare: $r = 0,99996$.

La qualità della retta viene evidenziata dal coefficiente di correlazione lineare (r), il cui valore tende all'unità quando si ha una perfetta correlazione. Una ulteriore verifica della qualità della regressione può essere eseguita ricalcolando dalla retta il valore di concentrazione degli *standard* partendo dalle assorbanze misurate; come si

può vedere in tabella 3.24. Le differenze fra concentrazione dello *standard* e concentrazione calcolata, non superano mai il valore di 0,02 mg Si l⁻¹.

Un controllo ancora più accurato sulla regressione lineare può essere effettuato calcolando per ogni *standard* il fattore di risposta (RF) per unità di concentrazione (Green 1996, Dorschel *et al.* 1989).

$$RF = \frac{\text{segnale in Volt}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

Valori di RF costanti indicano un'ottima correlazione lineare (Tab. 3.24. e Fig. 3.8.), mentre significative variazioni sul valore di RF indicano una bassa correlazione lineare tra *standard* e segnale; tali condizioni possono essere indice di errori nella preparazione delle soluzioni calibranti o di andamenti non lineari che richiedono altri tipi di calibrazione, ad esempio quella quadratica.

Tab. 3.24. Valori del segnale (Volt) relativi alla concentrazione degli *standard* utilizzati per la calibrazione dei silicati in FIA, concentrazioni calcolate dalla retta di calibrazione e valori del fattore di risposta (RF).

Segnale con cuvetta 1 cm Volt	Concentrazione <i>standard</i> mg Si l ⁻¹	Concentrazione Calcolata mg Si l ⁻¹	Fattore di risposta per unità di concentrazione RF = Volt / mg Si l ⁻¹ <i>standard</i>
0,0182	0,10	0,08	0,182
0,0855	0,50	0,49	0,171
0,1691	1,00	1,01	0,169
0,3323	2,00	2,02	0,166
0,4937	3,00	3,02	0,165
0,6531	4,00	4,00	0,163
0,8121	5,00	4,98	0,162

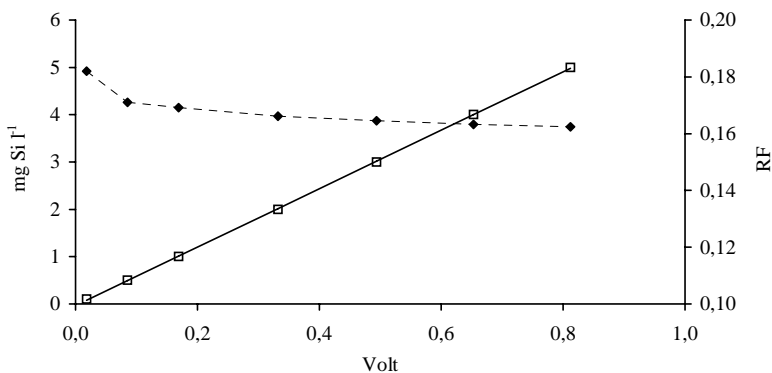


Fig. 3.8. Esempio di curva di calibrazione (□) di un metodo FIA (silicati, rivelatore con passo ottico da 1 cm) e visualizzazione del fattore di risposta (RF ◆) per unità di concentrazione.

3.7.2. AMMONIO

Principio del metodo

La reazione colorimetrica per la determinazione dell'azoto ammoniacale avviene in presenza del catalizzatore sodio nitroprussiato per reazione dello ione ammonio con il gruppo fenolico presente nel sodio salicilato; l'azione ossidante del sodio dicloroisocianurato porta alla formazione del composto blu indofenolo il cui spettro di assorbimento presenta il massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 690 nm.

Il campione prelevato nel *loop* di iniezione viene inserito nel flusso continuo di acqua ultrapura (*carrier*), tale flusso è generato da pompe peristaltiche che spingono il *carrier* ed i reattivi attraverso le spire di reazione, miscelandoli in continuo; il campione iniettato si sostituisce al *carrier* miscelandosi ai reattivi che producono la reazione con formazione del colorante; il rivelatore spettrofotometrico posto alla fine del flusso permette di determinare le dimensioni della banda del colorante formatosi. Il processo avviene in tempi molto brevi (circa 60-80 secondi).

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.25. *Range* di utilizzo, LOD, LOQ e ripetibilità dell'analisi dell'ammonio (FIA) a diverse concentrazioni espresse in mg N l⁻¹; valori ottenuti con *loop* di iniezione da 100 µl e rivelatore con passo ottico da 1 cm.

Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
			Concentrazione	C.V. %
0,10 - 2,00	0,05	0,10	0,350	4,9
1,00 - 4,00		1,00		

Strumentazione utilizzata

Sistema per *Flow Injection Analysis* Tecator FIAstar 5010 composto da analizzatore Tecator 5010, rivelatore spettrofotometrico Thermo Separation Products UV2000 e autocampionatore Tecator 5017; questo sistema è gestito da *personal computer* tramite *software* Tecator Super Flow EX.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali.

Reagenti

La preparazione dei reattivi deve essere eseguita utilizzando solo acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.

- C *Carrier*, acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.
- R1 Reattivo 1: nella bottiglia graduata pesare 34 g di sodio salicilato per analisi e 0,4 g di sodio nitroprussiato per analisi, aggiungere circa 150 ml di acqua ultrapura sciogliere e portare al volume finale di 200 ml con acqua ultrapura; la bottiglia deve essere avvolta con carta di alluminio per proteggere il reattivo dalla luce. Questo reattivo è stabile per due settimane.

R2 Reattivo 2: in un matraccio da 1000 ml aggiungere 200 g di sodio citrato tribasico biidrato e 20 g di sodio idrossido, sciogliere e portare a volume con acqua deionizzata ultrapura; questo reattivo è stabile per sei mesi.

Nella bottiglia graduata per il reattivo 2 aggiungere 0,29 g di sodio dicloroisocianurato per analisi (Kodak n. 10511) ed aggiungere 50 ml di acqua ultrapura; a dissoluzione completa aggiungere 200 ml della soluzione sodio citrato - sodio idrossido precedentemente preparata.

Il reattivo R2 va preparato ed utilizzato giornalmente.

Condizioni strumentali

Lo schema di processo (*manifold*) per la metodica della silice viene preparato con il *chemifold* Tipo II Tecator, utilizzando i seguenti tubi per il pompaggio del *carrier* (C) e dei reattivi (R1 e R2):

C	Nero / Nero	flusso	1,2 ml min ⁻¹
R1	Arancio / Bianco	"	0,8 ml min ⁻¹
R2	Arancio / Bianco	"	0,8 ml min ⁻¹

Lo schema del *chemifold* Tipo II con l'indicazione della lunghezza delle spire di reazione in centimetri e del loro diametro interno in millimetri (es. 60/0,7), è riportato nella figura 3.9.

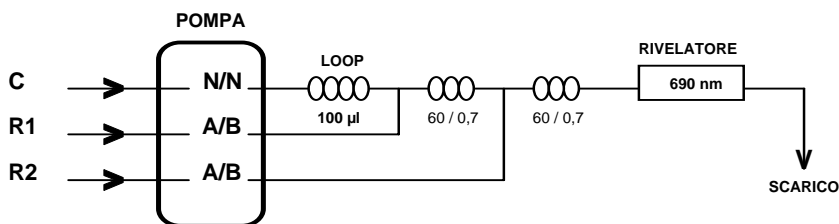


Fig. 3.9. Schema del *chemifold* tipo II utilizzato per l'analisi dell'ammonio in FIA.

Come per tutte le altre analisi FIA, oltre al circuito idraulico specifico per la variabile analizzata, viene utilizzata una seconda pompa peristaltica per l'aspirazione del campione e per il lavaggio con acqua ultrapura del puntale dell'autocampionatore; i tubi utilizzati sono i seguenti:

- aspirazione campione Bianco /Bianco flusso 2,0 ml min⁻¹
- lavaggio autocampionatore Rosso /Rosso " 2,8 ml min⁻¹

Procedimento

Le seguenti note sono indicative delle principali condizioni operative, in quanto si presuppone che l'utilizzatore conosca già approfonditamente il sistema strumentale utilizzato. Per ulteriori informazioni vedere quindi gli specifici manuali tecnici ed il manuale del *software* Super Flow II della Tecator.

Note operative: all'accensione dello strumento verificare il valore di assorbanza del *carrier* dopo l'aggiunta dei reattivi (valore di bianco). Per far questo sostituire i reattivi con acqua ultrapura (la stessa utilizzata per il *carrier*), far girare le pompe e dopo stabilizzazione (5 minuti) azzerare il rivelatore. Dopo questo azzeramento collegare i reattivi alle pompe peristaltiche, attivarle e dopo stabilizzazione (5 minuti) verificare che il rivelatore spettrofotometrico non dia valori di assorbanza troppo elevati (maggiori di 0,020 A) rispetto al precedente azzeramento indicativi di un inquinamento del *carrier* o dei reattivi con la variabile da analizzare.

Eseguito questo controllo del valore di bianco, prima di iniziare un ciclo analitico, lo strumento deve funzionare per 20-30 minuti prima di eseguire una calibrazione di verifica del buon funzionamento.

Nel caso vi fossero bolle d'aria nel circuito idraulico bisogna degasare con elio il *carrier* ed i reattivi; attenzione alle bolle che si possono fermare nella cella a flusso del rivelatore spettrofotometrico; verificarne l'assenza controllando la stabilità della lettura dopo l'azzeramento.

Le analisi si eseguono in triplo, ogni ciclo analitico viene predisposto sul piatto dell'autocampionatore ed è composto da una calibrazione iniziale con regressione lineare su più punti (5÷7), poi da gruppi di 5 campioni alternati ad uno *standard* di ricalibrazione a valore centrale rispetto alla retta di calibrazione; la lettura di questo *standard* viene utilizzata per correggere la pendenza della retta minimizzando così eventuali derive strumentali.

Standard e campioni, che normalmente sono conservati in frigorifero, devono essere riscaldati a temperatura ambiente prima dell'analisi.

La retta di taratura, le ricalibrations ed i valori dei campioni vengono automaticamente stampati e registrati su disco alla fine di ogni ciclo analitico; il nome del file su cui vengono registrati questi dati, viene creato dall'operatore e nello spazio di otto caratteri deve contenere la sigla dei campioni e la data del campionamento: ad esempio per i fiumi del L. Maggiore del 3 gennaio 1995 il nome del file potrebbe essere FM030195.

Esprimere le concentrazioni in mg Si l^{-1} arrotondando al secondo decimale.

Alla fine dell'analisi staccare le bottiglie dei reattivi dalle pompe peristaltiche, lavarle e conservarle piene di acqua ultrapura, lavare il circuito idraulico con acqua ultrapura per almeno 10 minuti e lasciare le pompe peristaltiche aperte con i tubi non in tensione.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di cloruro di ammonio con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza; preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.26. utilizzando matracci tarati e portando a volume con acqua ultrapura.

Queste soluzioni si conservano in bottiglia di polietilene o policarbonato alla temperatura di 4°C; la soluzione madre è conservabile per circa sei mesi, mentre i singoli *standard* devono essere preparati ogni due mesi; gli *standard* a concentrazione minore di 1 mg N l^{-1} sono facilmente inquinabili, è quindi buona abitudine sostituirli mensilmente.

Per stabilizzare gli *standard* e renderli conservabili nel tempo (massimo due mesi) preparare una soluzione di acido solforico allo 0,25% diluendo 1 ml di acido solforico al 25% in 100 ml di acqua ultrapura; con l'aggiunta di 500 μ l di questa soluzione a 500 ml di *standard* si ottiene un valore intorno a pH 4 che ne permette una migliore conservabilità.

Soluzione madre:

A - 0,76378 g NH_4Cl più 200 μ l H_2SO_4 25% in 1000 ml = 200 $\mu\text{g N ml}^{-1}$

L'aggiunta di acido solforico serve per stabilizzare la soluzione a circa pH 3 rendendola conservabile per circa 6 mesi.

Tab. 3.26. Diluizioni della soluzione madre A per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione dell'ammonio.

Concentrazione mg N- NH_4 l ⁻¹	Prelievo madre A	Volume finale ml
0,10	250 μ l	500
0,20	500 μ l	500
0,40	1000 μ l	500
0,60	1500 μ l	500
0,80	2000 μ l	500
1,20	3000 μ l	500
1,60	4000 μ l	500
2,00	5000 μ l	500
2,40	6 ml	500
3,20	8 ml	500
4,00	10 ml	500

Prima di portare al volume finale di 500 ml aggiungere 500 μ l di acido solforico 0,25% per stabilizzare lo *standard* a pH di circa 4; queste soluzioni si conservano per circa due mesi.

Riferimenti bibliografici

- Grasshoff K. & H. Johannsen 1972. A new sensitive and direct method for the determination of ammonia in sea water. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 34: 516-521
- Fresenius W., K.E. Quentin & W. Schneider (Eds). 1988. *Water Analysis*. Springer-Verlag, Berlin. 804 pp.

3.7.3. AZOTO TOTALE

Principio del metodo

I composti organici contenenti azoto vengono prima ossidati in autoclave come descritto nel paragrafo 3.6.7. Per la mineralizzazione a nitrato si utilizza una miscela ossidante composta da potassio persolfato, acido borico e sodio idrossido che durante l'ossidazione causa nel campione una variazione di pH tra 9,7 e 5 per via dal sistema tampone acido borico - sodio idrossido.

La determinazione dell'azoto totale in flusso continuo avviene per acidificazione a circa pH 1 del campione ossidato e lettura diretta del nitrato alla lunghezza d'onda di 220 nm.

Nel sistema FIA il campione ossidato viene prelevato nel *loop* di iniezione ed inserito nel flusso continuo di acqua ultrapura (*carrier*), tale flusso è generato da pompe peristaltiche che spingono il *carrier* e l'acido cloridrico attraverso le spire di reazione, miscelandoli in continuo; il rivelatore spettrofotometrico posto alla fine del flusso permette di determinare le dimensioni della banda del nitrato misurata a 220 nm; il processo avviene in circa 30-40 secondi. Questa determinazione è possibile solo sul campione ossidato perché l'ossidazione disgrega i composti organici interferenti sulla lettura a 220 nm.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.27. *Range* di utilizzo, LOD e LOQ dell'analisi dell'azoto totale (FIA) a diverse concentrazioni espresse in mg N l⁻¹; valori ottenuti con *loop* di iniezione da 100 µl e rivelatore con passo ottico da 1 cm.

Range di misura	LOD	LOQ
0,40 - 4,00	0,20	0,30
1,00 - 10,00		0,80

Strumentazione utilizzata

Sistema per *Flow Injection Analysis* Tecator FIAstar 5010 composto da analizzatore Tecator 5010, rivelatore spettrofotometrico Thermo Separation Products UV2000 e autocampionatore Tecator 5017; questo sistema è gestito da *personal computer* tramite *software* Tecator Super Flow EX.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali.

Reagenti

Miscela ossidante:

50 g di potassio persolfato (K₂S₂O₈) allo 0,001% massimo di azoto (Merck n. 5092), 30 g di acido bórico, 14 g di sodio idrossido in gocce portati a 1000 ml con acqua deionizzata.

Per la preparazione dei reattivi del sistema analitico FIA, utilizzare solo acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.

C *Carrier*, acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.

R1 Reattivo 1: acido cloridrico circa 0,1 N. Nella bottiglia graduata versare 450 ml di acqua ultrapura ed aggiungervi 50 ml di acido cloridrico al 30%; questo reattivo è utilizzabile per diversi mesi.

Vetreteria

Per l'ossidazione in autoclave utilizzare bottiglie ermetiche da 100 ml con tappo a vite e guarnizione resistenti alla temperatura di 120°C (SCHOTT DURAN con tappo blu GL45 massima temperatura di utilizzo 140°C).

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco (acqua ultrapura più i reattivi) come verifica della procedura analitica.

Ossidazione in autoclave: con una pipetta tarata prelevare 50 ml di campione, versarli nelle bottiglie per l'ossidazione ed aggiungere 7 ml della miscela ossidante; i campioni ben tappati si mettono in autoclave e si procede con l'ossidazione a 120°C per 30 minuti.

Estrarre i campioni quando la temperatura dell'autoclave è scesa sotto i 60 °C e proseguire con l'analisi FIA solo quando i campioni si sono raffreddati alla temperatura ambiente.

Condizioni strumentali

Il circuito idraulico (*manifold*) per la metodica della silice viene preparato con il *chemifold* Tipo I Tecator, utilizzando i seguenti tubi per il pompaggio del *carrier* (C) e del reattivo (R1):

C	Bianco / Bianco	flusso 2,0 ml min ⁻¹
R1	Verde / Arancio	" 0,4 ml min ⁻¹

Lo schema di processo *chemifold* Tipo I con l'indicazione della lunghezza delle spire di reazione in centimetri e del loro diametro interno in millimetri (es. 60/0,7), è riportato nella figura 3.10.

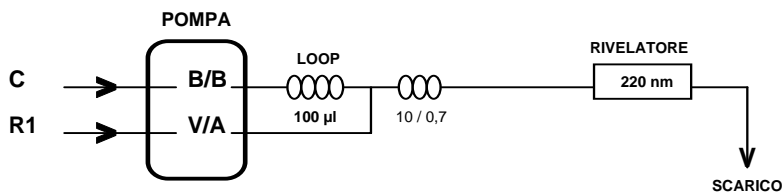


Fig. 3.10. Schema del *chemifold* tipo I utilizzato per l'analisi dell'azoto totale in FIA.

Come per tutte le altre analisi FIA, oltre al circuito idraulico specifico per la variabile analizzata, viene utilizzata una seconda pompa peristaltica per l'aspirazione del campione e per il lavaggio con acqua ultrapura del puntale dell'autocampionatore; i tubi utilizzati sono i seguenti:

- aspirazione campione	Bianco /Bianco	flusso	2,0 ml min ⁻¹
- lavaggio autocampionatore	Rosso /Rosso	"	2,8 ml min ⁻¹

Procedimento FIA

Le seguenti note sono indicative delle principali condizioni operative, dato che in questa trattazione si presuppone che l'utilizzatore conosca già approfonditamente

questo tipo di sistema analitico. Per ulteriori informazioni vedere quindi gli specifici manuali tecnici ed il manuale del *software* Super Flow II della Tecator.

Note operative: all'accensione dello strumento verificare, con la seguente procedura, il valore di assorbanza del *carrier* dopo l'aggiunta dei reattivi (valore di bianco). Per far questo sostituire i reattivi con acqua ultrapura (la stessa utilizzata per il *carrier*), far girare le pompe e dopo stabilizzazione (5 minuti) azzerare il rivelatore. Dopo questo azzeramento collegare i reattivi alle pompe peristaltiche, attivarle e dopo stabilizzazione (5 minuti) verificare che il rivelatore spettrofotometrico non dia valori di assorbanza troppo elevati rispetto al precedente azzeramento (maggiori di 0,020 A) indicativi di un inquinamento del *carrier* o dei reattivi con la variabile da analizzare.

Eseguito questo controllo del valore di bianco, prima di iniziare un ciclo analitico, lo strumento deve funzionare per 20-30 minuti prima di eseguire una calibrazione di verifica del buon funzionamento.

Nel caso vi fossero bolle d'aria nel circuito idraulico bisogna degasare con elio il *carrier* ed i reattivi; attenzione alle bolle che si possono fermare nella cella a flusso del rivelatore spettrofotometrico; verificarne l'assenza controllando la stabilità della lettura dopo l'azzeramento.

Le analisi si eseguono in triplo, ogni ciclo analitico viene predisposto sul piatto dell'autocampionatore ed è composto da una calibrazione iniziale con regressione lineare su più punti (5÷7), poi da gruppi di 5 campioni alternati ad uno *standard* di ricalibrazione a valore centrale rispetto alla retta di calibrazione; la lettura di questo *standard* viene utilizzata per correggere la pendenza della retta minimizzando così eventuali derive strumentali.

Standard e campioni, che normalmente sono conservati in frigorifero, devono essere riscaldati a temperatura ambiente prima dell'analisi.

La retta di taratura, le ricalibrazioni ed i valori dei campioni vengono automaticamente stampati e registrati su disco alla fine di ogni ciclo analitico; il nome del file su cui vengono registrati questi dati, viene creato dall'operatore e nello spazio di otto caratteri deve contenere la sigla dei campioni e la data del campionamento: ad esempio per i fiumi del L. Maggiore del 3 gennaio 1995 il nome del file potrebbe essere FM030195.

Esprimere le concentrazioni in mg Si l⁻¹ arrotondando al secondo decimale.

Alla fine dell'analisi staccare le bottiglie dei reattivi dalle pompe peristaltiche e conservarle piene di acqua ultrapura, lavare il circuito idraulico con acqua ultrapura per almeno 10 minuti e lasciare le pompe peristaltiche aperte con i tubi non in tensione.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di nitrato di sodio con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza; preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.28, utilizzando matracci tarati e portando a volume con acqua ultrapura.

Queste soluzioni si conservano in bottiglia di polietilene o policarbonato alla temperatura di 4°C; la soluzione madre è conservabile per circa tre mesi, mentre i

singoli *standard* devono essere preparati ogni mese; gli *standard* a concentrazione minore di 1 mg N l^{-1} sono facilmente inquinabili, è quindi buona abitudine prepararli settimanalmente.

Soluzione madre:

A - $3,0341 \text{ g NaNO}_3$ in 1000 ml = $0,50 \text{ } \mu\text{g N ml}^{-1}$

Tab. 3.28. Diluizioni della soluzione madre A per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione dell'azoto totale.

Concentrazione mg N l^{-1}	Prelievo madre A	Volume finale ml
0,20	200 μl	500
0,50	500 μl	500
0,80	800 μl	500
1,00	1000 ml	500
1,50	1500 μl	500
2,00	2000 μl	500
3,00	3000 μl	500
4,00	4000 μl	500
5,00	5000 μl	500
8,00	8 ml	500
10,00	10 ml	500

Calcoli

Nel calcolo della concentrazione dei campioni bisogna considerare della diluizione eseguita aggiungendo 7 ml di miscela ossidante a 50 ml di campione. Il valore di concentrazione ottenuto dalla calibrazione eseguita sugli *standard* contenenti il nitrato, deve quindi essere moltiplicato per il fattore di diluizione 1,14.

Esprimere la concentrazione dell'azoto totale in mg N l^{-1} arrotondando al secondo decimale.

Riferimenti bibliografici

Per le condizioni di ossidazione:

Valderrama J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109 - 122.

Per la determinazione dell'azoto totale:

A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1981. *Standard Methods for the examination of water and wastewater. (Method 418 A)*. Am. Publ. Healt Ass., Washington. 1134 pp.

3.7.4. SILICATI REATTIVI AL MOLIBDATO

Principio del metodo

La reazione colorimetrica per la determinazione della silice disciolta si basa sulla reazione della silice con il sodio molibdato in condizioni acide, per formare il complesso silicomolibdato poi ridotto dal cloruro stannoso al colorante blu di molibdeno che viene determinato alla lunghezza d'onda di 695 nm; l'aggiunta di acido ossalico

permette di eliminare l'interferenza dei fosfati che formano il complesso blu fosfomolibdico.

Il campione prelevato nel *loop* di iniezione viene inserito nel flusso continuo di acqua ultrapura (*carrier*), tale flusso è generato da pompe peristaltiche che spingono il *carrier* ed i reattivi attraverso le spire di reazione, miscelandoli in continuo. Il campione iniettato si sostituisce al *carrier* miscelandosi ai reattivi che producono la reazione con formazione del colorante; il rivelatore spettrofotometrico posto alla fine del flusso permette di determinare le dimensioni della banda del colorante formatosi. Il processo avviene in tempi brevi (circa 60-80 secondi).

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.29. *Range* di utilizzo, LOD e LOQ dell'analisi dei silicati (FIA) a diverse concentrazioni espresse in mg Si l⁻¹; valori ottenuti con *loop* di iniezione da 200 µl e rivelatore con passo ottico da 1 cm.

Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
			Concentrazione	C.V. %
0,05 - 2,00	0,02	0,05	1,39	1,8
0,50 - 5,00			1,42	2,4
			3,88	1,7
2,00 - 8,00		1,50	3,97	1,9

Strumentazione utilizzata

Sistema per *Flow Injection Analysis* Tecator FIAstar 5010 composto da analizzatore Tecator 5010, rivelatore spettrofotometrico Thermo Separation Products UV2000 e autocampionatore Tecator 5017; questo sistema è gestito da *personal computer* tramite *software* Tecator Super Flow EX.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali.

Reagenti

Nella determinazione dei silicati, quando si fa riferimento ad acqua ultrapura, si intende acqua prodotta con processo di ultrapurificazione che comporta l'eliminazione anche dei silicati; si è constatato che questa condizione non si verifica sempre in tutti gli strumenti per la produzione di acqua ultrapura, in alcuni casi sono state riscontrate concentrazioni di silice fino ad 1 mg l⁻¹ nell'acqua prodotta. Per verificare l'effettiva assenza dei silicati, si consiglia di preparare reagenti e bianchi con acqua ultrapura che sia stata successivamente distillata al fine di eliminare completamente l'eventuale silice, poi di analizzare l'acqua prodotta dai sistemi di ultrapurificazione.

La preparazione dei reattivi deve essere eseguita utilizzando solo acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.

C *Carrier*, acqua ultrapura degasata con elio per circa 10 minuti.

R1 Reattivo 1: in una bottiglia graduata da 500 ml pesare 27 g di sodio molibdato per analisi ed aggiungere circa 300 ml di acqua ultrapura, sciogliere e poi ag-

giungere, con una pipetta graduata, 8 ml di acido solforico concentrato per analisi; portare poi al volume finale di 500 ml con acqua ultrapura.

- R2 Reattivo 2: in una seconda bottiglia graduata da 500 ml pesare 35 g di acido ossalico per analisi, ed aggiungere circa 300 ml di acqua ultrapura, sciogliere e poi aggiungere, con una pipetta graduata, 10 ml di acido solforico concentrato per analisi; portare poi al volume finale di 500 ml con acqua ultrapura.
- R3 Reattivo 3: in una terza bottiglia graduata da 500 ml pesare 0,1 g di cloruro stannoso per analisi, 1 g di solfato di idrazina per analisi ed aggiungere circa 300 ml di acqua ultrapura, sciogliere e poi aggiungere, con una pipetta graduata, 14 ml di acido solforico concentrato per analisi; portare poi al volume finale di 500 ml con acqua ultrapura.

I reattivi si possono utilizzare per tre giorni dalla data di preparazione dopo di che le bottiglie devono essere svuotate, lavate e conservate piene di acqua ultrapura.

Condizioni strumentali

Lo schema di processo (*manifold*) per la metodica della silice viene preparato con il *chemifold* Tipo III Tecator, utilizzando i seguenti tubi per il pompaggio del *carrier* (C) e dei reattivi (R1,R2 e R3):

C	Nero / Nero	flusso	1,2 ml min ⁻¹
R1	Arancio / Bianco	"	0,8 ml min ⁻¹
R2	Arancio / Giallo	"	0,6 ml min ⁻¹
R3	Arancio / Giallo	"	0,6 ml min ⁻¹

Lo schema del *chemifold* Tipo III con l'indicazione della lunghezza delle spire di reazione in centimetri del loro diametro interno in millimetri (es. 60/0,7), è riportato nella figura 3.11

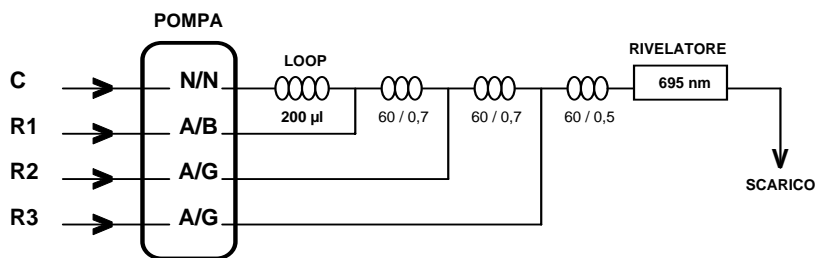


Fig. 3.11. Schema del *chemifold* tipo III utilizzato per l'analisi dei silicati in FIA.

Come per tutte le altre analisi FIA, oltre al circuito idraulico specifico per la variabile analizzata, viene utilizzata una seconda pompa peristaltica per l'aspirazione del campione e per il lavaggio con acqua ultrapura del puntale dell'autocampionatore; i tubi utilizzati sono i seguenti:

Aspirazione campione	Bianco /Bianco	flusso	2,0 ml min ⁻¹
Lavaggio autocampionatore	Rosso /Rosso	"	2,8 ml min ⁻¹

Procedimento

Le seguenti note sono indicative delle principali condizioni operative, dato che in questa trattazione si presuppone che l'utilizzatore conosca già approfonditamente questo tipo di sistema analitico. Per ulteriori informazioni vedere quindi gli specifici manuali tecnici ed il manuale del *software* Super Flow II della Tecator.

Note operative: all'accensione dello strumento verificare, con la seguente procedura, il valore di assorbanza del *carrier* dopo l'aggiunta dei reattivi (valore di bianco). Per far questo sostituire i reattivi con acqua ultrapura (la stessa utilizzata per il *carrier*), far girare le pompe e dopo stabilizzazione (5 minuti) azzerare il rivelatore. Dopo questo azzeramento collegare i reattivi alle pompe peristaltiche, attivarle e dopo stabilizzazione (5 minuti) verificare che il rivelatore spettrofotometrico non dia valori di assorbanza troppo elevati (maggiori di 0,020 A) rispetto al precedente azzeramento, indicativi di un inquinamento del *carrier* o dei reattivi con la variabile da analizzare.

Eseguito questo controllo del valore di bianco, prima di iniziare un ciclo analitico, lo strumento deve funzionare per 20-30 minuti prima di eseguire una calibrazione di verifica del buon funzionamento.

Nel caso vi fossero bolle d'aria nel circuito idraulico bisogna degasare il *carrier* ed i reattivi; attenzione alle bolle che si possono fermare nella cella a flusso del rivelatore spettrofotometrico; verificarne l'assenza controllando la stabilità della lettura dopo l'azzeramento.

Le analisi si eseguono in triplo, ogni ciclo analitico viene predisposto sul piatto dell'autocampionatore ed è composto da una calibrazione iniziale con regressione lineare su più punti (5÷7), poi da gruppi di 5 campioni alternati ad uno *standard* di ricalibrazione a valore centrale rispetto alla retta di calibrazione; la lettura di questo *standard* viene utilizzata per correggere la pendenza della retta minimizzando così eventuali derive strumentali.

Standard e campioni, che normalmente sono conservati in frigorifero, devono essere riscaldati a temperatura ambiente prima dell'analisi.

La retta di taratura, le ricalibrizioni ed i valori dei campioni vengono automaticamente stampati e registrati su disco alla fine di ogni ciclo analitico; il nome del file su cui vengono registrati questi dati, viene creato dall'operatore e nello spazio di otto caratteri deve contenere la sigla dei campioni e la data del campionamento: ad esempio per i fiumi del L. Maggiore del 3 gennaio 1995 il nome del file potrebbe essere FM030195.

Esprimere le concentrazioni in mg Si l⁻¹ arrotondando al secondo decimale.

Alla fine dell'analisi staccare le bottiglie dei reattivi dalle pompe peristaltiche e conservarle piene di acqua ultrapura, lavare il circuito idraulico con acqua ultrapura per almeno 10 minuti e lasciare le pompe peristaltiche aperte con i tubi non in tensione.

Calibrazione

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sodio esafluorosilicato con qualità analitica eventualmente

corretta per il grado di purezza; preparare le soluzioni *standard* come indicato in tabella 3.40. utilizzando matracci tarati e portando a volume con acqua ultrapura.

Queste soluzioni si conservano in bottiglia di polietilene o policarbonato alla temperatura di 4°C; la soluzione madre è conservabile per circa sei mesi, mentre i singoli *standard* devono essere preparati ogni due mesi; gli *standard* a concentrazione minore di 1 mg Si l⁻¹ sono facilmente inquinabili, è quindi buona abitudine prepararli mensilmente.

Soluzioni madre:

A - 0,67142 g Na₂SiF₆ in 1000 ml = 100 µg Si ml⁻¹

Attenzione il sodio esafluorosilicato si scioglie lentamente, scaldare leggermente.

Tab. 3.40. Diluizioni della soluzione madre A per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione dei silicati.

Concentrazione mg Si l ⁻¹	Prelievo madre A	Volume finale ml
0,10	500 µl	500
0,20	1000 µl	500
0,50	2500 µl	500
1,00	5000 µl	500
1,60	8 ml	500
2,00	10 ml	500
3,00	15 ml	500
4,00	20 ml	500
5,00	25 ml	500
6,00	30 ml	500
8,00	40 ml	500

Riferimenti bibliografici

- Tecator FIAstar Application Short Note ASTN 5-1984. Determination of silica by flow injection analysis.
- Thomsen J., K. Johnson & R. Petty. 1983. Determination of reactive silicate in seawater by flow injection analysis. *Anal. Chem.*, 55: 2378-2382.

3.8. ANALISI IN CROMATOGRAFIA IONICA

Nell'ultimo decennio la cromatografia ionica (IC) è diventata una delle tecniche analitiche più frequentemente utilizzate nella determinazione di anioni (Cl⁻, SO₄⁻ e NO₃⁻) e cationi (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺, K⁺ ed NH₄⁺) anche a bassi livelli di concentrazione. Nel laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia questa tecnica analitica è stata introdotta nel 1984 per la determinazione degli anioni e nel 1990 per la determinazione dei cationi. Attualmente si determinano otto variabili chimiche in IC rispetto alle 12-14 determinazioni eseguite con altre metodiche (potenziometriche, spettrofotometriche in assorbimento molecolare e atomico, ed in flusso continuo).

L'analisi in cromatografia ionica con soppressione chimica della conducibilità dell'eluente, è una determinazione cromatografica liquida ad alte prestazioni (HPLC) che utilizza una fase mobile (eluente alcalino o acido) in grado di scambiare anioni o

cationi con la fase stazionaria (resina a scambio anionico o cationico contenuta nelle colonne di separazione). Prima di giungere al rivelatore la conducibilità dell'eluente viene soppressa chimicamente e gli ioni analizzati trasformati nei corrispondenti acidi o basi forti rispettivamente nella determinazione di anioni o cationi. Il rivelatore comunemente utilizzato per queste analisi è quello conduttometrico ed il sistema strumentale può essere così sintetizzato: pompa per l'eluente, autocampionatore per l'iniezione del campione, colonne a scambio ionico per la separazione degli analiti, sistema di soppressione chimica, rivelatore conduttometrico, *software* per l'acquisizione, l'elaborazione e l'integrazione del segnale, e *software* per la gestione del sistema strumentale.

Per una descrizione più approfondita delle tecniche riguardanti l'analisi HPLC si rimanda a Yost *et al.* (1990) mentre per la cromatografia ionica si veda Sawicki *et al.* (1978), Mulik & Sawicki (1979), Fritz *et al.* (1982) e Weiss (1986).

Come per le metodiche fino ad ora descritte, anche in questo capitolo verranno riportate per ogni metodo le informazioni riguardanti il principio della determinazione, il *range* di utilizzo e la ripetibilità del metodo a diverse concentrazioni, ottenuti sulla base delle carte di controllo utilizzate nel laboratorio negli ultimi due - tre anni. I valori riportati in queste tabelle si riferiscono alle condizioni ottimizzate per l'analisi di *routine* con le colonne a scambio ionico in uso presso il laboratorio dell'Istituto; queste possono anche essere ottimizzate per altri *range* di utilizzo a condizione però che vengano eseguite le necessarie verifiche analitiche. Vengono poi descritti i reagenti necessari per la determinazione, il procedimento analitico e gli *standard* utilizzati nelle fasi di calibrazione; infine si riportano i riferimenti bibliografici da cui sono tratte le metodiche. Nelle descrizioni degli aspetti pratici più direttamente collegati all'uso dei metodi, si farà riferimento esclusivamente alla strumentazione in uso nel laboratorio dell'Istituto descritta nei paragrafi successivi.

3.8.1. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE

Le determinazioni in cromatografia ionica descritte in questo capitolo, come tutte le determinazioni cromatografiche, richiedono normalmente almeno una o due calibrazioni giornaliere per compensare le eventuali oscillazioni del sistema analitico. In IC le modalità di calibrazione spesso non sono molto ben definite anche nelle descrizioni dei metodi ufficiali (E.P.A. 1986a, 1986b, 1991, IUPAC 1991, UNICHIM 1991, A.P.H.A. 1992 ed EMEP 1996) infatti esse vanno dall'uso di un solo *standard* esterno multielemento fino all'uso di tre o più *standard* utilizzando regressioni lineari o quadratiche. Le modalità di calibrazione sono particolarmente importanti nell'analisi degli anioni in cromatografia ionica soppressa dove si ha una evidente non linearità delle curve di taratura. In questo paragrafo vengono riassunti i risultati di un lavoro specifico degli autori (Tartari *et al.* 1995), nel quale sono stati approfonditi ed ottimizzati i concetti riguardanti la linearità e le modalità di calibrazione in IC nell'analisi di anioni e cationi inorganici. Altri lavori che trattano questi argomenti sono Midgley & Parker (1989), Tartari *et al.* (1993), Rowland *et al.* (1995) e Piangerelli *et al.* (1995), mentre per quanto riguarda più in generale la linearità delle calibrazioni si rimanda a Dorschel *et al.* (1989), Analytical Methods Committee (1994) e Green (1996).

Una caratteristica delle determinazioni in IC eseguite con le metodiche riportate in questo capitolo è la notevole stabilità della risposta strumentale per tempi relativamente lunghi, dell'ordine di giorni e settimane. Questa caratteristica è evidenziata dalla figura 3.12 che riporta le variazioni percentuali (C.V.%) sul segnale in area ottenuto dall'iniezione con lo stesso *loop* (50 μl per gli anioni e 100 μl per i cationi) degli *standard* di calibrazione preparati ed utilizzati in giorni diversi durante un periodo di 4-6 mesi. Come si può vedere i valori di C.V.% sono in genere inferiori al 5-7 % per concentrazioni superiori a 1 mg l^{-1} , mentre dispersioni più elevate si riscontrano solo per concentrazioni inferiori a 0,1 mg l^{-1} . Si deve tuttavia sottolineare che la variabilità non è determinata solo dalla risposta strumentale, ma anche da altre fasi della calibrazione e dell'analisi, quali ad esempio la preparazione, la manipolazione e la conservazione degli *standard*, fasi particolarmente delicate a basse concentrazioni.

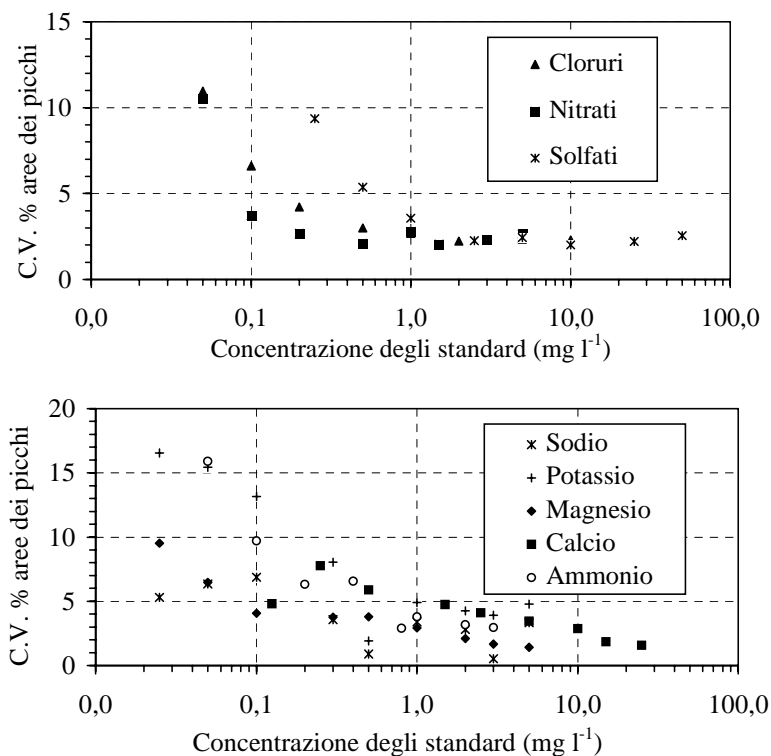


Fig. 3.12. Variazioni percentuali (CV%) sul segnale in area ottenuto dall'iniezione con lo stesso *loop* (50 μl per gli anioni e 100 μl per i cationi) degli *standard* di calibrazione preparati ed utilizzati in giorni diversi. I dati si riferiscono ad un periodo di 4-6 mesi.

Analizzando le rette di calibrazione ottenute per anioni e cationi in IC nei *range* di concentrazioni comunemente riscontrabili nelle acque naturali, si notano risposte generalmente non lineari per gli anioni e l'ammonio, ed abbastanza lineari per i ca-

tioni (Fig. 3.13). Questi comportamenti vengono evidenziati dalla variazione del fattore di risposta per unità di concentrazione (RF), ottenuto dal rapporto fra il segnale misurato dal rivelatore (area del picco) e la concentrazione in mg l^{-1} dell'analitya nello *standard* di calibrazione (Green 1996, Dorschel *et al.* 1989).

$$\text{RF} = \frac{\text{area del picco}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

Gli andamenti dei valori medi di RF ottenuti da *standard* di calibrazione di anioni e cationi preparati ed utilizzati in giorni diversi in un periodo di alcuni mesi e riportati in funzione della concentrazione, sono presentati nelle figure 3.14. e 3.15. L'andamento lineare dell'analitya corrisponde a valori di RF che si mantengono costanti al variare della concentrazione (Na^+ e K^+). Valori di RF in aumento all'aumentare della concentrazione (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Ca^{++} e Mg^{++}), indicano un comportamento non lineare come riportato nell'esempio dei cloruri di figura 3.13, mentre solo per l'ammonio si hanno valori di RF in diminuzione all'aumentare della concentrazione, caratteristici di un andamento non lineare (Fig. 3.13.).

Questi comportamenti che si discostano in modo diverso dalla linearità rendono quindi necessario l'uso di calibrazioni non lineari. Pertanto vista la stabilità della risposta strumentale sulle letture degli *standard* e verificate le scarse condizioni di linearità evidenziate dagli andamenti dei valori di RF, si consiglia sia per gli anioni che per i cationi, di calibrare con regressioni quadratiche eseguite utilizzando almeno 5 *standard* all'inizio ed alla fine dell'analisi di un gruppo di campioni (20-30 analizzati giornalmente). La regressione quadratica è indispensabile nella determinazione dell'ammonio, come evidenziato dall'andamento dei valori di RF di figura 3.15. e dalle prove interlaboratorio riportate in Marchetto *et al.* 1995b.

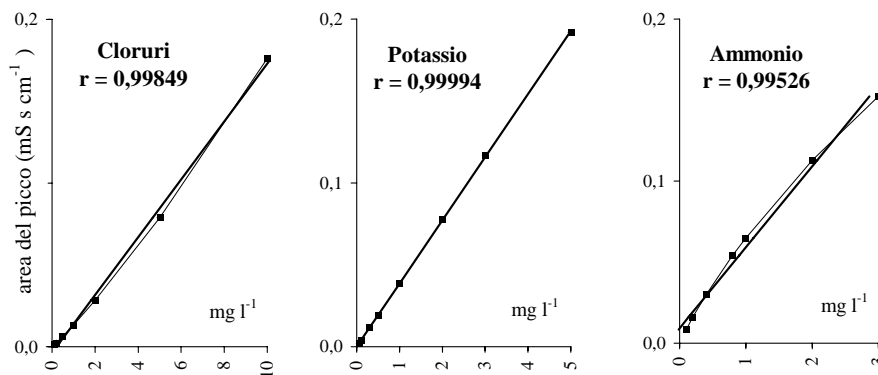


Fig. 3.13. Esempi di grafici di calibrazione in cromatografia ionica per cloruri, potassio ed ammonio. Il quadrato con linea sottile rappresenta l'andamento del segnale rispetto alla linearità riportata con la linea più marcata.

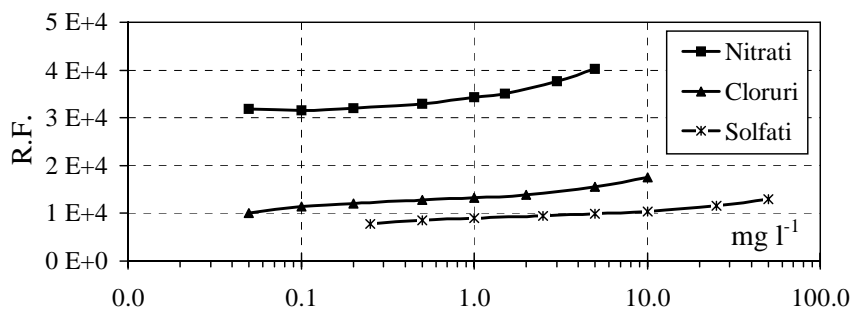


Fig. 3.14. Fattori di risposta in relazione alla concentrazione per l'analisi in cromatografia ionica di cloruri, solfati e nitrati. Segnale in area ottenuto con loop di iniezione da 50 µl.

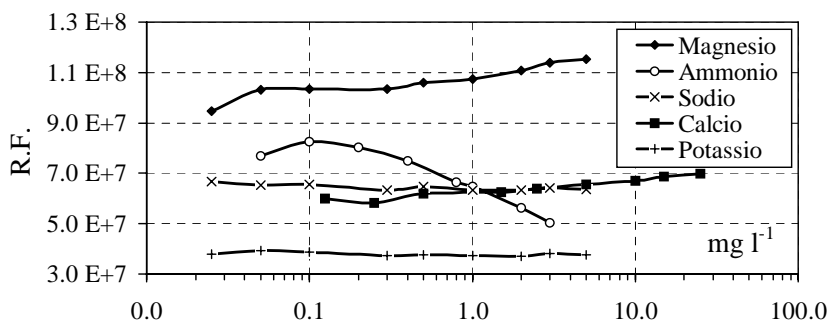


Fig. 3.15. Fattori di risposta in relazione alla concentrazione per l'analisi in cromatografia ionica di calcio, magnesio, sodio, potassio ed ammonio. Segnale in area ottenuto con loop di iniezione da 100 µl.

3.8.2. CLORURI, NITRATI E SOLFATI

Principio del metodo

Un'aliquota di campione, iniettata nel flusso di eluente, viene pompata nella colonna di separazione contenente la resina a scambio anionico: qui gli anioni si separano in base alla loro affinità con i siti attivi della resina. Gli anioni attraversano quindi il sistema di soppressione a micromembrana dove vengono convertiti nei loro corrispondenti acidi forti, contemporaneamente l'eluente viene convertito in forme chimiche a bassa conducibilità.

Il rivelatore conduttometrico, posto dopo il soppressore, permette l'identificazione delle diverse specie anioniche sulla base dei tempi di ritenzione, mentre la loro quantificazione si ottiene dall'area dei picchi, previa adeguata calibrazione.

Un tipico esempio di cromatogramma ottenuto nella determinazione degli anioni è riportato in figura 3.16.

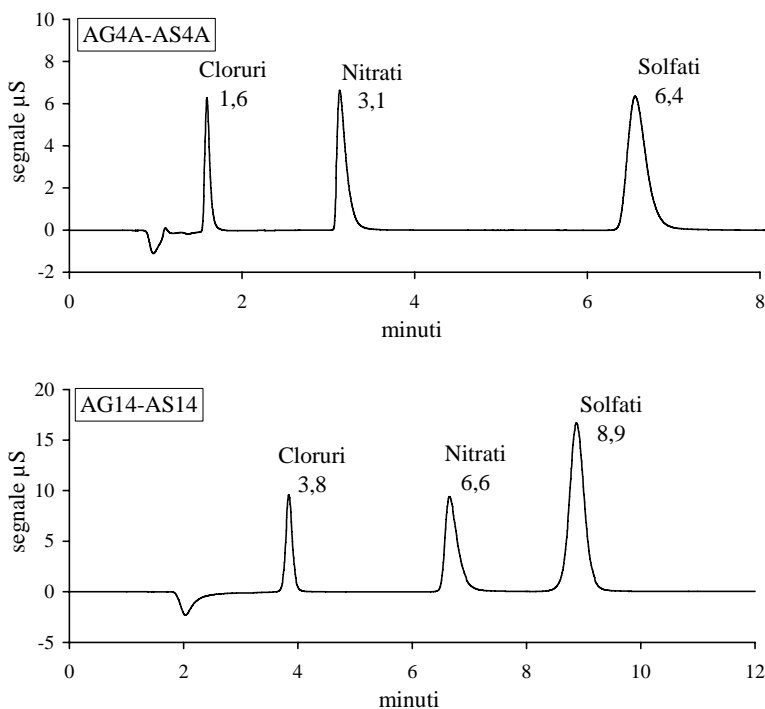


Fig. 3.16. Esempi di cromatogrammi ottenuti nell'analisi in cromatografia ionica con colonne anioniche Dionex AG4A - AS4A ed AG14 - AS14 con soppressore AMMS. Per ogni anione viene riportato il tempo di ritenzione.

Range di utilizzo e ripetibilità

Il limite di detezione (LOD) dipende dal volume iniettato, dal fondo scala impostato sul rivelatore conduttometrico e dai disturbi del segnale visibili sulla linea di base. Nelle condizioni qui descritte il LOD non è stato determinato, mentre il LOQ si può quantificare a circa $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ per cloruri e nitrati, e a circa $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ per i solfati.

Con *loop* di iniezione da $250 \mu\text{l}$ e fondo scala di $3 \mu\text{S}$ o $1 \mu\text{S}$ si possono determinare concentrazioni fino a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$.

Strumentazione utilizzata

Sistema cromatografico Dionex composto da pompa isocratica, rivelatore conduttometrico, vano cromatografico porta colonne ed autocampionatore Thermo Separation Products.

Interfaccia per la gestione dei moduli cromatografici Dionex *Advanced Computer Interface* collegato a *personal computer* IBM compatibile con *software* Dionex AI-450 in ambiente Microsoft Windows.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali ed i manuali di uso e manutenzione delle colonne di separazione e soppressione Dionex.

Tab. 3.41. *Range* di utilizzo e ripetibilità nell'analisi di cloruri, nitrati e solfati in cromatografia ionica a diverse concentrazioni espresse in mg l^{-1} ; valori ottenuti con *loop* di iniezione da 50 μl .

	Range di misura	Ripetibilità	
		Concentrazione	C.V. %
Cloruri (mg l^{-1})	0,10 - 10,0	0,20	8,1
		0,48	2,8
		0,96	3,1
		2,93	2,7
Nitrati (mg N l^{-1})	0,100 - 5,0	0,20	3,2
		0,48	2,8
		0,93	2,0
		3,76	1,4
Solfati ($\text{mg SO}_4 \text{l}^{-1}$)	0,50 - 50,0	1,03	3,0
		2,29	3,4
		4,66	1,7
		9,99	0,6
		24,8	1,2
		31,9	1,4

Colonne ed eluenti

Colonne per separazione isocratica Dionex AG4-A e AS4-A oppure AG14 e AS14.

Soppressione dell'eluente di tipo elettrochimico a micromembrana Dionex ASRS utilizzato in auto-rigenerazione continua.

Eluente: per le colonne AG4-A e AS4-A preparare una soluzione concentrata contenente 7,14 g di sodio bicarbonato per analisi e 9,54 g di sodio carbonato per analisi in 500 ml di acqua deionizzata ultrapura filtrata su 0,22 μm , questa soluzione si conserva per diverse settimane.

Eluente (AG4-A e AS4-A) sodio bicarbonato 1,7 mM e sodio carbonato 1,8 mM preparato per diluizione di 50 ml di soluzione concentrata a 5 litri di acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 μm ; questa soluzione prima dell'utilizzo deve essere degasata con elio grado analitico o con bagno ad ultrasuoni per 10 minuti ed è utilizzabile al massimo per 5 giorni.

Il flusso di eluente consigliato per ottenere un buon compromesso tra separazione, velocità di analisi e ripetibilità è di 2,0 ml al minuto.

Per le colonne AG14 e AS14 preparare una soluzione concentrata contenente 2,52 g di sodio bicarbonato per analisi e 25,44 g di sodio carbonato per analisi in 500 ml di acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 μm , questa soluzione si conserva per diverse settimane.

Eluente (AG14 e AS14) sodio bicarbonato 0,6 mM e sodio carbonato 4,8 mM preparato per diluizione di 50 ml di soluzione concentrata a 5

l di acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 μm . Il flusso di eluente consigliato è di 1,3 ml al minuto.

Soppressore: autosoppressione elettrochimica a micromembrana ASRS-I e SRS *Controller* posizionato al livello di corrente 2 corrispondente a 100 mA.

La conducibilità dell'eluente soppresso è compresa tra 12 e 20 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

ATTENZIONE: il *Controller* SRS del soppressore ASRS deve essere acceso qualche istante prima di attivare il flusso della pompa e spento immediatamente dopo aver fermato il flusso dell'eluente. Questa sequenza è indispensabile in quanto gli elettrodi all'interno del ASRS vengono raffreddati dallo stesso flusso di eluente; tuttavia è altrettanto importante non far passare eluente nel soppressore ASRS con il *Controller* SRS spento, in quanto sono sufficienti pochi secondi per causare una notevole perdita di efficienza del soppressore con conseguente diminuzione della sensibilità analitica.

Condizioni di integrazione

Le condizioni di integrazione vengono ottimizzate con il programma Dionex AI-450 *Optimize*, che permette di modificare i parametri di ogni metodo.

Nelle condizioni di lavoro qui indicate si ottengono cromatogrammi come quello riportato in figura 3.16. dove gli anioni vengono rilevati, con le colonne AG4-A ed AS4-A, in 8 minuti ai seguenti tempi di ritenzione espressi in minuti e decimi di minuto: cloruri 1,6, nitrati 3,3 e solfati 6,6; mentre con le colonne AG14 AS14 i tempi di ritenzione sono i seguenti: cloruri 3,8, nitrati 6,6 e solfati 8,9. Questi tempi di ritenzione possono variare leggermente in funzione dell'invecchiamento della colonna di separazione o del volume morto del sistema analitico.

Preparazione dei campioni

I campioni devono essere preparati negli appositi *vial* per autocampionatore precedentemente lavati con acqua deionizzata; per il riempimento utilizzare una siringa in polietilene da 5 ml alla quale viene applicato un filtro a membrana da 0,8 μm , avvinare almeno due volte la siringa, l'apparato di filtrazione e il *vial* con il campione da analizzare.

Standard di lavoro

Come in tutte le determinazioni cromatografiche anche la cromatografia ionica richiede più calibrazioni giornaliere, è indispensabile quindi aver sempre pronta una serie di *standard* rappresentativi dell'intervallo di concentrazioni dei campioni analizzati; a questo scopo si preparano delle soluzioni multielemento per l'uso più corrente (*standard* da n. 0 a n. 7 di tabella 3.32.).

Quando si analizzano campioni aventi rapporti di concentrazione diversi dagli *standard* multielemento già pronti o concentrazioni tra loro molto simili, è buona

norma preparare degli *standard* specifici a concentrazione vicina a quella dei campioni.

La notevole sensibilità della metodica analitica impone l'utilizzo di sali ad alto grado di purezza (grado analitico) opportunamente essiccati in stufa per almeno 6 ore a 105 °C e conservati in essiccatore.

Note operative: in tutte le fasi della preparazione bisogna prestare la massima attenzione ai possibili inquinamenti tra le diverse soluzioni madre; le pesate si eseguono separatamente utilizzando una bilancia analitica da laboratorio.

È consigliabile utilizzare sempre lo stesso gruppo di pipette a volume fisso e di classe A per ogni soluzione *standard*; i matracci tarati devono essere di classe A risciacquati di volta in volta solo con acqua deionizzata ultrapura.

Ogni volta che si preparano nuovi *standard*, questi vanno confrontati con i precedenti per verificare che nella preparazione non siano stati commessi errori; sono accettabili differenze massime fra nuovi e vecchi *standard* nell'ordine di grandezza del 3%.

Tutte le operazioni di diluizione si eseguono con acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 µm.

Soluzioni madre multielemento:

- A in matraccio da 500 ml - conservabile per due mesi
 0,8242 g NaCl = 1000 mg Cl l⁻¹
 4,5353 g K₂SO₄ = 5000 mg SO₄ l⁻¹
- B in matraccio da 1000 ml - conservabile un mese
 10 ml madre A in 1000 ml = 10 mg Cl l⁻¹
 = 50 mg SO₄ l⁻¹

Soluzioni madre singolo elemento:

- C in matraccio da 500 ml - conservabile un mese
 3,0341 g NaNO₃ = 1000 mg N-NO₃ l⁻¹
- D in matraccio da 200 ml - conservabile una settimana
 2 ml madre C in 200 ml = 10 mg N-NO₃ l⁻¹

Nel caso si debbano preparare delle soluzioni *standard* diverse da quelle riportate in tabella 3.33, può essere utile avere a disposizione anche le seguenti soluzioni madre a singolo elemento:

- E in matraccio da 500 ml - conservabile due mesi
 0,8242 g NaCl = 1000 mg Cl l⁻¹
- F in matraccio da 200 ml - conservabile un mese
 20 ml madre E in 200 ml = 100 mg Cl l⁻¹
- G in matraccio da 1000 ml - conservabile due mesi
 0,9071 g K₂SO₄ = 500 mg SO₄ l⁻¹

Gli *standard* multielemento per la calibrazione degli anioni vengono preparati partendo dalle soluzioni madre precedentemente descritte per diluizione in matraccio da 200 ml per lo *standard* 0 ed in matraccio da 100 ml per gli *standard* da 1 a 7; lo schema delle diluizioni è riportato in tabella 3.32, mentre le concentrazioni risultanti sono riportate in tabella 3.33.

Tab. 3.32. Diluizioni delle soluzioni madre A, B, C e D per la preparazione delle soluzioni *standard* multielemento per la calibrazione degli anioni in cromatografia ionica.

Soluzione madre	St. 0 in 200 ml	St. 1 in 100 ml	St. 2 in 100 ml	St. 3 in 100 ml	St. 4 in 100 ml	St. 5 in 100 ml	St. 6 in 100 ml	St. 7 in 100 ml
A								1000 µl
B	1000 µl	1000 µl	2000 µl	5000 µl	10 ml	20 ml	50 ml	
C								500 µl
D	1000 µl	1000 µl	2000 µl	5000 µl	10 ml	15 ml	30 ml	

Questi *standard*, le cui concentrazioni sono riassunte in tabella 3.33, sono utilizzabili per una settimana e si conservano a temperatura ambiente in recipienti da 100 ml in policarbonato con tappo a vite e bocca larga di facile accesso alla siringa per il prelievamento; ogni recipiente e ogni siringa devono essere utilizzati sempre e solo per lo stesso *standard*.

Tab. 3.33. Concentrazioni in mg l⁻¹ delle soluzioni *standard* multielemento per la calibrazione degli anioni in cromatografia ionica.

Variabile	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7
Cl ⁻	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00	2,00	5,0	10,0
N-NO ₃ ⁻	0,050	0,100	0,200	0,500	1,000	1,50	3,00	5,00
SO ₄ ²⁻	0,025	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	25,0	50,0

Analisi

Le seguenti note analitiche sono indicative e relative alla strumentazione precedentemente citata, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore; per ulteriori informazioni tecniche vedere quindi gli specifici manuali relativi alle colonne e alla strumentazione Dionex e Thermo Separation Products.

Prima di iniziare un ciclo analitico, colonne di separazione e soppressore vanno equilibrati con il flusso degli eluenti per almeno 30 minuti, fino ad ottenere una linea di base stabile al *range* conduttometrico di lavoro (verificare la stabilizzazione iniettando qualche *standard*).

L'analisi dei campioni viene eseguita iniettando *standard* e campioni in un *loop* a volume fisso solitamente da 50 o 100 µl. Volendo migliorare la sensibilità senza diminuire il fondoscala di rivelazione conduttometrica, si possono utilizzare *loop* fino a volumi di 250 µl.

Un ciclo di analisi è solitamente composto dalla sequenza di 5 *standard* per la calibrazione quadratica e di 20÷25 campioni; insieme ai quali si devono analizzare 1 o 2 carte di controllo (vedi paragrafo 4.2.4) ed almeno un bianco di acqua ultrapura.

È importante confrontare le calibrazioni al fine di verificare che il segnale ottenuto per ogni *standard* non sia più del 3 % differente dalle precedenti calibrazioni; il *software* Dionex AI-450 permette di confrontare la lettura di ogni *standard* con il precedente, meglio ancora se si predispone un *file* su foglio elettronico per l'archiviazione ed il confronto con una lunga serie di segnali in area relativi alle calibrazioni precedenti.

Le calibrazioni si eseguono per regressione quadratica della concentrazione di ogni analita contro l'area del corrispondente picco. L'uso di regressioni lineari in ampi *range* di calibrazione (1-2 ordini di grandezza) porta ad errori sistematici particolarmente evidenti alle basse concentrazioni; pertanto le regressioni lineari sono consigliabili solo per intervalli di concentrazioni molto ristretti. Per una dettagliata discussione su questo importante aspetto della calibrazione si rimanda al paragrafo 3.8.1 e a Tartari *et al.* (1995).

Riferimenti bibliografici.

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewater. (Method 4110 B)*. Am. Publ. Health Ass., Washington.
- Durst R.A., W. Davison, K. Toth, J. E. Rothert, M. E. Peden & B. Griepink. I.U.P.A.C. 1991. Analysis of wet deposition (acid rain): determination of the major anionic constituents by ion chromatography. *Pure & Appl. Chem.*, 63: 907-915.
- Tartari, G.A., A. Marchetto & R. Mosello. 1995. Precision and linearity of inorganic analyses by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 706: 21-29.
- Marchetto, A., R. Mosello, G.A. Tartari, H. Muntau, M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G. Serrini & G. Serrini Lanza. 1995. The precision of IC analyses compared with that of other analytical techniques through intercomparison exercises. *J. Chromatogr. A*, 706: 13-19.

3.8.3. CALCIO, MAGNESIO, SODIO, POTASSIO ED AMMONIO

Principio del metodo

Un'aliquota di campione, iniettata nel flusso di eluente, viene pompata nella colonna di separazione contenente la resina a scambio cationico: qui i cationi si separano in base alla loro affinità con i siti attivi della resina. I cationi attraversano quindi il sistema di soppressione a micromembrana dove vengono convertiti nelle loro corrispondenti basi forti, contemporaneamente l'eluente viene convertito in forme chimiche a bassa conducibilità.

Il rivelatore conduttometrico, posto dopo il soppressore, permette l'identificazione delle diverse specie cationiche sulla base dei tempi di ritenzione, mentre la loro quantificazione si ottiene dall'area dei picchi, previa adeguata calibrazione.

Un tipico esempio di cromatogramma ottenuto nella determinazione dei cationi è riportato in figura 3.17.

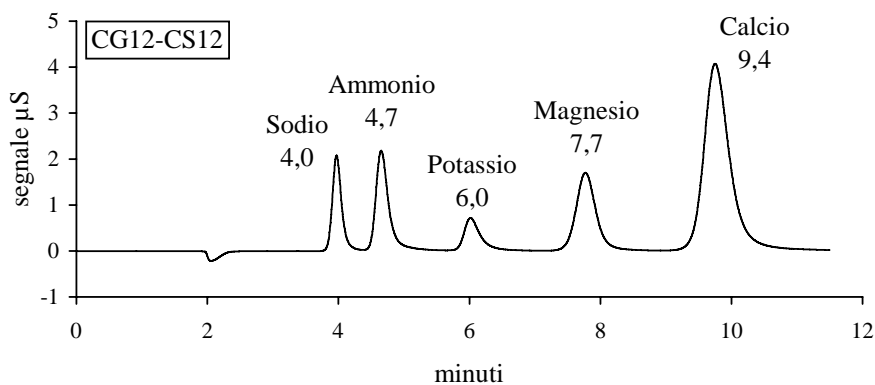


Fig. 3.17. Esempio di cromatogramma ottenuto nell'analisi in cromatografia ionica con colonne cationiche Dionex CG12 - CS12 - CMMS. Per ogni catione viene riportato il tempo di ritenzione.

Range di utilizzo e ripetibilità

Tab. 3.34. *Range* di utilizzo e ripetibilità nell'analisi di sodio, potassio, magnesio, calcio ed azoto ammoniacale in cromatografia ionica a diverse concentrazioni espresse in mg l^{-1} ; valori ottenuti con *loop* di iniezione da 100 μl .

	Range di misura	Ripetibilità	
		Concentrazione	C.V. %
Sodio	0,05 - 10,0	0,19	12,6
		0,29	3,2
		1,04	2,9
		3,98	2,5
		5,00	1,4
Potassio	0,05 - 10,0	0,12	11,7
		0,28	4,2
		0,53	5,7
		1,01	4,4
		2,95	2,0
Magnesio	0,05 - 10,0	0,29	2,9
		1,68	2,0
		3,15	1,3
Calcio	0,25 - 50,0	0,54	5,6
		1,42	2,3
		2,60	3,9
		12,8	1,9
		19,9	2,3
Azoto ammoniacale	0,05 - 3,00	0,19	3,1
		0,36	3,8
		0,51	3,1
		0,93	2,2

Il limite di detezione (LOD) dipende dal volume iniettato, dal fondo scala impostato sul rivelatore conduttometrico e dai disturbi del segnale visibili sulla linea di base. Nelle condizioni qui descritte il LOD non è stato determinato, mentre il LOQ si può quantificare a circa $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ per sodio, potassio, magnesio ed azoto ammoniacale e a circa $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ per il calcio.

Con *loop* di iniezione da $250 \mu\text{l}$ e fondoscala di $3 \mu\text{S}$ o $1 \mu\text{S}$ si possono determinare concentrazioni fino a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$

Strumentazione utilizzata

Sistema cromatografico Dionex composto da pompa isocratica, rivelatore conduttometrico, vano cromatografico porta colonne ed autocampionatore Thermo Separation Products.

Interfaccia per la gestione dei moduli cromatografici Dionex *Advanced Computer Interface* collegato a *personal computer* IBM compatibile con *software* Dionex AI-450 in ambiente Microsoft Windows.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali ed i manuali di uso e manutenzione delle colonne di separazione e soppressione Dionex.

Colonne ed eluenti

Colonne per separazione isocratica Dionex CG12 e CS12 o CG12-A e CS12-A.

Soppressione dell'eluente di tipo elettrochimico a micromembrana Dionex CSRS utilizzato in autorigenerazione continua.

Eluente: soluzione concentrata contenente $96,1 \text{ g}$ di acido metansolfonico Aldrich al 99% per analisi in 500 ml di acqua deionizzata ultrapura filtrata su $0,22 \mu\text{m}$; questa soluzione si conserva per diverse settimane.

Eluente 20 mM acido metansolfonico preparato per diluizione di 50 ml di soluzione concentrata a 5 litri di acqua deionizzata ultrapura filtrata a $0,22 \mu\text{m}$; questa soluzione prima dell'utilizzo deve essere degasata con elio di grado analitico o con bagno ad ultrasuoni per 10 minuti ed è utilizzabile al massimo per 5 giorni .

Il flusso di eluente consigliato per ottenere un buon compromesso tra separazione, velocità di analisi e ripetibilità è di $1,0 \text{ ml}$ al minuto.

Soppressore: autosoppressione elettrochimica a micromembrana CSRS-I e SRS *Controller* posizionato al livello di corrente 2 corrispondente a 100 mA .

La conducibilità dell'eluente soppresso è generalmente compresa tra $0,5$ e $2 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Attenzione: il *Controller* SRS del soppressore CSRS deve essere acceso qualche istante prima di attivare il flusso della pompa e spento immediatamente dopo aver fermato il flusso dell'eluente. Questa sequenza è indispensabile in quanto gli elettrodi all'interno del soppressore CSRS vengono raffreddati dallo stesso flusso di eluente; tuttavia

è altrettanto importante non far passare eluente nel soppressore CSRS con il *Controller* SRS spento, in quanto sono sufficienti pochi secondi per causare una notevole perdita di efficienza del soppressore con conseguente diminuzione della sensibilità analitica.

Condizioni di integrazione

Le condizioni di integrazione vengono ottimizzate con il programma Dionex AI-450 *Optimize*, che permette di modificare tutti i parametri di ogni metodo.

Nelle condizioni di lavoro qui indicate si ottengono cromatogrammi come quello riportato in figura 3.17, dove i cationi vengono rilevati in 12 minuti ai seguenti tempi di ritenzione espressi in minuti e decimi di minuto: sodio 4,0, ammonio 4,6, potassio 6,0, magnesio 7,2 e calcio 9,0. Questi tempi di ritenzione possono variare leggermente in funzione dell'invecchiamento della colonna di separazione o del volume morto del sistema analitico.

Preparazione dei campioni

I campioni devono essere preparati negli appositi *vial* per autocampionatore precedentemente lavati con acqua deionizzata; per il riempimento utilizzare una siringa in polietilene da 5 ml alla quale viene applicato un filtro a membrana da 0,8 μm , avvinare almeno due volte la siringa, l'apparato di filtrazione e il *vial* con il campione da analizzare. Per quanto riguarda l'uso dei *vial* in vetro bisogna sottolineare che il vetro, anche di buona qualità, può rilasciare sodio e potassio in elevate concentrazioni (0,2-0,5 mg l^{-1}); pertanto nell'analisi dei cationi si consiglia l'uso di *vial* in materiale plastico (polietilene o polipropilene). In ogni caso è sempre meglio eseguire delle prove di rilascio, con acqua ultrapura per 24-48 ore, sui *vial* utilizzati per queste determinazioni.

Standard di lavoro

Come tutte le determinazioni cromatografiche, anche la cromatografia ionica richiede più calibrazioni giornaliere. È indispensabile quindi aver sempre pronta una serie di *standard* rappresentativi dell'intervallo di concentrazioni dei campioni analizzati; a questo scopo si preparano delle soluzioni multielemento per l'uso più corrente (*standard* da n. 0 a n. 8 di tabella 3.35.).

Quando si analizzano campioni aventi rapporti di concentrazione diversi dagli *standard* multielemento già pronti o concentrazioni tra loro molto simili, è buona norma preparare degli *standard* specifici a concentrazione vicina a quella dei campioni.

La notevole sensibilità della metodica analitica impone l'utilizzo di sali ad alto grado di purezza (grado analitico) opportunamente essiccati; si consigliano soluzioni *standard* a singolo elemento pronte per l'uso alla concentrazione di 1 mg ml^{-1} in genere utilizzate per le determinazioni in assorbimento atomico.

Note operative: in tutte le fasi della preparazione bisogna prestare la massima attenzione ai possibili inquinamenti tra le diverse soluzioni madre; eventuali pesate si eseguono separatamente utilizzando una bilancia analitica da laboratorio.

È consigliabile utilizzare sempre lo stesso gruppo di pipette a volume fisso e di classe A per ogni soluzione *standard*; i matracci tarati devono essere di classe A risciacquati di volta in volta solo con acqua deionizzata ultrapura.

Ogni volta che si preparano nuovi *standard*, questi vanno confrontati con i precedenti per verificare che nella preparazione non siano stati commessi errori; sono accettabili differenze massime fra nuovi e vecchi *standard* nell'ordine di grandezza del 3%. Tutte le operazioni di diluizione si eseguono con acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 µm.

A causa della limitata solubilità e dell'elevata idratazione dei sali di calcio e magnesio si consiglia l'uso di soluzioni *standard* a singolo elemento pronte per l'uso alla concentrazione di 1 mg ml⁻¹.

Soluzioni madre multielemento:

M in matraccio da 500 ml - conservabile per un mese.

5 ml *standard* Na = 10 mg Na l⁻¹

5 ml *standard* K = 10 mg K l⁻¹

5 ml *standard* Mg = 10 mg Mg l⁻¹

25 ml *standard* Ca = 50 mg Ca l⁻¹

N in matraccio da 1000 ml - conservabile sei mesi a pH circa 3

0,76378 g NH₄Cl in 1000 ml = 200 mg N-NH₄ l⁻¹

Per stabilizzare la soluzione madre N, prima di portare a volume, acidificare con 300 µl di acido cloridrico 30% per analisi; il pH finale deve essere di circa 3.

Gli *standard* multielemento vengono preparati partendo dalle soluzioni madre precedentemente descritte per diluizione in matraccio da 200 ml per lo *standard* 0 ed in matraccio da 100 ml per gli *standard* da 1 a 8; lo schema delle diluizioni è riportato in tabella 3.35, mentre le concentrazioni risultanti sono riportate in tabella 3.36.

Tab. 3.35. Diluizioni delle soluzioni madre M e N per la preparazione delle soluzioni *standard* multielemento per la calibrazione dei cationi in cromatografia ionica.

Soluzione madre	St. 0 in 200 ml	St. 1 in 100 ml	St. 2 in 100 ml	St. 3 in 100 ml	St. 4 in 100 ml	St. 5 in 100 ml	St. 6 in 100 ml	St. 7 in 100 ml	St. 8 in 100 ml
M	500 µl	500 µl	1000 µl	3000 µl	5000 µl	10 ml	20 ml	30 ml	50 ml
N	50 µl	50 µl	100 µl	200 µl	400 µl	500 µl	1000 µl	1500 µl	1500 µl

Questi *standard*, le cui concentrazioni sono riassunte in tabella 3.36, sono utilizzabili per una settimana e si conservano a temperatura ambiente in recipienti da 100 ml in policarbonato con tappo a vite e bocca larga di facile accesso alla siringa per il prelievamento; ogni recipiente ed ogni siringa verranno utilizzati sempre e solo per quello *standard*.

Tab. 3.36. Concentrazioni in mg l⁻¹ delle soluzioni *standard* multielemento per le calibrazioni dei cationi in cromatografia ionica.

Variabile	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8
Na ⁺	0,025	0,05	0,10	0,30	0,50	1,00	2,00	3,00	5,00
N-NH ₄ ⁺	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,00	2,00	3,00	3,00
K ⁺	0,025	0,05	0,10	0,30	0,50	1,00	2,00	3,00	5,00
Mg ⁺⁺	0,025	0,05	0,10	0,30	0,50	1,00	2,00	3,00	5,00
Ca ⁺⁺	0,125	0,25	0,50	1,50	2,50	5,00	10,00	15,00	25,00

Analisi

Le seguenti note analitiche sono indicative e relative alla strumentazione precedentemente citata, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore; per ulteriori informazioni tecniche vedere quindi gli specifici manuali relativi alle colonne ed alla strumentazione Dionex e Thermo Separation Products.

Prima di iniziare un ciclo analitico, colonne di separazione e soppressore vanno equilibrati con il flusso degli eluenti per almeno 30 minuti, fino ad ottenere una linea di base stabile al *range* conduttometrico di lavoro (verificare la stabilizzazione iniettando qualche *standard*).

L'analisi dei campioni viene eseguita iniettando *standard* e campioni in un *loop* a volume fisso solitamente di 100 µl. Volendo migliorare la sensibilità senza diminuire il fondoscala di rivelazione conduttometrica, si possono utilizzare *loop* fino a volumi di 250 µl.

Un ciclo di analisi è solitamente composto dalla sequenza di 5 *standard* di calibrazione e di 20-25 campioni, insieme ai quali si devono analizzare 1 o 2 carte di controllo (vedi paragrafo 4.2.4.) ed almeno un bianco di acqua ultrapura.

È importante confrontare le calibrazioni al fine di verificare che il segnale ottenuto per ogni *standard* non sia più del 3% differente dalle precedenti calibrazioni; il *software* Dionex AI-450 permette di confrontare la lettura di ogni *standard* con il precedente, meglio ancora se si predispone un *file* su foglio elettronico per l'archiviazione ed il confronto con una lunga serie di segnali in area relativi alle calibrazioni precedenti.

Le calibrazioni si eseguono per regressione della concentrazione di ogni analita contro l'area del corrispondente picco, si consiglia l'utilizzo di regressioni lineari o quadratiche per sodio e potassio, mentre le regressioni quadratiche sono indispensabili per ammonio, calcio e magnesio. Per l'ammonio l'uso della regressione lineare in ampi *range* di calibrazione (1-2 ordini di grandezza) può portare ad elevati errori sistematici. Per una dettagliata discussione su questo importante aspetto della calibrazione si rimanda al paragrafo 3.8.1 e a Tartari *et al.* (1995).

Riferimenti bibliografici.

- U.S.E.P.A. 1986. Dissolved sodium, ammonium, potassium, magnesium and calcium in wet deposition by chemical suppressed ion chromatography. Method 300.7. Cincinnati, Ohio.
- Tartari, G.A., A. Marchetto & R. Mosello. 1995. Precision and linearity of inorganic analyses by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 706: 21-29.
- Marchetto, A., R. Mosello, G.A. Tartari, H. Muntau, M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G. Serrini & G. Serrini Lanza. 1995. The precision of IC analyses compared with that of

other analytical techniques through intercomparison exercises. *J. Chromatogr. A*, 706: 13-19.

3.9. ANALISI IN ASSORBIMENTO ATOMICO

Le prime tecniche analitiche in assorbimento atomico (AAS) risalgono agli anni sessanta. Da allora questa tecnica ha avuto moltissimi sviluppi ed applicazioni, tra cui i più importanti sono sicuramente stati l'introduzione del fornello di grafite con o senza piattaforma di L'vov e l'utilizzo di varie tecniche per la soppressione delle interferenze quale ad esempio l'effetto Zeeman. Una descrizione approfondita delle tecniche in assorbimento atomico esula dagli scopi di questa trattazione, pertanto si rimanda per approfondimenti degli aspetti teorici a Slavín (1969), Welz (1976) e per gli aspetti analitici più generici ad A.P.H.A. (1992), Minoia & Caroli (1989).

Per quanto riguarda l'uso di questa tecnica analitica nei laboratori dell'Istituto, bisogna sottolineare che il suo maggiore utilizzo è stato fatto negli anni '70 ed '80 per le determinazioni di calcio, magnesio, sodio e potassio in fiamma e di alcuni metalli pesanti in fornello di grafite; dal 1990 l'introduzione della cromatografia ionica per la determinazione dei principali cationi ha diminuito notevolmente l'uso dell'assorbimento atomico in fiamma, mentre sono continuate le determinazioni dei metalli pesanti in fornello di grafite.

Come per le altre metodiche fino ad ora descritte, anche in questo capitolo verranno riportate per ogni metodo le informazioni riguardanti il principio della determinazione, il *range* di utilizzo riferito alle condizioni ottimizzate per l'analisi di *routine* presso il laboratorio dell'Istituto. Vengono poi descritti i reagenti necessari per la determinazione, il procedimento analitico e gli *standard* utilizzati nelle fasi di calibrazione; infine si riportano i riferimenti bibliografici da cui sono tratte le metodiche. Nelle descrizioni degli aspetti pratici più direttamente collegati all'uso dei metodi, si farà riferimento esclusivamente alla strumentazione in uso nel laboratorio dell'Istituto.

3.9.1. MODALITÀ DI CALIBRAZIONE

Queste determinazioni strumentali richiedono delle modalità operative specifiche tipiche della strumentazione utilizzata; pertanto nelle fasi di calibrazione le concentrazioni degli *standard* devono essere ottimizzate secondo le indicazioni consigliate dalla ditta costruttrice dello strumento. Le modalità di calibrazione descritte in questo paragrafo sono esclusivamente applicabili agli strumenti per assorbimento atomico della ditta Perkin Elmer serie 460 e 2380, in uso nel laboratorio dell'Istituto. Per questa strumentazione la ditta costruttrice consiglia la calibrazione lineare tra lo zero (il bianco) ed uno *standard* (S1) posto nella zona di linearità; nel caso si debba lavorare a concentrazioni oltre la linearità si consiglia l'uso di uno zero e di due o tre *standard* (S1, S2 ed S3) scelti secondo lo schema:

- S1 soluzione *standard* con valore corrispondente al massimo di linearità in quelle condizioni operative e verificato con degli appropriati *standard*;
- S2 soluzione *standard* a concentrazione tre volte il valore dello *standard* S1;
- S3 soluzione *standard* a concentrazione due volte il valore dello *standard* S2.

Queste modalità di calibrazione sono dettagliatamente descritte da Perkin Elmer (1982) e devono essere scrupolosamente seguite al fine di mantenere una buona ripetibilità analitica.

3.9.2. CALCIO, MAGNESIO, SODIO E POTASSIO

Principio del metodo

La determinazione in assorbimento atomico (AAS) si basa sulla capacità dell'atomo dell'elemento in esame di assorbire radiazioni elettromagnetiche di determinate frequenze o lunghezza d'onda. In AAS la luce emessa da una lampada a catodo cavo a scarica elettrica, della lunghezza d'onda specifica per l'elemento analizzato, attraversa il sistema di atomizzazione (in questo caso la fiamma aria-acetilene) e viene assorbita dagli atomi dell'elemento; la quantità di luce assorbita è proporzionale alla concentrazione.

Nella determinazione di calcio e magnesio, viene aggiunto lantanio al fine di eliminare l'interferenza che può essere causata dalla presenza di elevate concentrazioni di solfati, fosfati, alluminati o silicati.

Lunghezze d'onda di lettura e campo di utilizzo

Calcio	422,7 nm	0,01 - 50,0 mg l ⁻¹
Magnesio	285,2 nm	0,01 - 12,0 mg l ⁻¹
Sodio	589,0 nm	0,01 - 6,0 mg l ⁻¹
Potassio	766,5 nm	0,03 - 4,0 mg l ⁻¹

Reagenti

Soluzione di lantanio contenente 50 g La l⁻¹ preparata con 58,7 g di ossido di lantanio sciolti in circa 50 ml di acqua ultrapura e 250 ml di acido cloridrico 37%, il tutto portato a 1000 ml con acqua ultrapura.

Questa soluzione è stabile per mesi ed è conservata in bottiglia già munita di dispensatore da 0-5 ml.

L'aggiunta di 2 ml di questa soluzione a 25 ml di campione, permette di ottenere una concentrazione finale dello 0,4% di lantanio.

Preparazione dei campioni

Utilizzare bottiglie in polietilene da 50 ml, prelevare 25 ml di campione per l'analisi di calcio e magnesio ed aggiungere 2 ml della soluzione di lantanio. Per l'analisi di sodio e potassio è sufficiente conservare circa 50 ml di campione tal quale.

I campioni così prelevati ed ordinati in cassette, vengono conservati in frigorifero a 4° C al buio fino all'analisi che si può effettuare anche dopo un mese dalla data di campionamento.

Calibrazione

Utilizzando soluzioni *standard* già pronte per l'uso contenenti 1,00 mg per millilitro del catione in esame, preparare le soluzioni riportate in tabella 3.37. utilizzando

quattro matracci da 500 ml precedentemente lavati con acido solforico e risciacquati esclusivamente con acqua deionizzata, portando poi a volume con acqua ultrapura.

Nell'analisi di sodio e potassio la taratura dello strumento viene eseguita con le soluzioni tal quali, mentre per calcio e magnesio sarà necessario aggiungere la soluzione di lantanio nel rapporto di 8 ml in 100 ml.

Al fine di verificare l'ottimizzazione delle condizioni strumentali si consiglia di controllare per ogni *standard* riportato tra parentesi [] in tabella 3.37, il raggiungimento di un segnale in assorbanza di circa 0,200 u.A.

Nel corso dell'analisi il controllo della calibrazione deve essere eseguito ogni 20-30 campioni ed in tutti i casi in cui vi siano variazioni nelle condizioni di nebulizzazione o nei rapporti della miscela aria-acetilene.

Tab. 3.37. Diluizioni delle soluzioni *standard* monoelemento per assorbimento atomico nella preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione multielemento. Tra parentesi [] valore in concentrazione corrispondente ad un segnale di circa 0,2 u.A, in condizioni analitiche ottimali.

	Matraccio A	Matraccio B	Matraccio C	Matraccio D
	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml
Sodio mg l ⁻¹	[0,40]	1,00	3,00	6,00
<i>standard</i> Na AAS	200 µl	500 µl	1500 µl	3000 µl
Potassio mg l ⁻¹	0,40	1,00	[2,00]	4,00
<i>standard</i> K AAS	200 µl	500 µl	1000 µl	2000 µl
Calcio mg l ⁻¹	[4,00]	10,00	30,0	50,0
<i>standard</i> Ca AAS	2000 µl	5000 µl	15 ml	25 ml
Magnesio mg l ⁻¹	[0,40]	2,00	6,00	12,00
<i>standard</i> Mg AAS	200 µl	1000 µl	3000 µl	6 ml

Strumentazione utilizzata

Spettrofotometro per assorbimento atomico Perkin Elmer modello AAS 460 o 2380 con fiamma aria-acetilene.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali ed i manuali di uso e manutenzione della Perkin Elmer.

Analisi

L'analisi si esegue mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in fiamma aria - acetilene seguendo le indicazioni descritte nei manuali Perkin Elmer, *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry* (1976) e supplementi (1982), relativi all'uso della fiamma aria-acetilene e degli spettrofotometri Perkin Elmer modello 460 e 2380.

Riferimenti bibliografici.

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Healt Ass., Washington.
- Perkin Elmer. 1976. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. Norwalk, Connecticut, USA.

Perkin Elmer. 1982. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy (supplement to 1976 edition)*. Norwalk, Connecticut, U.S.A.

3.9.3. METALLI

Principio del metodo

La determinazione in assorbimento atomico (AAS) si basa sulla capacità dell'atomo dell'elemento in esame di assorbire radiazioni elettromagnetiche con determinate energie (frequenze o lunghezza d'onda). In AAS la luce emessa da una lampada a catodo cavo a scarica elettrica, della lunghezza d'onda specifica per l'elemento analizzato, attraversa il sistema di atomizzazione (in questo caso il tubo di grafite posto all'interno del fornello di riscaldamento) e viene assorbita dagli atomi dell'elemento; la quantità di luce assorbita è proporzionale alla concentrazione.

L'analisi in fornello di grafite rispetto all'analisi in fiamma per questi metalli ed in queste condizioni, ha un limite di rivelabilità da 100 a 1000 volte superiore.

Lunghezze d'onda di lettura e campo di utilizzo

Alluminio	309,3 nm	5 - 150 $\mu\text{g l}^{-1}$
Rame	324,7 nm	2 - 50 $\mu\text{g l}^{-1}$
Zinco	213,9 nm	2 - 100 $\mu\text{g l}^{-1}$
Nichel	232,0 nm	2 - 30 $\mu\text{g l}^{-1}$
Cromo	357,9 nm	1 - 10 $\mu\text{g l}^{-1}$
Ferro	248,3 nm	5 - 300 $\mu\text{g l}^{-1}$
Manganese	279,5 nm	5 - 200 $\mu\text{g l}^{-1}$

Reagenti

Acido nitrico al 65% ultrapuro per la determinazione di metalli pesanti (Merck Suprapur art. 441).

Membrane filtranti Nuclepore di diametro 47 mm in policarbonato con porosità 0,4 μm .

Vetreteria

Per queste determinazioni è indispensabile che tutti i recipienti (vetro o polietilene) utilizzati per il campionamento e l'analisi, vengano lavati con acido nitrico circa 0,2 N, preparato per diluizione di 20 ml di acido nitrico al 65% per analisi in 1000 ml di acqua deionizzata.

Per il campionamento occorrono bottiglie in polietilene da 50 ml, siringhe in polietilene da 50 ml ed apparati di filtrazione da 47 mm di diametro in policarbonato da applicare direttamente alle siringhe; per l'analisi servono matracci tarati da 100 ml ed i recipienti per l'autocampionatore del fornello di grafite.

Preparazione dei campioni

Queste operazioni vanno eseguite sul campo al momento del prelievo del campione al fine di prevenire eventuali inquinamenti del campione o possibili processi di adsorbimento dei sulle pareti dei recipienti.

Risciacquare con il campione d'acqua la siringa e l'apparato di filtrazione, munito di filtro in policarbonato Nuclepore da 0,4 μm ; prelevare 60 ml di campione e, lasciando inserito l'apparato di filtrazione, portare il pistone a 50 ml eliminando il volume di campione in eccesso e filtrare nel recipiente in polietilene tappando immediatamente.

Prima del successivo prelievo sostituire il filtro e risciacquarlo assieme all'apparato di filtrazione; nel caso si filtrino campioni con concentrazioni molto simili è sufficiente risciacquare il tutto senza sostituire il filtro.

In laboratorio il campione viene fissato con 1 ml di acido nitrico al 65% ultrapuro per la determinazione dei metalli. Per una descrizione più approfondita sulle modalità di campionamento e conservazione dei campioni si rimanda a Henriksen & Balmer (1977).

I campioni così prelevati ed ordinati in cassette, vengono conservati in frigorifero a 4 °C fino al giorno dell'analisi, che deve essere effettuata entro sei mesi dalla data di campionamento.

Calibrazione

Per la preparazione degli *standard* di lavoro è consigliabile utilizzare soluzioni per assorbimento atomico già pronte per l'uso contenenti 1,00 mg per millilitro del metallo in esame. Utilizzare vetreria lavata con acido nitrico circa 0,2 N risciacquata esclusivamente con acqua ultrapura. Portare a volume con acqua ultrapura; nelle soluzioni *standard* utilizzate per la calibrazione dopo aver portato a volume con acqua ultrapura, aggiungere 2 ml di acido nitrico al 65% per analisi di metalli pesanti in 100 ml di *standard*. Con questa aggiunta gli *standard* ed i campioni sono nelle stesse condizioni di diluizione dei campioni.

Le concentrazioni degli *standard* di lavoro devono essere scelte ed ottimizzate in funzione del tubo di grafite utilizzato, del volume di campione iniettato nel fornetto di grafite, del tempo impostato per il raggiungimento della temperatura di atomizzazione e del flusso di gas argon all'interno del tubo di grafite al momento dell'atomizzazione. Tutte queste condizioni influiscono significativamente sull'intensità del segnale e quindi sulla linearità, pertanto devono essere controllate e verificate in funzione delle modalità di calibrazione descritte nel paragrafo 3.9.1. Inoltre le concentrazioni degli *standard* devono essere molto prossime alle concentrazioni dei campioni analizzati e devono essere ottimizzate con le modalità di calibrazione proposte dalla ditta costruttrice dello strumento.

Nel corso dell'analisi la verifica della calibrazione deve essere eseguita ogni 10-12 campioni ed in tutti i casi in cui vi siano variazioni nelle condizioni analitiche precedentemente descritte. Le letture degli *standard* vanno eseguite in triplo.

Strumentazione utilizzata

Spettrofotometro per assorbimento atomico Perkin Elmer modello AAS 2380.

Fornetto in grafite Perkin Elmer modello HGA 400.

Autocampionatore per fornetto in grafite Perkin Elmer modello AS 40.

Per ulteriori particolari riguardanti installazione, uso e manutenzione, calibrazione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali dei singoli componenti strumentali ed i manuali di uso e manutenzione della ditta Perkin Elmer.

Analisi

L'analisi si esegue in spettrofotometria di assorbimento atomico con fornello di grafite HGA 400 seguendo le indicazioni descritte nel manuale *Analytical Methods for Furnace Atomic Absorption Spectroscopy* (1980) della casa costruttrice Perkin Elmer. L'iniezione del campione nel fornello di grafite viene eseguita dall'autocampionatore AS 40; normalmente il volume iniettato è di 20 μl ma volendo migliorare la sensibilità si può aumentare il volume fino a 90 μl . Per ogni campione si eseguono sempre tre letture dalle quali si ricava poi il valore medio.

In tabella 3.38 vengono riportate le temperature consigliabili per l'essiccamento, la preatomizzazione (carbonizzazione per il pretrattamento della matrice) e l'atomizzazione con i valori del flusso di argon in ml min^{-1} che si mantengono all'interno del tubo di grafite al momento dell'atomizzazione. Nelle fasi di essiccamento e pre-atomizzazione il flusso di argon resta a 300 ml min^{-1} .

Queste condizioni sono quelle consigliabili per ottenere la migliori sensibilità nell'analisi di questi metalli alle concentrazioni indicate in questo paragrafo.

Tab. 3.38. Condizioni analitiche per l'analisi dei metalli pesanti in assorbimento atomico con fornello di grafite.

Elemento	Essiccamento temp. °C	Pre-atomizzazione temp. °C	Atomizzazione e flusso di argon temp. °C	ml min^{-1}
Alluminio	110	1500	2600	0
Rame	110	900	2250	0
Zinco	110	400	2200	300
Nichel	110	1200	2700	0
Cromo	110	1200	2300	0
Ferro	110	1200	2700	50
Manganese	110	1000	2100	300

Riferimenti bibliografici

- Henriksen, A. & K. Balmer. 1977. Sampling, preservation and storage of water samples for analysis of metals. *Vatten* 1: 33-38.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., Washington.
- Perkin Elmer. 1980. *Analytical Methods for furnace atomic absorption spectrophotometry*. Norwalk, Connecticut. USA.
- Perkin Elmer. 1982. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy (supplement to 1976 edition)*. Norwalk, Connecticut, U.S.A.

4. CONTROLLI DI QUALITÀ

Nell'ultimo decennio è aumentata l'attenzione per tutte le procedure atte a migliorare e quantificare il livello qualitativo delle analisi chimiche nel campo dei controlli di produzione (farmaceutica ed alimentare) ed in campo ambientale. Limitando il discorso a questo ultimo settore, di nostra competenza, sono stati numerosi i fattori che hanno determinato l'accresciuto interesse. Lo sviluppo di una strumentazione sempre più sofisticata, che permette di ottenere una elevata quantità di dati, necessariamente ha posto l'accento sulla qualità degli stessi. Inoltre reti di monitoraggio a livello nazionale o internazionale, che coinvolgono più laboratori, pongono il problema della confrontabilità dei risultati. Infine il controllo ambientale, in ottemperanza a leggi sia nazionali che dell'Unione Europea, rende indispensabile il raggiungimento di *standard* qualitativi comuni tra i laboratori coinvolti.

È ovvio che l'aspetto analitico costituisce solo una fase del processo di misura. Le procedure di campionamento incidono generalmente in maniera sensibile sulla significatività del risultato finale, ovvero sulla sua rappresentatività e sul suo valore descrittivo del sistema in esame. Gli errori più comuni riguardano la non rappresentatività del campionamento e la possibilità di inquinamenti. Sulla qualità del dato finale incidono inoltre le metodiche di conservazione e di trattamento dei campioni (omogeneizzazione, dissoluzione, filtrazione), la struttura del laboratorio, il personale addetto alle analisi e numerose altre variabili. Questi aspetti sono dettagliatamente esaminati da Vijverberg & Cofino (1987), Garfield (1991), Griepink (1992), A.P.H.A. (1992), Kramer (1994), Benoliel (1994) e Quevauviller & Maier (1994).

In accordo con gli scopi generali di questo lavoro, finalizzato prevalentemente a documentare l'attività analitica del laboratorio del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia, il presente capitolo si propone di illustrare i controlli di qualità attuati in questo laboratorio e, nei limiti del possibile, delinearne l'evoluzione nel tempo. Non rientra pertanto nei nostri scopi una trattazione generale delle procedure di controllo sulla qualità analitica, per le quali si rimanda a Garfield (1991), Quevauviller & Maier (1994) e Calaresu (1994). Tuttavia si ritiene che la maggior parte delle procedure adottate possano essere di interesse e di utilizzo più generale, con particolare riferimento ai laboratori che si occupano dell'analisi di acque interne e di deposizioni atmosferiche.

4.1. DEFINIZIONI

Il recente sviluppo delle pratiche di controllo di qualità ha determinato la produzione di una notevole mole di bibliografia, nella quale spesso alcuni termini vengono utilizzati con accezioni diverse. Diventa quindi importante precisare il significato che si dà ai diversi termini. Le definizioni utilizzate in questo testo sono quelle proposte dalla International Standard Organization (1982, 1986), che servono da riferimento anche per la Unione Europea (Griepink 1992).

- Qualità (*quality*): è la totalità delle caratteristiche di un prodotto, processo o servizio che ne determinano la possibilità di soddisfare necessità stabilite o implicite.
- Controllo di qualità (*quality control*): tecniche ed attività operative usate per soddisfare i requisiti di qualità. I controlli di qualità vengono generalmente distinti in interni ed esterni al laboratorio.
- Valutazione della qualità (*quality assessment*): procedure per determinare la qualità delle misure del laboratorio sulla base dei controlli di qualità interni ed esterni.
- Garanzia di qualità (*quality assurance*): insieme delle azioni sistematiche necessarie a fornire una adeguata sicurezza affinché il prodotto, il processo od il servizio soddisfino determinate esigenze di qualità.
- Precisione (*precision*): misura dell'accordo fra i risultati di *test* mutualmente indipendenti ottenuti in condizioni prestabilite. La precisione dipende solo dalla distribuzione degli errori casuali e non è in relazione al valore vero, al valore convenzionalmente assunto come vero o al valore atteso. La precisione ha due componenti: la ripetibilità e la riproducibilità.
- Ripetibilità (*repeatability*): bontà dell'accordo fra i risultati di *test* mutualmente indipendenti ottenuti applicando uno stesso metodo su un identico materiale di prova, nello stesso laboratorio, usando la medesima strumentazione entro brevi intervalli di tempo da parte di operatori diversi.
- Riproducibilità (*reproducibility*): bontà dell'accordo fra i risultati di un *test* ottenuti con lo stesso metodo, sull'identico materiale di prova, in laboratori diversi, usando differente strumentazione.
- Esattezza (*trueness*): bontà dell'accordo fra i risultati di un *test* e valore vero. Tale valore è effettivamente noto solo in casi particolari, quindi talvolta si fa riferimento ad un valore convenzionalmente assunto come vero (ad esempio: misura della concentrazione su un campione reale effettuata con un metodo di provata affidabilità, oppure alla concentrazione nominale per un campione artificiale).
- Accuratezza (*accuracy*): affidabilità del risultato inteso tanto in termini di precisione che di esattezza; essa rappresenta la bontà del risultato rispetto al valore vero o ritenuto tale.

4.2. CONTROLLI DI QUALITÀ INTERNI AL LABORATORIO

Le analisi chimiche delle acque hanno costituito un'attività di grande interesse sin dai primi anni di attività dell'Istituto. Il lavoro di Baldi (1949d) che esamina cri-

ticamente oltre un decennio di studi limnologici e, più specificatamente, idrochimici sul Lago d'Orta, era senza dubbio all'avanguardia per quanto riguarda gli aspetti analitici, sia in campo nazionale che internazionale. Inoltre lo studio di questo lago, che per le sue dimensioni subisce variazioni idrochimiche mensili ed annuali di modesta entità, doveva necessariamente porre il problema della precisione e della accuratezza delle determinazioni chimiche al fine di mantenere nel tempo la confrontabilità dei dati analitici.

È sulla base di queste esigenze di qualità che sin dai primi anni di attività dell'Istituto, l'attività analitica ha dovuto essere organizzata, sia negli aspetti relativi alle strutture di laboratorio che alle pratiche analitiche. Per quanto riguarda gli sviluppi delle strutture dei laboratori e della strumentazione si fa riferimento al capitolo 2, dove questi argomenti vengono discussi unitamente alle variazioni intervenute nelle metodologie analitiche.

4.2.1. CALIBRAZIONI

La calibrazione strumentale per una determinazione analitica costituisce una delle fasi più importanti del processo di misura. Una errata calibrazione comporta infatti un errore sistematico che interessa tutte le determinazioni eseguite successivamente. Si deve pertanto porre la massima attenzione alle indicazioni fornite dalla casa costruttrice per il corretto uso della strumentazione; questa inoltre deve essere sempre mantenuta in perfetta efficienza e a tal fine sono opportune revisioni periodiche della strumentazione da parte di personale della ditta fornitrice, con frequenza annuale o biennale, da eseguirsi anche in assenza di guasti evidenti.

Un secondo aspetto fondamentale nella esecuzione delle calibrazioni è costituito dalla scelta e dalla preparazione degli *standard* da utilizzare nel *range* di lavoro. Essi devono essere preparati con prodotti chimici di grado analitico e comunque di purezza adeguata alle determinazioni che si intendono eseguire. Nel caso di soluzioni acquose si deve considerare con attenzione anche la qualità dell'acqua deionizzata utilizzata. In generale è sconsigliabile conservare per più serie di analisi gli stessi *standard*; in questo caso è comunque indispensabile verificare per quanto tempo essi possono essere ritenuti stabili, tenendo conto di fenomeni quali l'adsorbimento dei soluti sulle pareti dei contenitori e di reazioni che alterino le concentrazioni. L'uso di stabilizzanti deve essere considerato con cautela ed eseguito solo dopo aver acquisito documentazione al riguardo e dopo avere effettuato delle prove specifiche.

Altre cause di alterazione degli *standard* riguardano le manipolazioni cui sono sottoposti durante l'utilizzo, quali i ripetuti prelievi con pipette e la loro esposizione all'aria.

È impossibile fornire indicazioni generali riguardanti conservazione e durata degli *standard*; sarà l'operatore o il responsabile del laboratorio che dovrà valutarle caso per caso. Esistono tuttavia alcune pratiche che permettono di evidenziare l'alterarsi delle soluzioni *standard*: in particolare è molto utile l'uso di carte di controllo, costituite da campioni naturali o da soluzioni artificiali, di provata stabilità per alcuni mesi, che vengano regolarmente misurati ad ogni nuova serie di analisi. Una sistematica deviazione dai valori medi della concentrazione misurata nella carta di controllo può indicare il progressivo deterioramento delle soluzioni *standard* usate per

la taratura. Gli aspetti relativi all'uso delle carte di controllo saranno ripresi nel paragrafo 4.2.3.

È importante che in un laboratorio esista una pianificazione per l'effettuazione delle calibrazioni, che preveda frequenze diverse in relazione alla tipologia delle analisi. Nel laboratorio di chimica dell'Istituto le frequenze di calibrazione utilizzate dal 1984 sono state annuali per tutte le metodologie in assorbimento molecolare (fosforo reattivo e totale, azoto totale, ammonio, nitriti e silicati) e per la verifica della costante di cella dei conduttimetri, mentre per tutte le altre determinazioni in assorbimento atomico, cromatografia ionica e *flow injection analysis* le calibrazioni sono giornaliere, alternate alle determinazioni sui campioni.

Gli aspetti specifici riguardanti la calibrazione degli elettrodi per la misura del pH, della conducibilità e dell'alcalinità sono riportati rispettivamente nei paragrafi 3.3., 3.4. e 3.5. I dettagli riguardanti le modalità di calibrazione per le analisi spettrofotometriche (assorbimento molecolare ed atomico), in cromatografia ionica e flusso continuo sono descritti rispettivamente nei paragrafi 3.6., 3.7., 3.8. e 3.9.; dettagli sull'intervallo di concentrazioni normalmente misurate presso l'Istituto sono riportate nelle metodiche relative a ciascuna determinazione.

Un importante aspetto riguardante le calibrazioni è la scelta del tipo di regressione da utilizzare. Spesso si tende a volere linearizzare anche andamenti che in realtà non lo sono, al fine di semplificare la calibrazione; questo approccio poteva essere giustificato in passato quando era complicato eseguire manualmente delle regressioni non lineari. Attualmente con l'ampia diffusione del *personal computer* e di sofisticati *software* per la gestione della strumentazione analitica, risulta molto più semplice l'utilizzo di regressioni quadratiche o di altro tipo.

La qualità di una regressione lineare viene spesso valutata con il coefficiente di correlazione lineare il cui valore è uguale all'unità ($r = 1,00000$) nel caso di perfetta correlazione ma che generalmente viene accettato con valori maggiori di 0,999. Tuttavia è ormai opinione di numerosi autori (Dorschel *et al.* 1989; Analytical Methods Committee 1994; Green 1996) che il solo valore di coefficiente di correlazione lineare non sia sufficiente per questa valutazione, pertanto nella pratica comune si tende all'utilizzo di altri parametri per la valutazione della linearità, quali il calcolo dei residui sui punti della calibrazione e del fattore di risposta (RF). Per un'approfondita trattazione di questi aspetti si rimanda ai sopracitati autori, mentre per quanto riguarda le metodiche analitiche trattate in questo volume si è scelto l'utilizzo del fattore di risposta (RF) per evidenziare la qualità delle regressioni.

$$RF = \frac{\text{segnale strumentale}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

La costanza dei valori di RF indica una perfetta correlazione lineare, mentre significative variazioni attorno al valore medio, indicano una bassa correlazione lineare tra standard e segnale (Fig. 4.1.); tali condizioni possono essere indice di errori casuali nella preparazione delle soluzioni calibranti. Nel caso di regolari tendenze alla diminuzione o all'aumento dei valori di RF, può essere necessario utilizzare regressioni quadratiche.

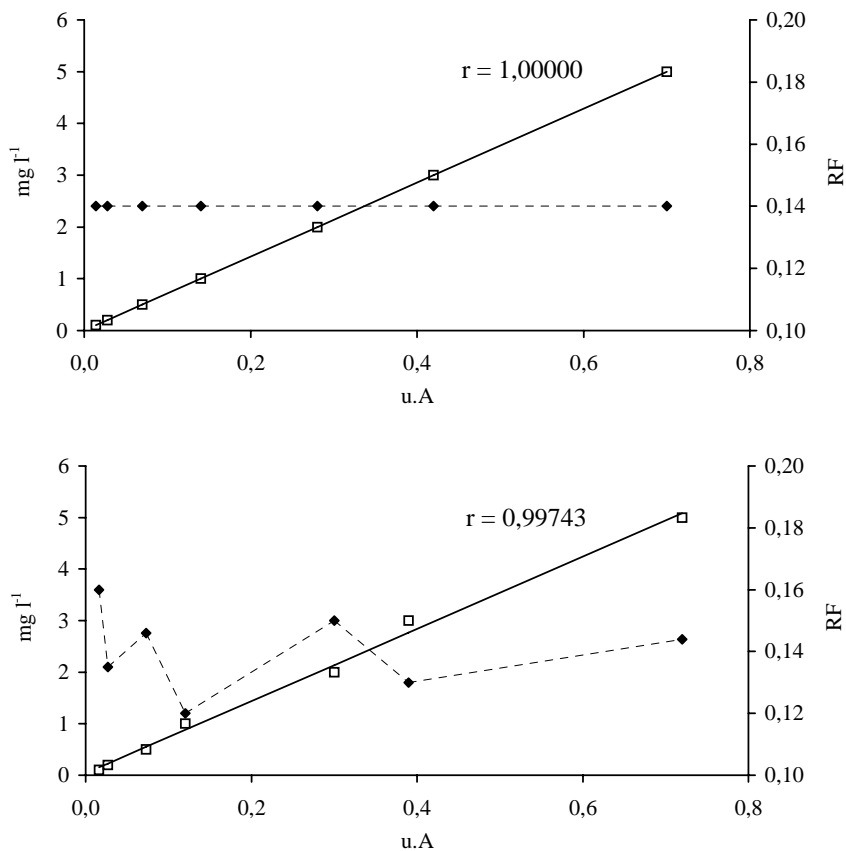


Fig. 4.1. Esempi di perfetta correlazione lineare (□) con andamento costante dei valori di RF (◆) e di scarsa correlazione lineare con evidenti oscillazioni dei valori di RF.

4.2.2. CONTROLLO DEI BIANCHI E LIMITI DI DETEZIONE E DI QUANTIFICAZIONE

In una determinazione analitica con il termine "bianco" si intende un campione di acqua ultrapura nel quale sia completamente assente la variabile in esame, che segue tutta la procedura di analisi (filtrazioni, estrazioni, aggiunta di reattivi, ecc.) contemporaneamente ai campioni. Il segnale del bianco costituisce quindi la somma degli inquinamenti e dei disturbi introdotti con i reagenti e le manipolazioni eseguite; questo segnale viene in genere sottratto da quello della misura sul campione incognito.

Un controllo sistematico dei bianchi può indicare, ad esempio con un brusco innalzarsi dei valori, la presenza di inconvenienti riguardanti l'acqua deionizzata, i reagenti utilizzati per l'analisi o le procedure di lavaggio della vetreria; in questi casi è essenziale intervenire al più presto individuando le origini dell'inquinamento.

Per la valutazione dei valori dei bianchi è utile una presentazione grafica, facendo uso di un foglio elettronico. Ai valori dei bianchi determinati nelle diverse occasioni deve essere ovviamente associata la data dell'analisi e, qualora siano presenti più operatori, il nome di chi ha eseguito la serie di analisi. Un esempio di registrazione dei valori dei bianchi è riportata in figura 4.2.

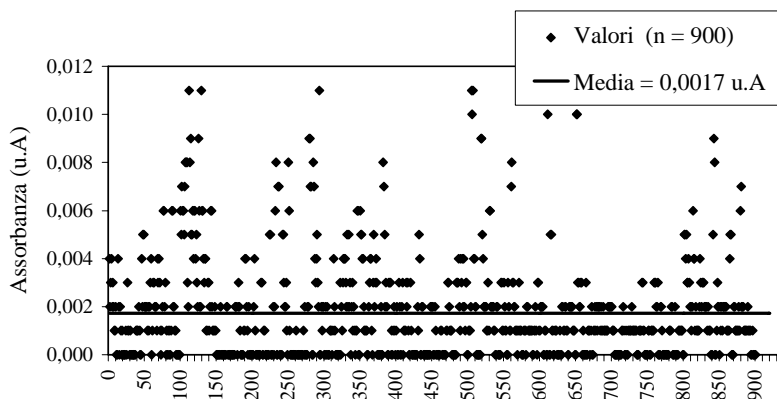


Fig. 4.2. Esempio di registrazione dei valori di bianco nel periodo marzo 1988 - luglio 1995, per le determinazioni spettrofotometriche di fosforo reattivo con cuvetta a passo ottico da 4 cm; il valore sull'asse delle ascisse indica il numero progressivo delle determinazioni.

Un dettagliato studio dei bianchi è inoltre indispensabile per la valutazione dei limiti inferiori di detezione e di quantificazione (rispettivamente LOD e LOQ, *limit of detection* e *limit of quantification*).

Il limite di detezione (LOD) è la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata in maniera affidabile dal sistema analitico in appropriate condizioni. Esso è definito come:

$$\text{LOD} = S_c - S_b \geq K_d \times \text{D.S.}$$

dove S_c e S_b sono rispettivamente i segnali misurati per il campione e il bianco, D.S. è la deviazione *standard* ottenuta sul bianco e K_d è un coefficiente di proporzionalità che può variare da autore ad autore, ma che organizzazioni internazionali raccomandano non inferiore a 3 (AAVV 1980; Analytical Methods Committee 1987).

Il limite di quantificazione (LOQ) è la più bassa concentrazione di analita che può essere quantificata in maniera affidabile dal sistema analitico in appropriate condizioni. Definito come:

$$\text{LOQ} = S_c - S_b \geq K_q \times \text{D.S.}$$

dove il coefficiente di proporzionalità (K_q) non deve essere inferiore a 10 (AAVV 1980; Analytical Methods Committee 1987). I valori di K_d e K_q assunti nel laboratorio di chimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia sono rispettivamente 3 e 10.

La determinazione dei limiti di detezione e quantificazione, unitamente a quelli di ripetibilità (vedi paragrafo 4.2.4.), sono indispensabili per una corretta valuta-

zione delle possibilità analitiche di una metodica. I valori ottenuti sperimentalmente sono riportati nella descrizione di ciascuna metodologia analitica (capitolo 3) e riassunti nella tabella 4.1.

Tab. 4.1. Sintesi dei metodi analitici utilizzati con il range di misura, LOD, LOQ e la ripetibilità. (AM, Assorbimento Molecolare; IC, Cromatografia Ionica; FIA, Analisi in flusso continuo).

Variabile	Cuvetta (cm) ed unità di misura e/o loop (µl)		Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità	
						Concentrazione	CV. %
Ossigeno Win.	mg l ⁻¹		0,50 - 15,00		0,50	9,3	1,8
Conducibilità elettrica	µS cm ⁻¹		0,50 - 1500			14,3	1,4
Alcalinità Gran	meq l ⁻¹		0,000 - 5,00			186,1	0,6
						0,037	5,6
						0,539	0,7
						1,924	1,4
Alcalinità a pH4,5 - 4,2			0,150 - 5,00			0,171	2,1
						0,525	0,3
						0,746	1,2
						1,894	1,6
						2,750	0,6
Nitrati AM	mg N l ⁻¹	2 cm	0,050 - 2,000	0,030	0,090	0,200	3,2
						0,984	1,2
		1 cm	1,00 - 5,00		0,90	1,464	0,9
						2,84	2,4
						3,01	2,0
Nitrati IC	mg N l ⁻¹	50 µl	0,100 - 5,00		0,02	0,20	3,2
						0,48	2,8
						0,93	2,0
						3,76	1,4
Nitriti AM	µg N l ⁻¹	4 cm	1 - 100	1	3		
Ammonio AM	µg N l ⁻¹	4 cm	5 - 200	5	20	46	8,2
						177	2,1
		1 cm	100 - 1500		100	320	3,4
						475	2,0
						940	2,4
						1055	1,5
Ammonio FIA	mg N l ⁻¹	1 cm, 100 µl	0,10 - 2,00	0,05	0,10	0,350	4,9
			1,00 - 4,00		1,00		
Ammonio IC	mg N l ⁻¹	100 µl	0,05 - 3,0		0,02	0,19	3,1
						0,36	3,8
						0,51	3,1
						0,93	2,2
Fosforo reattivo AM	µg P l ⁻¹	10 cm	4 - 30	3	7	5	38
						12	8,3
						20	7,8
						30	3,9
		4 cm	8 - 400	5	10	8	12,4
						37	4,9
						165	0,8
						236	1,0
						355	1,1
Fosforo totale AM	µg P l ⁻¹	10 cm	4 - 60	4	9	7	17,5
						15	9,5
						22	6,5
						40	4,0

(continua)

Tab. 4.1. continuazione

Variabile	Cuvetta (cm) ed unità di misura e/o loop (µl)	Range di misura	LOD	LOQ	Ripetibilità							
					Concentrazione	CV. %						
Fosforo totale AM	µg P l ⁻¹ 10 cm	4 - 60	4	9	7	17,5						
					15	9,5						
					22	6,5						
					40	4,0						
					14	11,5						
	4 cm	8 - 400	6	14	18	5,6						
					32	3,4						
					137	3,9						
					246	2,3						
					303	3,6						
Azoto totale AM	mg N l ⁻¹ 2 cm	0,30 - 2,00	0,13	0,20	0,92	3,1						
					1,47	2,9						
	1 cm	0,40 - 6,00	0,20	0,30	0,54	5,6						
					0,84	3,6						
					1,21	3,3						
					4,85	0,8						
					Azoto totale	mg N l ⁻¹	1 cm, 100 µl	0,40 - 4,00	0,20	0,30		
					FIA			1,00 - 10,00		0,80		
	Silicati AM	mg Si l ⁻¹ 2 cm	0,05 - 1,00	0,02	0,05	0,42	7,1					
						1,69	3,0					
0,5 cm		0,60 - 5,00			2,61	1,1						
					4,21	1,0						
Silicati FIA	mg Si l ⁻¹ 1 cm, 200 µl	0,05 - 2,00 0,50 - 5,00	0,02	0,05 0,40	1,39	1,8						
					1,33	3,8						
					3,88	1,7						
					4,07	3,2						
Cloruri IC	mg l ⁻¹ 50 µl	0,10 - 10,0		1,50 0,02	0,20	8,1						
					0,48	2,8						
					0,96	3,1						
					2,93	2,7						
Solfati IC	mg l ⁻¹ 50 µl	0,50 - 50,0		0,05	1,03	3,0						
					2,29	3,4						
					4,66	1,7						
					9,99	0,6						
					24,8	1,2						
					31,9	1,4						
					0,19	12,6						
Sodio IC	mg l ⁻¹ 100 µl	0,05 - 10,0		0,01	0,29	3,2						
					1,04	2,9						
					3,98	2,5						
					5,00	1,5						
					0,12	11,7						
Potassio IC	mg l ⁻¹ 100 µl	0,05 - 10,0		0,01	0,28	4,2						
					0,53	5,7						
					1,01	4,4						
					2,95	2,0						
					0,29	2,9						
Magnesio IC	mg l ⁻¹ 100 µl	0,05 - 10,0		0,01	1,68	2,0						
					3,15	1,3						
					0,54	5,6						
Calcio IC	mg l ⁻¹ 100 µl	0,25 - 50,0		0,03	1,42	2,3						
					2,60	3,9						
					12,8	1,9						
					19,9	2,3						

La figura 4.2. riporta come esempio l'andamento dei valori di bianco nella determinazione del fosforo reattivo con la cuvetta con passo ottico da 4 cm; dall'elaborazione statistica di questi dati risulta che l'assorbanza media è di 0,0017 u.A con deviazione *standard* di 0,0021 u.A. Il calcolo di LOD e LOQ ponendo le costanti K_d e K_q rispettivamente uguali a 3 e 10 sarà quindi il seguente:

$$\text{LOD} = \text{media} + 3 \times \text{D.S.} = 0,0017 + 3 \times 0,0021 = 0,008 \text{ u.A}$$

$$\text{LOQ} = \text{media} + 10 \times \text{D.S.} = 0,0017 + 10 \times 0,0021 = 0,0227 \text{ u.A}$$

Per trasformare i valori di LOD ed LOQ dal valore del segnale (u.A) al valore in concentrazione ($\mu\text{g l}^{-1}$) bisogna considerare la retta di calibrazione utilizzata per le letture con la cuvetta da 4 cm;

$$\mu\text{g P l}^{-1} = \text{u.A} \times 352 + 2,2$$

dove sostituendo u.A con i valori in assorbanza di LOD e LOQ si ottengono i valori di 5 e 10 $\mu\text{g P l}^{-1}$ rispettivamente come limite di detezione e quantificazione per questo metodo.

$$\text{LOD} = 0,008 \times 352 + 2,2 = 5 \mu\text{g P l}^{-1}$$

$$\text{LOQ} = 0,0227 \times 352 + 2,2 = 10 \mu\text{g P l}^{-1}$$

4.2.3. CARTE DI CONTROLLO

Si definisce carta di controllo un campione stabile nel tempo, analizzato per un lungo periodo (da due a sei mesi), dal quale si ottengono elaborazioni grafiche dei dati analitici, finalizzate a verificare la ripetibilità delle repliche giornaliere e la ripetibilità delle misure nel tempo, rispetto al valore medio della concentrazione (Garfield 1991; A.P.H.A. 1992).

Per ciascun analita devono essere utilizzate carte di controllo per diversi livelli di concentrazioni (almeno due) scelti all'interno del campo di valori più frequentemente misurati. Queste vengono preparate dalle analisi di soluzioni naturali o artificiali stabili per un periodo di tempo dell'ordine di alcuni mesi. La carta di controllo non deve essere confusa con le soluzioni certificate, il cui utilizzo è generalmente limitato per motivi di carattere economico e per la loro limitata disponibilità, nella fase della messa a punto di metodiche o in particolari momenti di verifica della qualità analitica. L'uso della carta di controllo rientra invece nella *routine* analitica e deve essere associata a ciascuna serie di analisi, unitamente alla determinazione dei bianchi e dei campioni incogniti. Il suo utilizzo permette la verifica della corretta impostazione delle condizioni di analisi e la congruità dei valori ottenuti da diversi operatori nel tempo e fra una calibrazione e l'altra.

La carta di controllo può essere costituita da un campione sintetico, preparato all'interno del laboratorio o acquistato, oppure può essere preparata utilizzando acque naturali, trattate opportunamente (filtrazione, aggiunta di stabilizzanti, o correzione della concentrazione con l'aggiunta di soluzioni *standard*).

Nel laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia sono attualmente utilizzate carte di controllo a diverse concentrazioni per le seguenti determinazioni: conducibilità, alcalinità, fosforo reattivo e totale, azoto totale, azoto ammoniacale, silice reattiva, cloruri, solfati, nitrati, calcio, magnesio, sodio e potassio.

La preparazione di queste soluzioni viene eseguita a partire da 3-5 litri di un campione di acqua naturale filtrata su filtro da $1\ \mu\text{m}$ e fissata con cloroformio a concentrazione finale dello 0,2%; nel caso dell'azoto ammoniacale è preferibile acidificare il campione a circa pH 3,5-4 al posto dell'aggiunta di cloroformio. A questi campioni, conservati in bottiglia di polietilene da 3-5 litri, viene aggiunta un'aliquota di soluzione *standard* al fine di portare la concentrazione finale al valore desiderato. I campioni dopo omogeneizzazione vengono lasciati stabilizzare per una settimana prima essere introdotti nei cicli di analisi. La stabilità delle concentrazioni viene verificata nelle prime due settimane d'uso. I campioni così preparati sono utilizzabili per alcuni mesi. È comunque indispensabile manipolare con molta attenzione questi campioni e prelevare dal recipiente con la massima attenzione al fine di evitare inquinamenti che possono causare variazioni nella concentrazione; l'uso di questo campione va interrotto quando il volume si è ridotto ad un terzo del volume iniziale.

Dall'analisi dei risultati analitici ottenuti si possono realizzare due elaborazioni grafiche diverse per ciascuna carta di controllo; questi grafici sono finalizzati a verificare la deviazione *standard* sulle repliche giornaliere rispetto a quella attesa per il metodo (Fig. 4.3.) e la ripetibilità delle misure nel tempo rispetto alla concentrazione della carta di controllo (Fig. 4.4.).

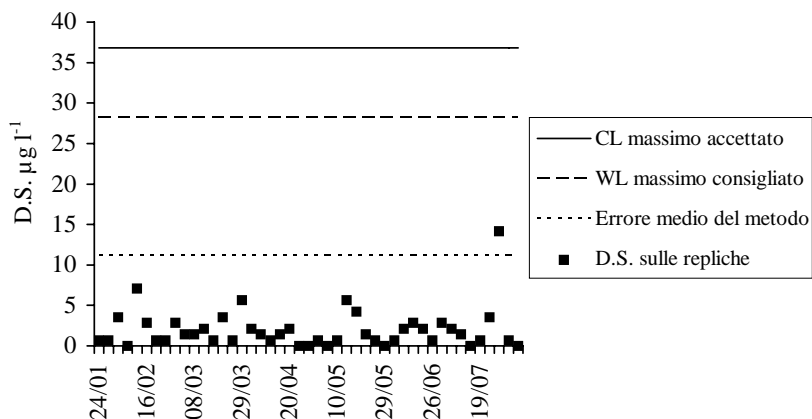


Fig. 4.3. Esempio di carta di controllo sulle repliche relativa all'analisi dell'ammonio.

L'analisi giornaliera della carta di controllo su misure duplicate (2 volte) permette di eseguire una prima elaborazione finalizzata a verificare il buon andamento delle repliche; questa elaborazione si basa sul confronto tra la deviazione *standard* delle repliche eseguite sul campione e la deviazione *standard* accettata per il metodo ($D.S._{\text{metodo}}$) alla concentrazione di misura, già verificata in passato e da mantenere nel tempo (A.P.H.A. 1992). L'errore medio (ErrMed) che ci si può attendere dalle repliche (due singole misure), viene così calcolato:

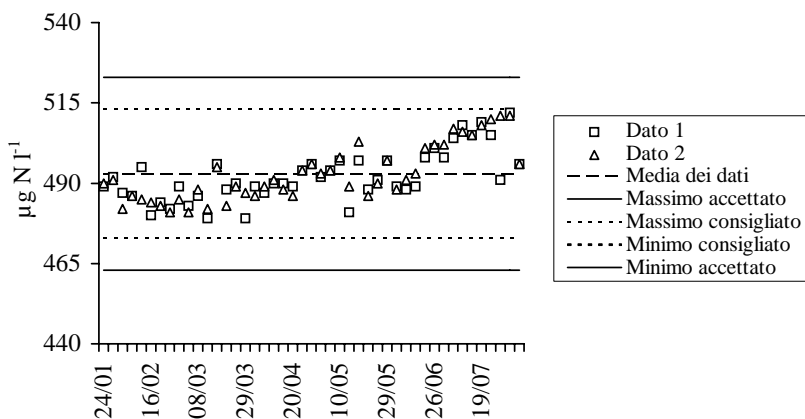


Fig. 4.4. Esempio di carta di controllo per l'analisi dell'ammonio ripetuta in giorni diversi.

$$\text{ErrMed} = 1,128 \times \text{D.S.}_{\text{metodo}}$$

Sulla base di questo errore medio valutato su due repliche, si calcolano il limite massimo di scarto accettabile (CL, *control limit*) e consigliabile (WL, *warning limit*):

$$\begin{aligned} \text{CL} &= 3,267 \times \text{ErrMed} \\ \text{WL} &= \text{ErrMed} + 2/3 \times (\text{CL} - \text{ErrMed}) \end{aligned}$$

La figura 4.3. riporta un esempio relativo alla carta di controllo sulle repliche giornaliere per l'analisi dell'ammonio. La concentrazione media è di $493 \mu\text{g N l}^{-1}$ dalla quale, sulla base dei dati di ripetibilità del metodo a quel valore di concentrazione, ottenuti da precedenti determinazioni, ci si attende una deviazione *standard* di $10 \mu\text{g N l}^{-1}$, corrispondente ad un coefficiente di variazione percentuale del 2,0%. In questo esempio si hanno i seguenti valori:

$$\begin{aligned} \text{ErrMed} &= 1,128 \times 10 = 11 \mu\text{g l}^{-1} \\ \text{CL} &= 3,267 \times 11 = 36 \mu\text{g l}^{-1} \\ \text{WL} &= 11 + 2/3 \times (36 - 11) = 28 \mu\text{g l}^{-1} \end{aligned}$$

Quando l'analisi in corso supera il valore massimo accettato (CL=36) bisogna individuare l'errore e ripetere tutte le determinazioni della giornata.

Il miglior utilizzo delle informazioni derivanti dall'analisi della carta di controllo è costituito dal confronto del valore ottenuto ogni giorno rispetto al valore medio del periodo analitico (Fig. 4.4.). Questa carta di controllo viene rappresentata con un grafico che riporta in ascissa le date di determinazione ed in ordinata i valori di concentrazione misurati sulla soluzione di riferimento. La valutazione di eventuali tendenze viene eseguita dividendo il grafico in più fasce, sulla base di una serie di 5-10 misure preliminari che forniscano una stima della media e della deviazione *standard*

(ripetibilità) delle concentrazioni misurate sulla carta di controllo, oppure creando le fasce entro le quali si vogliono mantenere le deviazioni *standard* già verificate in passato per quel metodo a quella concentrazione. È così possibile individuare tre campi (Fig. 4.4.): il primo compreso tra il valore medio ± 2 D.S., è quello di normalità nella misura; il secondo compreso tra ± 2 e ± 3 D.S., è quello di "allarme", indicativo di una precisione nella determinazione inferiore a quella usuale del laboratorio; il terzo, al di fuori del limite ± 3 D.S., segnala la necessità di intervenire in quanto le condizioni analitiche non sono più sotto controllo. Le variazioni nel tempo della carta di controllo consentono di evidenziare derive regolari dal valore medio, determinate da errori sistematici o dal progressivo inquinamento della soluzione, oppure da scarti improvvisi dovuti ad errori casuali. Dall'esempio di figura 4.4. riferita alla stessa carta di controllo per l'analisi dell'ammonio, si ottengono valori di D.S. $9 \mu\text{g l}^{-1}$ e C.V.% 1,8, perfettamente compresi nei valori attesi (D.S. $10 \mu\text{g l}^{-1}$ e C.V.% 2,0). Nello stesso esempio si può notare anche un'evidente tendenza all'aumento dei valori, giustificabile con un probabile inquinamento del campione avvenuto negli ultimi giorni di utilizzo, quando il volume di campione si era ormai ridotto a meno di un terzo del volume iniziale.

4.2.4. PRECISIONE ED ACCURATEZZA

Dalle definizioni fornite al paragrafo 4.1. si vede come la precisione di un metodo analitico sia legata alla sua ripetibilità e riproducibilità. La ripetibilità rappresenta la bontà dell'accordo fra i risultati di determinazioni indipendenti ottenuti applicando uno stesso metodo su un identico materiale di prova, nello stesso laboratorio, usando la medesima strumentazione entro brevi intervalli di tempo. La riproducibilità rispetto alla ripetibilità tiene conto della variabilità analitica tra diversi laboratori; la sua valutazione richiede quindi la collaborazione di diverse strutture come avviene ad esempio negli esercizi di intercalibrazione o di certificazione.

Da queste definizioni appare evidente come solo la ripetibilità sia determinabile all'interno di un singolo laboratorio. Questa valutazione è di estrema utilità, sia perché costituisce un passo per la preparazione di carte di controllo, sia per un confronto con i valori riportati dai principali testi analitici. Il valore di ripetibilità è dipendente anche dalla concentrazione dell'analita; per tale motivo è opportuno, per una stessa metodica di analisi, eseguire la valutazione a diverse concentrazioni (almeno 3-4), rappresentative del *range* di valori più comunemente analizzati.

Misure di ripetibilità sono sistematicamente eseguite dall'inizio degli anni settanta nel laboratorio chimico dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. Negli ultimi anni queste vengono continuamente verificate con l'uso sistematico delle carte di controllo. Informazioni dettagliate sulla ripetibilità dei metodi sono riportate nelle metodologie relative alle singole determinazioni (vedi capitolo 2) e riassunti in tabella 4.1.

L'accuratezza di un metodo esprime la sua affidabilità sia in termini di precisione che di esattezza; in altre parole, oltre a fornire le garanzie di una buona ripetibilità e riproducibilità, tiene conto della differenza fra il valore misurato e quello vero. Essa è valutabile solo con esercizi interlaboratorio o con l'uso di materiali certificati per i quali sia nota l'esatta concentrazione dei soluti in esame, quali ad esempio i materiali prodotti dal Bureau Communautaire de Reference dell'Unione Europea. Questi aspetti

verranno ripresi nei paragrafo 4.3.1. (intercalibrazioni) e nel paragrafo 4.3.2. (campioni certificati).

4.2.5. NUMERO DI CIFRE SIGNIFICATIVE

Il numero di cifre significative usato per esprimere i risultati costituisce un importante aspetto della procedura analitica. In generale si assume che tutte le cifre riportate siano pienamente significative dal punto di vista analitico, ad eccezione dell'ultima, che può avere un'incertezza dello stesso ordine della precisione del metodo (A.P.H.A. 1992). Quanto segue è la prassi adottata presso il laboratorio chimico dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, coincidente con le indicazioni fornite da A.P.H.A. (1992).

La valutazione della precisione costituisce la prima fase per l'individuazione del numero di cifre significative. Poiché il valore di precisione varia con la concentrazione, anche il numero di cifre significative potrà essere diverso a differenti livelli di concentrazione. Ad esempio, una serie di 25 determinazioni, eseguite in 5 giornate diverse con calibrazioni diverse su campioni stabilizzati ha fornito medie aritmetiche di 0,823743 e 2,458758 con deviazione *standard* di 0,015 e 0,32 mg l⁻¹. Assumendo per semplicità che la distribuzione dell'errore sia normale, assunzione tutt'altro che scontata (Reed *et al.* 1971; Prudnikov & Shapkina 1984), si ha che considerando una volta la deviazione *standard*, i due valori misurati hanno il 33% di probabilità di trovarsi tra 0,809 e 0,839 e tra 2,14 e 2,78 mg l⁻¹; naturalmente l'intervallo aumenta se si desiderano probabilità più elevate (66% per 2 D.S., 99% per 3 D.S.). Considerando una sola volta la deviazione *standard* (pari al 33% di probabilità), in accordo con A.P.H.A. (1992), nell'esempio riportato i risultati andrebbero espressi come 0,82 e 2,5 mg l⁻¹, intendendo con questo che le prime cifre (0,8 e 2) sono esattamente note, mentre le seconde hanno un'indeterminazione inferiore all'unità.

I valori di concentrazione derivanti dalle equazioni di calibrazione devono quindi essere arrotondati sulla base della precisione del metodo (deviazione *standard*), che deve pertanto essere periodicamente controllata. Questo dato è direttamente fornito dalle carte di controllo ottenute sugli *standard* interni. L'intervallo di indeterminazione, quando esplicitato, si riferisce ad una D.S.:

$$0,82 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1} \quad 2,5 \pm 0,3 \text{ mg l}^{-1}$$

Queste convenzioni impongono cura anche nell'uso dello zero successivo alla virgola; nel caso della determinazione sopra riportata, concentrazioni di 0,900 e 2,025 mg l⁻¹ vanno ovviamente riportate come 0,90 e 2,0 mg l⁻¹ intendendo che lo zero finale abbia un'indeterminazione associata di ± 1 D.S.

4.2.6. VARIAZIONI DI METODOLOGIE ANALITICHE

La variazione di un metodo di analisi costituisce un evento importante per un laboratorio; l'importanza è anche maggiore se le attività del laboratorio comprendono studi a lungo termine sull'evoluzione di ambienti naturali, come nel caso del laboratorio del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia. La variazione della metodologia

analitica richiede particolari precauzioni e l'adozione di controlli specifici al fine di assicurare la continuità e confrontabilità dei risultati.

Un aspetto importante è costituito dalla valutazione della necessità e dell'opportunità di cambiare la metodologia analitica. Queste decisioni sono in genere determinate dalla provata inaffidabilità della vecchia metodologia, o dallo sviluppo di tecniche strumentali nuove, come ad esempio è avvenuto per la cromatografia ionica che ha sostituito le determinazioni spettrofotometriche di alcuni anioni e cationi, e per l'analisi in flusso continuo nella determinazione della silice reattiva.

Dopo l'adozione della nuova metodica, si consiglia che per un periodo di tempo prolungato, le misure vengano eseguite in parallelo anche con la vecchia metodologia; il controllo deve riguardare tutte le tipologie di campioni esaminati comprendendo così l'intero campo di concentrazioni considerate. Prima di abbandonare la vecchia metodologia è indispensabile l'elaborazione dei risultati ottenuti con i due metodi, mediante metodologie statistiche che permettano di evidenziare la presenza di eventuali differenze sistematiche. Questo è tanto più vero quando gli analiti esaminati non sono specie chimiche ben definite, ma sono piuttosto delle variabili definite sulla base della metodica chimica utilizzata: è il caso del fosforo reattivo e totale, dei silicati reattivi al molibdato, dell'alcalinità. È quindi errato, da un punto di vista analitico, cercare di confrontare ad esempio concentrazioni di fosforo ottenute con il metodo spettrofotometrico al molibdato, con il quale si determina il cosiddetto "fosforo reattivo" che può essere la somma di varie forme di fosforo (alcune anche organiche), con quelle ottenute per cromatografia ionica dove si determina lo ione fosfato (PO_4^{3-}) come somma di tutte le forme inorganiche ($\text{PO}_4^{3-} + \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_3\text{PO}_4$), in quanto si confrontano le concentrazioni di diverse forme di soluti o insiemi di soluti.

Al di là di queste situazioni estreme, si deve considerare che la metodologia di analisi può apprezzare in maniera diversa la presenza di eventuali particelle in sospensione. Ad esempio sodio o potassio, presenti nel particolato inorganico inferiore a $0,45 \mu\text{m}$, possono essere diversamente misurati per spettroscopia di assorbimento atomico, che utilizza energiche condizioni analitiche (combustione in fiamma a circa $1200\div 1500^\circ\text{C}$), rispetto alla cromatografia ionica, che lavora in condizioni analitiche più delicate.

Questi problemi devono essere affrontati con un accurato esame delle reazioni chimiche e delle condizioni di reazione delle due metodologie, per assicurarsi che non vi siano delle differenze sistematiche da attendersi *a priori*. A questo esame deve comunque seguire la parte sperimentale di controllo.

Le variazioni intervenute nelle metodiche chimiche usate nel laboratorio del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia sono elencate nel capitolo 2. Di seguito viene riportato un esempio di elaborazione dei dati chimici relativi ai controlli fatti su calcio, magnesio, sodio e potassio, nitrati e silicati in occasione del passaggio dalle vecchie metodologie di analisi (assorbimento atomico e metodi spettrofotometrici) alle attuali (cromatografia ionica, FIA). Prima della sostituzione della vecchia metodica con la nuova si è verificata la confrontabilità dei dati con una serie di analisi eseguite con i due metodi, su tutto il campo di concentrazioni normalmente esaminato. Questo comporta che per un periodo di alcuni mesi fino ad un anno i campioni venivano analizzati con le due metodiche. I risultati sono sintetizzati in tabella 4.2.,

dove vengono riportati anche i valori delle differenze fra i risultati ottenuti per ciascun campione.

Tab. 4.2. Dati statistici relativi al confronto fra diverse metodiche analitiche: IC, cromatografia ionica; AS, assorbimento atomico; NH_4 col., colorimetrico al blu indofenolo; NO_3 col., colorimetrico al salicilato; Si col., colorimetrico al molibdato; Si FIA, colorimetrico al molibdato in flusso continuo.

Minimo, massimo, media, mediana e differenze minima, massima, media, mediana e deviazione *standard* (D.S.) sulla differenza media sono espresse in mg l^{-1} .

Significatività delle differenze fra i metodi:

n.s. non significativa; ◆◆◆ $p < 0,001$; ◆◆ $p < 0,01$; ◆ $p < 0,05$.

	Ca IC-AS	Mg IC-AS	Na IC-AS	K IC-AS	N- NH_4 col-IC	N- NO_3 col-IC	Si col-FIA
N° dati	409	409	409	409	244	519	138
Minimo	0,08	-0,10	0,02	0,01	0,010	0,03	0,03
Massimo	77,0	14,0	95	6,8	2,63	6,70	8,2
Media	9,9	1,8	4,1	1,0	0,57	0,92	3,1
Mediana	10,3	1,58	3,8	0,98	0,496	0,730	3,44
Diff. minima	-5,6	-1,3	-5,0	-1,1	-0,15	-0,49	-0,7
Diff. massima	4,0	0,8	1,3	0,3	0,16	0,29	1,02
Diff. media	-0,05	0,01	-0,12	-0,02	-0,007	-0,02	0,09
Diff. mediana	-0,05	<0,01	-0,08	-0,02	-0,003	0,001	0,02
D.S. Diff. media	0,77	0,14	0,39	0,10	0,036	0,09	0,26
% Diff. media / media	0,5	-	2,9	2,0	1,2	-	-
% Diff. mediana / mediana	0,5	-	2,1	2,0	0,6	-	-
N° dati uguali	54	79	33	25	10	19	7
N° Diff. positive	147	159	282	117	90	253	76
N° Diff. negative	208	171	94	267	144	247	55
Test del segno	◆◆◆	n.s.	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	n.s.	n.s.
Test Wilcoxon	◆◆	n.s.	◆◆◆	◆◆◆	◆◆	n.s.	◆◆

Il numero di prove eseguite varia da 140 a 500; la significatività delle differenze è stata provata con il test del segno ed il test di Wilcoxon. Nel caso del magnesio, dei nitrati e dei silicati (Tab. 4.2.) le differenze non sono significative, mentre la differenza più elevata è presentata dal sodio e dal potassio, per i quali i dati ottenuti in cromatografia ionica sono circa il 3% inferiori a quelli ottenuti in assorbimento atomico. Questa sistematicità potrebbe essere determinata dalla presenza di particolato inorganico nel campione, che viene decomposto e parzialmente determinato nella combustione ad alta temperatura in fiamma aria-acetilene, mentre non è assolutamente rivelato in cromatografia ionica, non essendo questi composti presenti in forma ionica. Meno semplice è spiegare la differenza sistematica nel caso dell'ammonio; è possibile che al momento dell'aggiunta dei reattivi per la determinazione colorimetrica si abbia una parziale demolizione di composti organici contenenti azoto ridotto, con produzione di ammonio o di specie chimiche che reagiscono come l'ammonio; tali differenze restano comunque ben comprese nell'ambito dell'indeterminazione del metodo ed una rappresentazione grafica rispetto alla retta con pendenza unitaria mostra il buon accordo tra le determinazioni in due diversi *range* analitici (Fig. 4.5.).

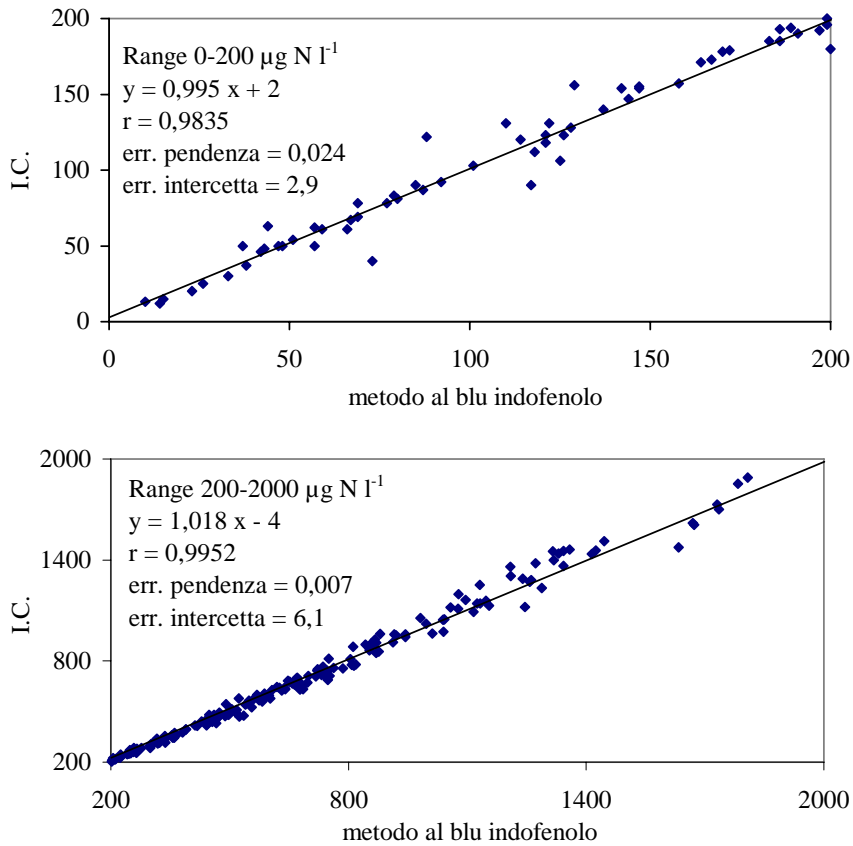


Fig. 4.5. Confronto fra la determinazione dell'ammonio con il metodo colorimetrico al blu indofenolo ed il metodo in cromatografia ionica.

Un ulteriore esempio di rappresentazione grafica delle differenze fra i due metodi è presentato per il caso del sodio, nel quale lo scostamento dei risultati è più rilevante (Fig. 4.6.). Si sono dapprima messi in grafico i valori ottenuti con le due metodiche nel *range* di concentrazioni 0-10 mg l^{-1} e si è calcolata la retta di regressione. Per rendere più accurato il confronto, oltre all'intero intervallo di risultati sono stati considerati due diversi *range* di misura (Fig. 4.6.). La retta di regressione, nel caso di perfetta coincidenza delle concentrazioni ottenute con i due metodi, dovrebbe coincidere con la retta di pendenza unitaria passante per l'origine. I valori della pendenza e dell'intercetta ottenuti per l'intero *range* di misura e per i due campi più ristretti non sono statisticamente diversi da uno e zero, rispettivamente.

Un approccio più accurato può essere eseguito confrontando la differenza fra le due concentrazioni ottenute dai due metodi di analisi per ciascun campione. Le differenze, espresse come valore assoluto e come percentuale, sono messe in grafico contro il valore assoluto di concentrazione, per verificare se esista una relazione fra

le due variabili (Fig. 4.7. e 4.8.). Questo approccio permette di evidenziare meglio i valori che maggiormente si scostano da zero, ovvero dall'uguaglianza dei risultati ottenuti con i due metodi. Si deve tuttavia sottolineare che parte della dispersione dei risultati è determinata da errori casuali, che probabilmente sono quelli che determinano gli scostamenti più ampi. Per quanto riguarda la maggior parte dei risultati, le differenze sono inferiori a $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ per concentrazioni inferiori a 1 mg l^{-1} aumentando sino a risultare comprese nell'intervallo $\pm 0,2-0,4 \text{ mg l}^{-1}$ per campioni con concentrazioni superiori a 3 mg l^{-1} (Fig. 4.7.). Gli stessi valori espressi in percentuale sul valore di concentrazione (Fig. 4.8.) evidenziano naturalmente le dispersioni più accentuate, sino a $\pm 60\%$ per le concentrazioni più basse, inferiori a $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, per stabilizzarsi nell'intervallo $\pm 8\%$ per le concentrazioni superiori.

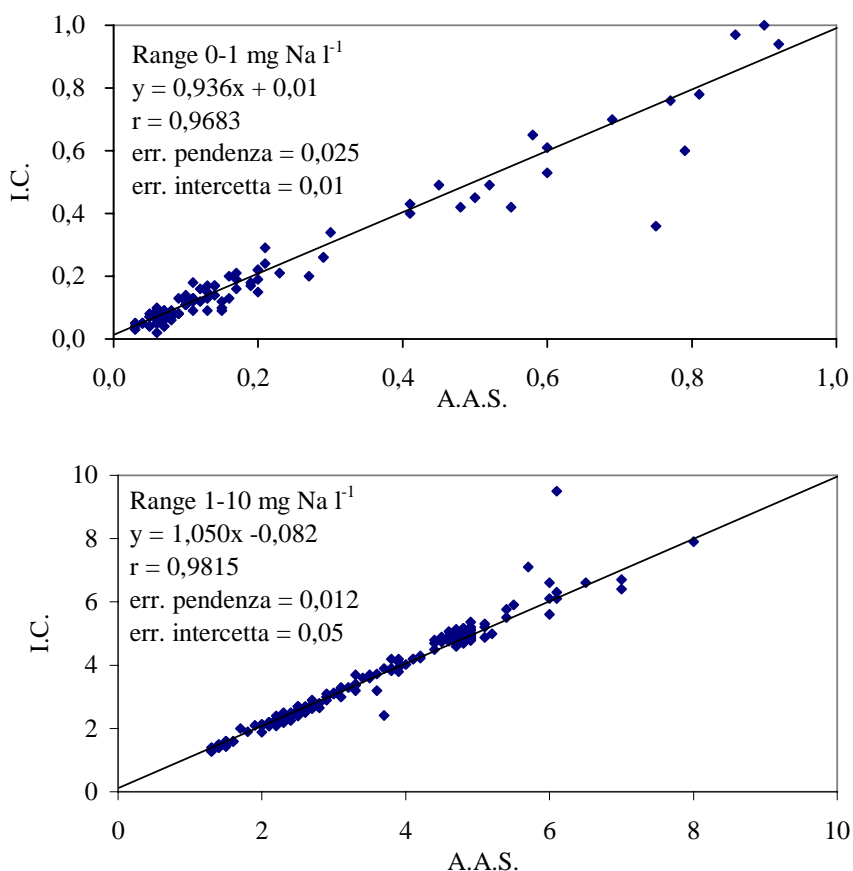


Fig. 4.6. Confronto fra la determinazione del sodio con il metodo in assorbimento atomico ed il metodo in cromatografia ionica.

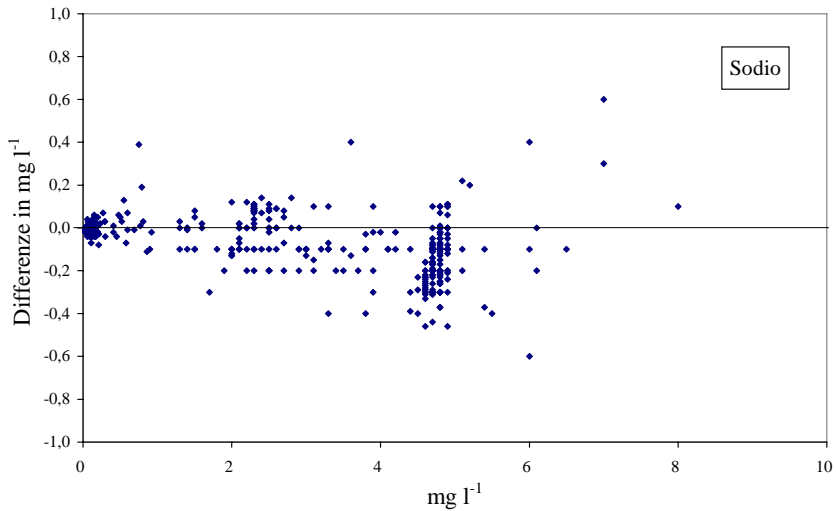


Fig. 4.7. Differenze assolute fra la determinazione del sodio in assorbimento atomico ed in cromatografia ionica, in funzione della concentrazione.

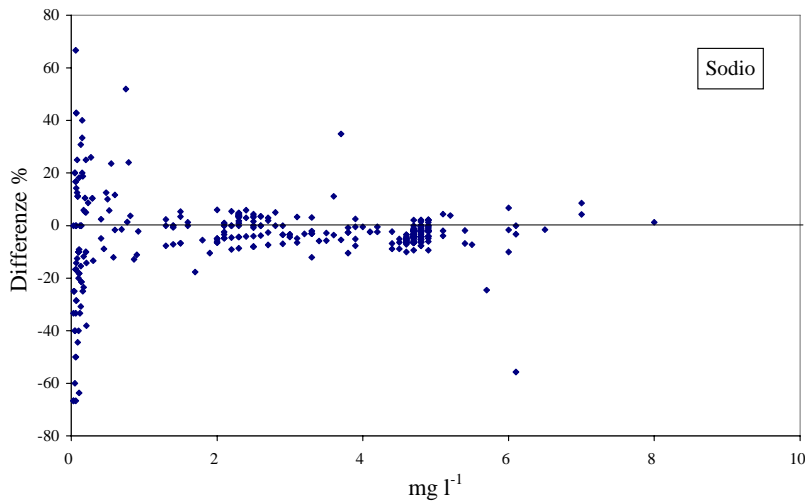


Fig. 4.8. Differenze percentuali fra la determinazione del sodio in assorbimento atomico ed in cromatografia ionica, in funzione della concentrazione.

Un modo diverso di valutare graficamente le differenze percentuali fra i risultati derivanti dalle metodologie è l'utilizzo delle curve di frequenza cumulata. La tabella 4.3. riporta un esempio di tale rappresentazione per il confronto dei risultati di due metodi utilizzando dati simulati. Ordinando i valori delle differenze percentuali

($\Delta\%$) si è calcolato, per ciascuno di essi, la frequenza cumulata dividendo il suo numero d'ordine per il numero totale di coppie di misure. Infine si sono messi in grafico (Fig. 4.9.) i valori delle differenze percentuali (asse x) contro quelli delle frequenze cumulate (asse y).

Tab. 4.3. Esempio di calcolo dei valori di differenza percentuale fra i dati simulati di due metodologie analitiche, al fine di costruire la curva di frequenza cumulata riportata in figura 4.9.

Metodo nuovo	Metodo vecchio	Δ	$\Delta\%$	$\Delta\%$ ordinamento	Numero d'ordine	Frequenza cumulata
N	V	N-V	$((N-V)/V)100$	(asse x)	n	n/9 (asse y)
4	5	-1	-40	-40	1	0,11
14	16	-2	-14	-40	2	0,22
18	16	+2	+11	-14	3	0,33
10	10	0	0	-8	4	0,44
12	13	-1	-8	0	5	0,56
19	16	+3	+16	+8	6	0,67
6	4	+2	+33	+11	7	0,78
5	7	-2	-40	+16	8	0,89
12	11	+1	+8	+33	9	1,00

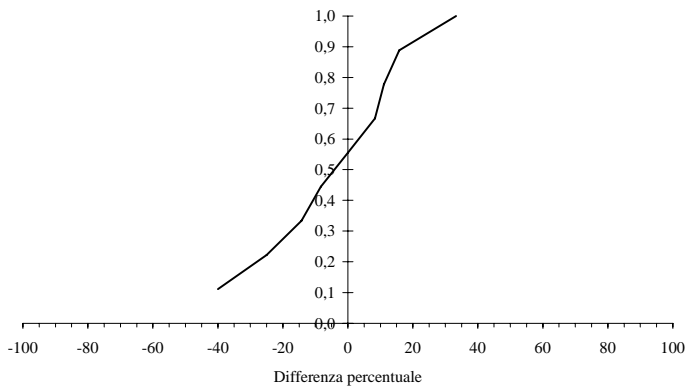


Fig. 4.9. Esempio di curva di frequenza cumulata ottenuta dai dati simulati derivanti da due metodologie analitiche a confronto.

Le curve di frequenza cumulata permettono il confronto fra serie di dati con diversa lunghezza ed ordine di grandezza; inoltre la rappresentazione di ciascuna serie di misure con linee diverse permette di confrontare in un unico grafico, fino a 4-6 serie di dati. La bontà dell'accordo fra le due serie di dati confrontate è fornita dallo scostamento della curva di frequenza cumulata rispetto al valore zero di ascissa (corrispondente all'uguaglianza fra i risultati), mentre l'errore sistematico è evidenziato dallo scostamento dal valore 0,5 (50% dei dati o valore mediano) dell'intersezione della curva con l'asse delle ordinate.

Considerando ora i dati analitici reali, le curve ottenute dal confronto fra le vecchie e le nuove metodiche usate presso l'Istituto Italiano di Idrobiologia, sono riportate nelle figure 4.10. e 4.11.; esse si riferiscono a ciascuna coppia di misure eseguite su un campione, come differenza fra la concentrazione ottenuta con il metodo precedente (spettrofotometria per ammonio, nitrati e silicati, AAS per i cationi) e quella ottenuta con il metodo attuale (IC per ammonio, nitrati, cationi; FIA per i silicati), rapportata al valore del metodo precedente. Questi grafici vengono riportati su due scale rispettivamente fra $\pm 100\%$ e $\pm 20\%$ di differenza. Anche in questo caso la bontà dell'accordo fra le due misure è fornita dallo scostamento rispetto al valore zero dell'asse delle ascisse, mentre l'errore sistematico è determinato da quanto la curva si scosta dal valore 0,5.

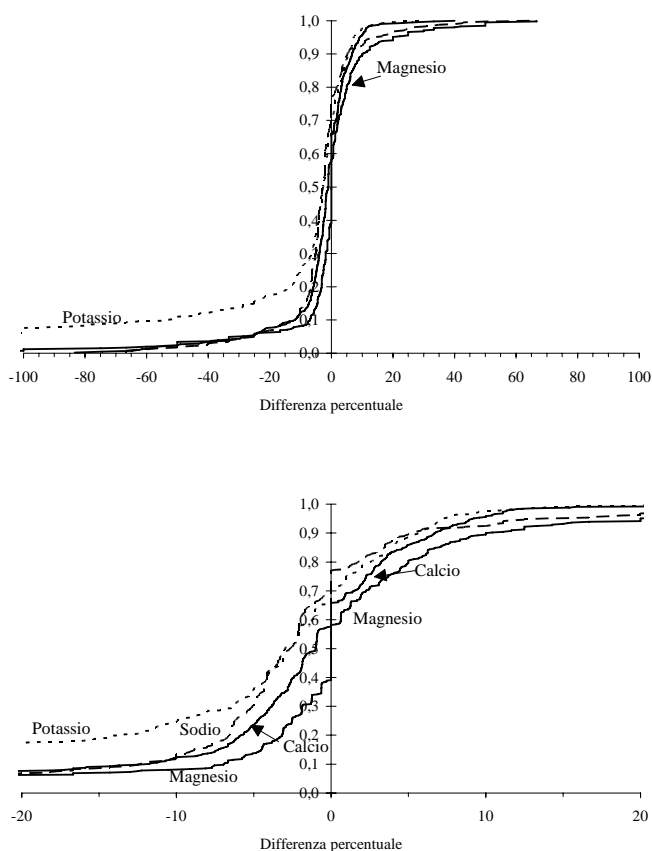


Fig. 4.10. Curve di frequenza cumulata delle differenze percentuali ottenute nelle determinazioni di sodio, potassio, magnesio e calcio con la metodica in assorbimento atomico rispetto alla cromatografia ionica (A.A.S. - I.C.). Figura inferiore ingrandimento del grafico superiore sulla scala -20 e +20.

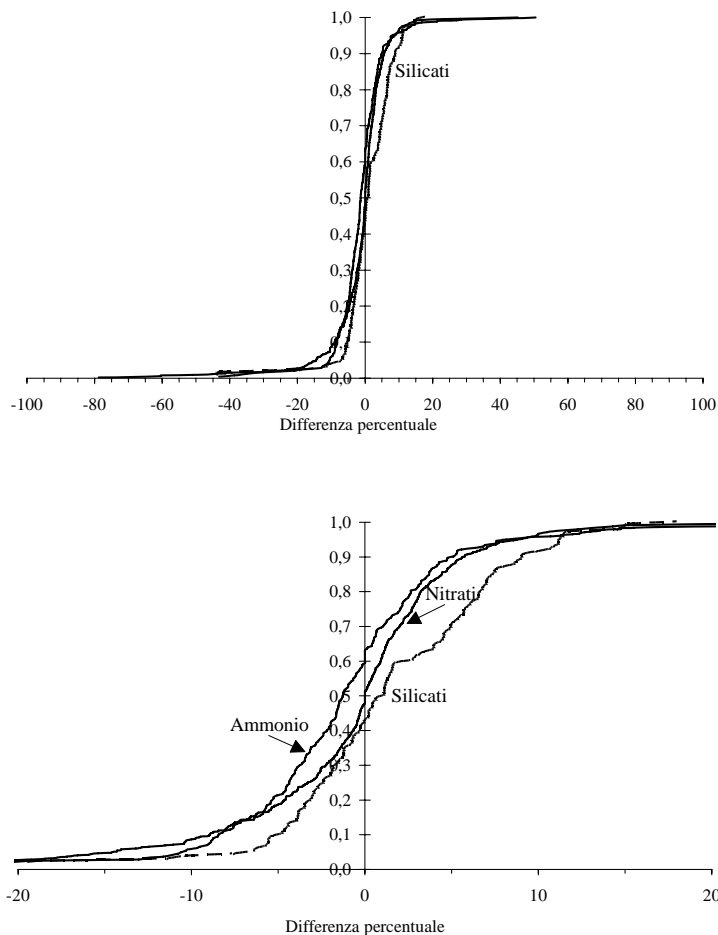


Fig. 4.11. Curve di frequenza cumulata delle differenze percentuali ottenute nelle determinazioni di ammonio e nitrati con le metodiche colorimetriche rispetto alla cromatografia ionica (Col. - I.C.), e dei silicati con il metodo colorimetrico rispetto al metodo F.I.A. (Col. - F.I.A.). Figura inferiore ingrandimento del grafico superiore sulla scala -20 e +20.

Osservando come esempio i cationi (Fig. 4.10.) in termini di accordo fra le due metodologie, si vede come il risultato migliore sia fornito dal calcio, mentre il peggiore dal potassio; lo stesso vale per l'errore sistematico, poiché la curva del calcio coincide con il valore zero per frequenze che vanno dallo 0,4 a 0,65, mentre la curva del potassio interseca lo zero a 0,7. In altri termini questo significa, nel caso del potassio, che nel 70% dei casi si sono avuti scarti negativi fra la vecchia e la nuova metodologia, mentre solo nel 30% dei casi gli scarti sono stati positivi. Questo indica una sottostima del vecchio metodo rispetto al nuovo; la significatività delle dif-

ferenze deve tuttavia essere valutata statisticamente, come si è detto in precedenza, ad esempio con il test del segno o il test di Wilcoxon.

4.2.7. CONTROLLO DELLA CONSISTENZA INTERNA DELLE ANALISI

I paragrafi precedenti hanno descritto metodologie e precauzioni utilizzate per ottenere e mantenere una buona qualità analitica dei risultati. Questo ed il paragrafo successivo riguardano il controllo e la valutazione dei risultati ottenuti. Si tratta quindi di operazioni da eseguire al termine delle analisi, miranti ad assicurare che i risultati siano accettabili sulla base delle leggi chimiche e chimico-fisiche (controllo del bilancio ionico e confronto fra conducibilità calcolata e misurata) e sulla base delle esperienze già acquisite dal laboratorio sul particolare tipo di campioni esaminati (confronto con dati precedenti). È indispensabile che questi controlli avvengano immediatamente a conclusione delle analisi, quando il campione è ancora in laboratorio, al fine di consentire la ripetizione delle analisi nel caso i risultati fossero non accettabili o dubbi.

Sia il controllo del bilancio ionico che il confronto fra conducibilità misurata e calcolata dalle concentrazioni dei soluti si basano sull'ipotesi che l'analisi abbia considerato le più importanti specie ioniche in soluzione.

Bilancio ionico: il confronto fra le concentrazioni di anioni e cationi costituisce il metodo di controllo delle analisi più comunemente accettato ed utilizzato. Si veda per esempio A.P.H.A. (1981) e Rodier (1984) per quanto riguarda le acque dolci in generale; Miles & Yost (1982); Bilonick & Nichols (1983) per le acque di pioggia. Unitamente al controllo basato sulle conducibilità, il bilancio ionico è inoltre utilizzato per la validazione dei dati in reti per lo studio della chimica delle deposizioni, quali l'EMEP (*Co-operative programme for monitoring and evaluation of the long range transmission of air pollutants in Europe*) (Schaug 1988; EMEP 1996) e la rete italiana per lo studio delle deposizioni atmosferiche, RIDEP (Mosello *et al.* 1990b).

Oltre alla completezza dell'analisi, è necessario che le concentrazioni misurate si riferiscano realmente alla forma ionica; deviazioni da tale requisito sono possibili per calcio, magnesio, sodio, potassio e bicarbonati, che possono essere contenuti nel particolato ancora in sospensione nel filtrato, e che in parte sono misurati con la spettrofotometria in assorbimento atomico o per titolazione acidimetrica.

Lo scostamento ($\Delta\%$) dall'uguaglianza delle concentrazioni di anioni (A) e cationi (C), viene calcolato come percentuale fra la differenza delle concentrazioni di cationi ed anioni, espresse in meq l^{-1} , rispetto alla metà della concentrazione ionica globale:

$$\Delta\% = 100 \frac{(C - A)}{0,5(C + A)}$$

Lo scostamento che ci si deve attendere nel caso delle acque dolci del Nord Italia, avendo determinato Ca, Mg, Na, K, NH_4 , HCO_3 , SO_4 , NO_3 e Cl, è inferiore al 4-6%; la stessa percentuale può essere indicata per le acque meteoriche, ove è necessario considerare anche la presenza dello ione idrogeno, calcolato dai valori di pH o direttamente titolato. La figura 4.12. riporta gli scarti percentuali sui bilanci ionici di

acque superficiali (fiumi tributari del Lago Maggiore e del Lago d'Orta) e di acque meteoriche raccolte a Pallanza nel periodo 1989-'92. Lo scostamento percentuale è in genere funzione della concentrazione ionica del campione, al fine di evidenziare questo aspetto i due gruppi di dati sono in ordine crescente di conducibilità; è evidente quindi che in campioni a basso contenuto ionico ci si deve attendere una differenza percentuale più elevata.

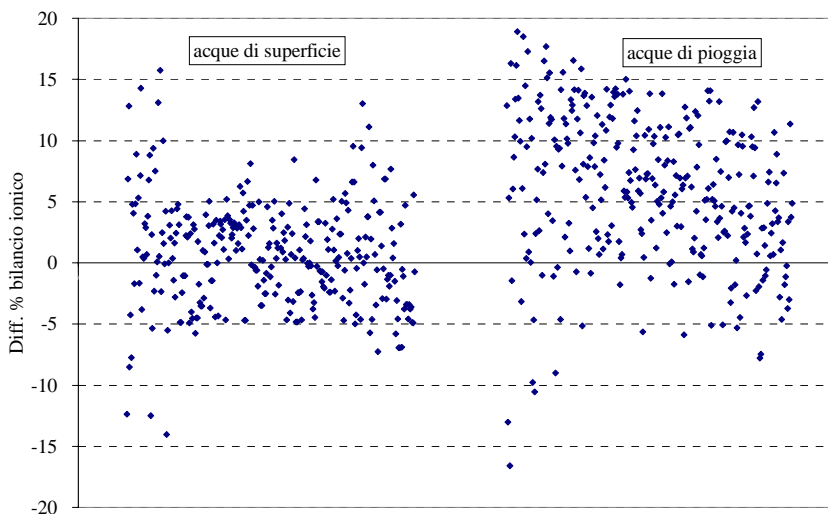


Fig. 4.12. Differenze percentuali sul bilancio ionico di due gruppi di campioni rappresentativi delle acque di superficie e delle acque di pioggia; i due gruppi di dati sono ordinati in ordine crescente di conducibilità, per le acque di superficie i valori vanno da 6 a 800 $\mu\text{S cm}^{-1}$, mentre per le acque di pioggia da 4 a 110 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

La prevalenza degli ioni positivi o negativi, che porta ad una sistematica differenza percentuale positiva o negativa, può indicare la presenza di errori sistematici o l'aver trascurato qualche ione importante; in entrambi i casi è necessario un approfondimento analitico.

Relazione fra conducibilità misurata e calcolata: in prima approssimazione la conducibilità misurata può essere confrontata con il valore di conducibilità calcolata a diluizione infinita (CE_{∞} in $\mu\text{S cm}^{-1}$), ottenuto dalla somma dei prodotti delle concentrazioni dei singoli ioni (C_i in meq l^{-1}) per le rispettive conducibilità ioniche equivalenti a diluizione infinita (λ_i in $\text{S cm}^2 \text{eq}^{-1}$):

$$CE_{\infty} = \sum \lambda_i C_i \quad (1)$$

il cui calcolo dimensionale, tenuto conto che 1 litro = 1dm^3 , è il seguente:

$$CE_{\infty} = \frac{S \times \text{cm}^2 \text{ meq}}{\text{eq dm}^3} = \frac{S \times \text{cm}^2}{\text{eq}} \frac{\text{eq}}{1000 \times 1000 \times \text{cm}^3} = \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}$$

Gli ioni considerati e le rispettive conducibilità equivalenti a diluizione infinita a 20 e a 25°C sono elencati in tabella 4.4. L'esame dei dati presentati evidenzia la notevole differenza esistente fra i valori di conducibilità ionica equivalente dello ione idrogeno rispetto a quella dei rimanenti ioni. Per questa ragione in soluzioni con pH inferiori a 5,0 si deve considerare anche lo ione idrogeno, infatti il suo contributo alla conducibilità aumenta rapidamente al diminuire del pH; a pH uguali o inferiori a 4,3 tale contributo può essere superiore al 50%. La concentrazione (attività) dello ione idrogeno, espressa in eq l^{-1} , può essere calcolata dal pH:

$$\text{H}^+ = 10^{-\text{pH}}$$

Tab. 4.4. Fattori di trasformazione delle concentrazioni da mg l^{-1} a meq l^{-1} e valori delle conducibilità equivalenti a diluizione infinita alle temperature di 20 e 25°C.

	Fattore di trasformazione a meq l^{-1}	Conducibilità equivalente a 20°C $\text{S cm}^2 \text{ eq}^{-1}$	Conducibilità equivalente a 25°C $\text{S cm}^2 \text{ eq}^{-1}$
pH	$10^{(3-\text{pH})}$	315,1	350,0
Ammonio mg N l^{-1}	0,07139	67,0	73,5
Calcio mg l^{-1}	0,04990	54,3	59,5
Magnesio mg l^{-1}	0,08224	48,6	53,1
Sodio mg l^{-1}	0,04348	45,9	50,1
Potassio mg l^{-1}	0,02528	67,0	73,5
Bicarbonati (alcalinità) meq l^{-1}	1	39,4	44,5
Solfati $\text{mg SO}_4 \text{ l}^{-1}$	0,02082	71,2	80,0
Nitrati mg N l^{-1}	0,07139	63,6	71,4
Cloruri mg l^{-1}	0,02821	68,0	76,4
Fluoruri mg l^{-1}	0,05263	49,1	54,4

In generale, a causa delle interazioni fra ioni in soluzione, ci si deve attendere che il valore di conducibilità calcolata a diluizione infinita (CE_{∞}) sovrastimi sistematicamente la conducibilità misurata. Tale differenza è trascurabile per acque con conducibilità inferiori a $100 \mu\text{S cm}^{-1}$, mentre per soluzioni con contenuto ionico più elevato è più corretto valutare la conducibilità calcolata (CE) utilizzando le attività ioniche al posto delle concentrazioni:

$$CE = \sum \lambda_i a_i = \sum \lambda_i f_i C_i$$

dove a_i è l'attività dello ione considerato ed f_i è il fattore o coefficiente di attività ionica media. Quest'ultimo può essere valutato con diverse approssimazioni (Stumm & Morgan 1981) tra cui quella di Debye Huckel adatta a forze ioniche inferiori a 0,005 M:

$$\log f_i = Az_i^2 \sqrt{I}$$

o usando l'approssimazione di Debye-Huckel in forma estesa adatta a forze ioniche comprese tra 0,005 M e 0,1 M:

$$\log f_i = Az_i^2 \frac{\sqrt{I}}{1 + Bs_i\sqrt{I}}$$

dove A e B sono delle costanti che in acqua a 20 °C hanno valore 0,498 e 0,327 rispettivamente, s_i è la dimensione di ogni ione in Angstrom ed I è la forza ionica calcolata dalle concentrazioni molari C_i e dal numero di cariche dello ione in esame z_i :

$$I = 0,5 \sum C_i Z_i^2$$

La 18ª edizione dello *Standard Methods* (A.P.H.A. 1992) propone l'equazione di Davies già riportata da Stumm & Morgan (1981) per il calcolo della conducibilità, corretta per la forza ionica, con la seguente formula:

$$CE = CE_\infty y^2 \quad (2)$$

dove y è il coefficiente di attività calcolato dalla seguente equazione valida per acque con forza ionica fino a 0,5 M:

$$y = 10^{-0,5 \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,31 \right)}$$

Il confronto fra conducibilità misurata e calcolata utilizzando le formule (1) e (2) su campioni aventi un bilancio ionico attendibile, viene fornito dalle figure 4.13. e 4.14., rispettivamente per acque superficiali e meteoriche. Nel caso delle acque superficiali è evidente il progressivo scostamento dai valori di conducibilità calcolata dalla retta 1:1, con il crescere del contenuto dei soluti. La correzione si rende necessaria per valori di conducibilità superiori a 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$; è inoltre evidente che la correzione fornisce risultati molto attendibili almeno sino a conducibilità di 800 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Nel caso dell'acqua di pioggia (Fig. 4.14.), i cui valori di conducibilità sono generalmente inferiori a 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$, il confronto fra conducibilità misurata e calcolata senza correzione per la forza ionica, evidenzia valori sistematicamente inferiori della seconda rispetto alla prima. Ovviamente la differenza aumenta applicando la correzione per la forza ionica. Tale differenza è presumibilmente dovuta al fatto che non tutte le specie ioniche delle deposizioni atmosferiche sono considerate nell'analisi; ad esempio uno studio eseguito sulle precipitazioni di Pallanza ha evidenziato sensibili concentrazioni di formiati ed acetati presenti in forma ionica (Mosello & Tartari 1992).

Sulla base di queste considerazioni si arriva, come per il bilancio ionico, allo scostamento ($\Delta\%$) dall'uguaglianza fra conducibilità misurata e calcolata, espresso come percentuale sulla conducibilità misurata:

$$\Delta\% = 100 \frac{(\text{Cond. misurata} - \text{Cond. calcolata})}{\text{Cond. misurata}}$$

Lo scostamento che ci si deve attendere nel caso delle acque dolci del Nord Italia, considerando la conducibilità calcolata corretta secondo Davies (A.P.H.A. 1992), è generalmente inferiore al 10%; la stessa percentuale può essere indicata anche per le acque meteoriche.

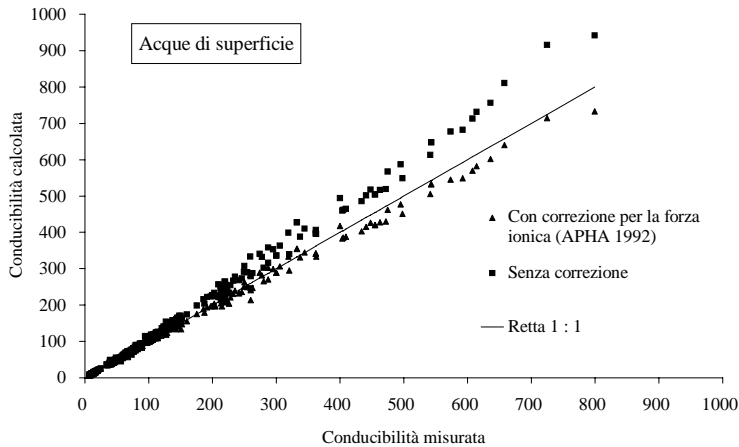


Fig. 4.13. Confronto su campioni di acque di superficie fra conducibilità misurata e conducibilità calcolata dalla somma ioni senza correzione per la forza ionica del campione e con correzione secondo APHA (1992).

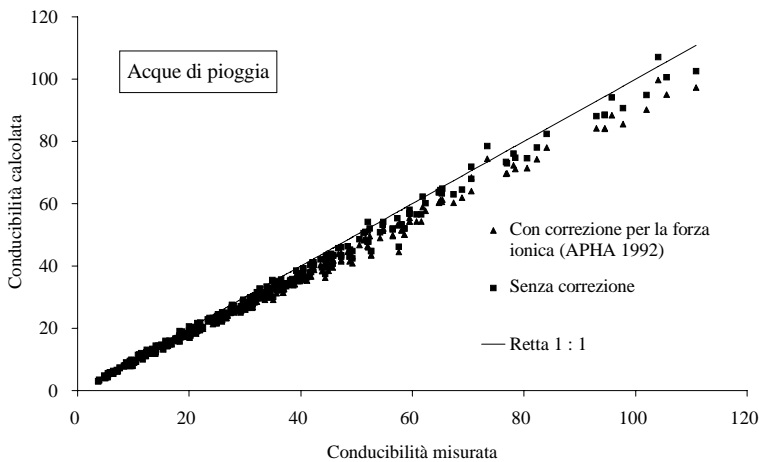


Fig. 4.14. Confronto su campioni di acque di pioggia fra conducibilità misurata e conducibilità calcolata dalla somma ioni senza correzione per la forza ionica del campione e con correzione secondo APHA (1992).

La figura 4.15. riporta gli scarti percentuali sulle conducibilità di acque superficiali (fiumi tributari del Lago Maggiore e del Lago d'Orta) e di acque meteoriche raccolte a Pallanza nel periodo 1989-'92. La prevalenza sistematica di differenze

percentuali positive o negative, può indicare la presenza di errori sistematici o l'aver trascurato qualche ione importante, come nel caso di formiati ed acetati nelle acque di pioggia, che porta alla sistematica sottostima della conducibilità calcolata.

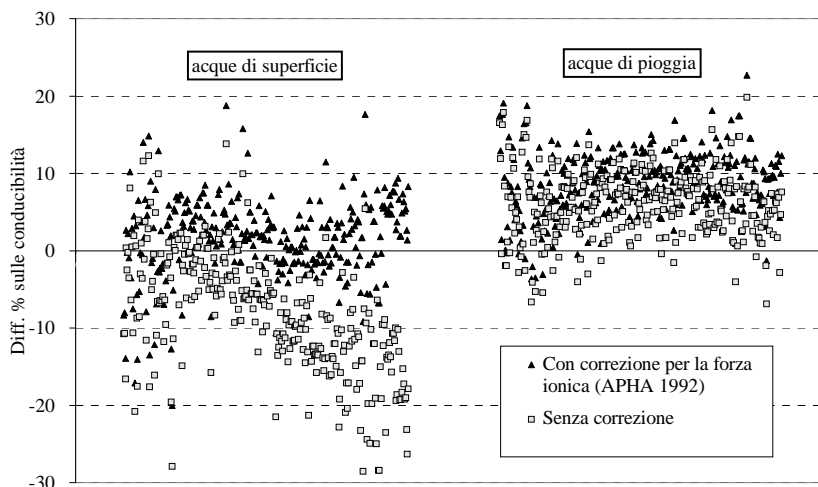


Fig. 4.15. Differenze percentuali sulle conducibilità calcolate di due gruppi di campioni rappresentativi delle acque di superficie e delle acque di pioggia; i due gruppi di dati sono ordinati in ordine crescente di conducibilità, per le acque di superficie i valori vanno da 6 a 800 $\mu\text{S cm}^{-1}$, mentre per le acque di pioggia da 4 a 110 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

Per un approfondimento sulle differenze percentuali ottenute dal bilancio ionico e dalla conducibilità si rimanda alla parte riguardante la validazione dei dati (vedi paragrafo 4.2.9.).

4.2.8. CORREZIONE DELLA CONDUCEBILITÀ PER LA TEMPERATURA

I valori di conducibilità dipendono dalla temperatura del campione al momento della misura. Per rendere confrontabili le misure eseguite su diversi campioni è quindi necessario adottare una temperatura di riferimento. Questa temperatura è di 20°C per gran parte dei laboratori europei, di 25°C per gli Stati Uniti. Presso il laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia la temperatura di riferimento è stata di 18°C sino al dicembre 1994, da gennaio 1995 è stata portata a 20°C. Misure eseguite a temperature diverse da quella di riferimento richiedono una correzione; in passato si eseguiva la misura della temperatura contemporaneamente alla misura della conducibilità, procedendo poi alla correzione applicando un fattore di correzione superiore ad uno nel caso di temperature inferiori a quella di riferimento, ed inferiore ad uno nel caso opposto. Un esempio di tavola per la correzione della conducibilità in funzione della temperatura è quello riportato da Rodier (1984); queste tavole di correzione sono state utilizzate in Istituto fino al 1981, data di acquisto di

un conduttimetro con correzione automatica. L'utilizzo di un fattore comune per tutti i tipi di campioni presuppone che i campioni presentino un rapporto ionico approssimativamente costante, in quanto le conducibilità specifiche dei diversi ioni variano in modo diverso con la temperatura (Tab. 4.4.).

I conduttimetri costruiti a partire dalla seconda metà degli anni settanta hanno la possibilità di correggere automaticamente i valori della conducibilità del campione riportandoli alla temperatura di riferimento. Questo avviene applicando una costante che viene moltiplicata per la differenza fra la temperatura del campione e la temperatura di riferimento; anche in questo caso vale il presupposto della costanza nei rapporti ionici.

La costante utilizzata nel laboratorio di chimica dell'Istituto dal 1982 al 1996 è di 2,3% per ogni grado centigrado, questo significa ad esempio che la conducibilità di campioni con temperatura inferiore di 3 °C dalla temperatura di riferimento, va aumentata del 6,9% e viceversa per temperature superiori.

Un esempio delle differenze che ci si deve attendere nei fattori di correzione della conducibilità per la temperatura è mostrata nella figura 4.16., dove viene riportato l'andamento della conducibilità assoluta in funzione della temperatura per acque con caratteristiche chimiche sensibilmente diverse:

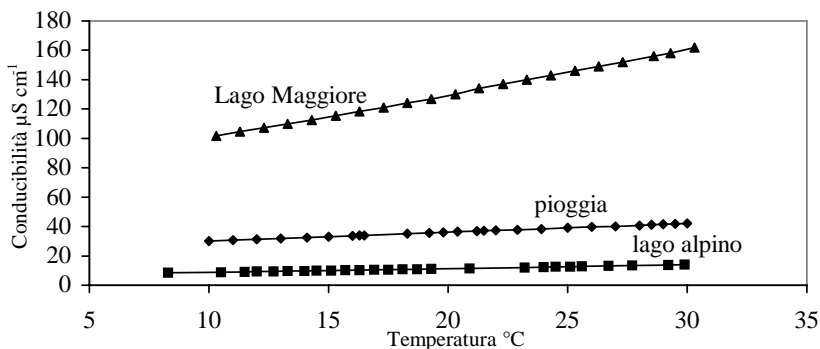


Fig. 4.16. Variazione della conducibilità in funzione della temperatura per acque a diverso contenuto ionico.

Lago Maggiore	esempio di contenuto ionico medio dove gli ioni prevalenti sono calcio, bicarbonati, solfati e magnesio;
lago alpino	esempio di contenuto ionico basso dove gli ioni prevalenti sono solfati, calcio e magnesio;
pioggia acida	esempio di contenuto ionico basso dove gli ioni prevalenti sono l'idrogenione, solfati, nitrati ed ammonio; importante è la presenza dello ione idrogeno caratterizzato da un'elevata conducibilità specifica.

La figura 4.17. mostra i valori di conducibilità misurati per le tre acque a diverse temperature, normalizzati dividendoli per il valore di conducibilità alla temperatura

di riferimento (20°C). Dalle diverse pendenze risultanti, si ricava il fattore di correzione percentuale per unità di grado, da utilizzare per riportare ciascun campione alla temperatura di riferimento; i valori così calcolati sono 2,4%, 2,5% e 1,7% rispettivamente per le acque del Lago Maggiore, del lago alpino e per la pioggia. Il valore indicato da Rodier (1984) è di 2,3%, corrispondente al valore utilizzato come fattore per la correzione automatica sul conduttimetro. In pratica si vede come la differenza sia significativa solo per i campioni di acque di pioggia. Per evitare questo inconveniente od altri simili che potrebbero insorgere nella misura di campioni a contenuto ionico insolito, è opportuno eseguire le misure di conducibilità a temperature molto prossime a quella di riferimento, e comunque entro un ambito di $\pm 2^\circ\text{C}$.

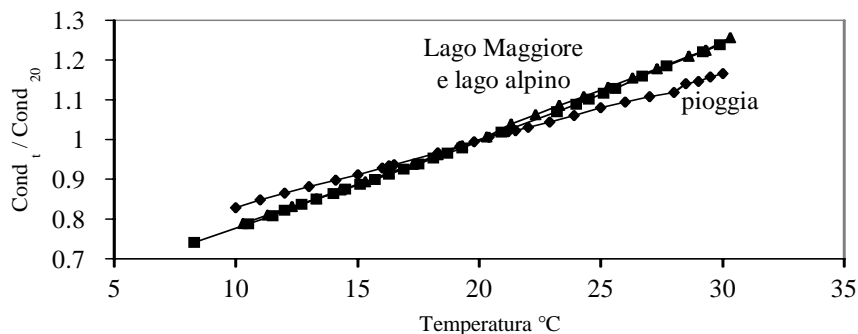


Fig. 4.17. Variazione del rapporto fra la conducibilità a diverse temperature (Cond_t) e la conducibilità a 20°C (Cond_{20}) in funzione della temperatura.

4.2.9. VALIDAZIONE DEI DATI

La validazione dei dati si articola in due momenti: il primo verifica la consistenza interna dei risultati, sulla base del bilancio ionico e del confronto fra conducibilità misurata e calcolata (vedi paragrafo 4.2.7.); il secondo utilizza criteri meno oggettivi quali l'analogia con i risultati ottenuti in precedenza su campioni provenienti dagli stessi ambienti (fiumi, laghi e acque meteoriche).

Bilancio ionico e confronto fra conducibilità misurata e calcolata possono essere utilizzati per attribuire un punteggio alla qualità dell'analisi. Esempi in tal senso sono forniti dal criterio usato per la validazione dei dati analitici ottenuti dall'analisi delle acque di pioggia eseguite nell'ambito della rete EMEP (Schaug 1988), adottati anche nella rete italiana RIDEP (Mosello *et al.* 1990b) (Tabb 4.5. e 4.6.). Naturalmente la soglia di qualità da adottare è a discrezione del responsabile del laboratorio, in relazione all'utilizzo dei dati e di altre considerazioni. Nel laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia sono generalmente accettati i risultati con coefficiente di variazione percentuale su bilancio ionico e conducibilità inferiori al 4-6% per campioni di acque superficiali (laghi e fiumi), mentre per le acque meteoriche la differenza percentuale ($\Delta\%$) deve essere nella categoria I di tabella 4.5. e 4.6. Sui campioni che oltrepassano questi limiti vengono ripetute le analisi e, nel caso che la seconda analisi confermi la non rispondenza dei normali criteri di consistenza in-

terna, si esaminano le possibili cause e si confrontano, se disponibili, le precedenti analisi eseguite sulle acque provenienti dallo stesso ambiente.

Tab. 4.5. Categorie dei risultati analitici sulla base delle differenze nelle concentrazioni ioniche (Δ %) in relazione alla sommatoria degli ioni (SI) espressa in $\mu\text{eq l}^{-1}$.

Sommatoria ioni ($\mu\text{eq l}^{-1}$)	Categoria I	Categoria II	Categoria III
SI < 50	$\Delta \% \leq 60$	$\Delta \% > 60$	
$50 \leq \text{SI} < 100$	$\Delta \% \leq 30$	$30 < \Delta \% \leq 60$	$\Delta \% > 60$
$100 \leq \text{SI} < 500$	$\Delta \% \leq 15$	$15 < \Delta \% \leq 30$	$\Delta \% > 30$
SI > 500	$\Delta \% \leq 10$	$10 < \Delta \% \leq 20$	$\Delta \% > 20$

Tab. 4.6. Categorie dei risultati analitici sulla base delle differenze fra conducibilità calcolate e misurate (Δ %) in relazione alla conducibilità misurata (CM) espressa in $\mu\text{S cm}^{-1}$.

Sommatoria ioni ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Categoria I	Categoria II	Categoria III
CM \leq 30	$\Delta \% \leq 30$	$\Delta \% > 30$	
CM > 30	$\Delta \% \leq 20$	$20 < \Delta \% \leq 40$	$\Delta \% > 40$

Infine l'accettazione dei risultati che non soddisfano i criteri di qualità predefiniti resta una responsabilità dell'operatore e di chi deve utilizzare il dato stesso, che auspicabilmente devono lavorare a stretto contatto.

4.2.10. ARCHIVIAZIONE DEI DATI

L'archiviazione dei dati è stata fatta per decenni, ed è ancora oggi eseguita, su supporto cartaceo; da circa quindici anni si è aggiunta l'archiviazione su *floppy disk*. Per l'archiviazione su carta è opportuno che i moduli dove vengono trascritti i dati nel corso della procedura analitica contengano la maggiore quantità di informazioni utili a ricostruire il processo di campionamento ed analisi che il campione ha seguito. Ad esempio è utile riportare la data e l'ora del prelievo, la data di inizio dell'analisi, le eventuali particolari procedure di preparazione del campione; nelle determinazioni spettrofotometriche il passo ottico delle cuvette utilizzate per la lettura, i valori di assorbanza ed i singoli risultati delle analisi eseguite in doppio o ripetute in date diverse. Questi moduli sono conservati in laboratorio almeno per la durata dell'anno solare; successivamente vengono archiviati opportunamente raggruppati per tipologia di ambienti considerati.

Dal 1980 il crescente uso del *personal computer* nel laboratorio ha fatto sì che i dati vengano conservati anche su disco, utilizzando normali fogli elettronici. Questo permette inoltre di eseguire immediatamente i test di controllo di qualità e di decidere quali analisi debbano essere ripetute. Con l'introduzione della cromatografia ionica anche per l'analisi dei cationi nel 1990, è ora possibile in 2-3 giorni eseguire l'intero ciclo di analisi, utilizzando i dati di pH, conducibilità, alcalinità, anioni e cationi, eseguire i controlli di qualità e ripetere immediatamente le analisi insoddisfacenti; contemporaneamente vengono eseguite le misure dei composti del fosforo, dell'azoto totale e della silice. In questo modo l'intero ciclo dal campionamento al-

L'archiviazione dei dati si svolge e termina nell'arco della settimana lavorativa, eliminando così i problemi della conservazione del campione.

Il personale dell'Istituto interessato ai dati può copiarli dal supporto cartaceo o dal disco; gli originali rimangono nell'archivio del laboratorio. Questo permette di conservare anche analisi occasionali fatte su ambienti non esaminati sistematicamente, che spesso si rivelano preziosi a distanza di anni o di decenni.

4.2.11. CONFRONTO DEI RISULTATI ANALITICI CON I DATI PRECEDENTI

L'esempio del paragrafo precedente, relativo al confronto fra conducibilità misurata e calcolata per acque superficiali ed acque meteoriche, sottolinea l'opportunità di non utilizzare criteri unici per la validazione dei risultati per ogni tipologia d'acqua. Se si analizzano frequentemente campioni aventi una stessa origine (laghi, fiumi o deposizioni atmosferiche in una determinata stazione) per ogni tipo di campione si possono individuare relazioni statistiche abbastanza ben delineate fra gli ioni, o fra ioni e conducibilità; queste relazioni statistiche possono essere utili per evidenziare dati aberranti. Naturalmente non è detto che il valore che si scosta dalla popolazione dei dati già misurata indichi necessariamente un errore analitico: infatti possono essere intervenuti fenomeni nuovi o occasionali che hanno variato il rapporto fra gli ioni. Questa possibilità naturalmente è diversa in relazione all'ambiente considerato, minima per laghi di grandi dimensioni, più probabile per acque correnti o meteoriche. Essa richiede comunque un ulteriore controllo o, a giudizio dell'operatore, la ripetizione dell'analisi.

Esempi di relazioni utilizzabili per le acque superficiali sono la relazione fra conducibilità e concentrazioni di cationi e anioni (Fig. 4.18.), oppure quella fra calcio più magnesio e solfati più alcalinità, per acque fluviali o lacustri (Fig. 4.19.). Nel caso delle deposizioni atmosferiche la presenza dell'idrogenione rende meno significativa la relazione fra conducibilità e concentrazioni cationiche, a causa dell'elevata conducibilità equivalente di questo ione precedentemente ricordata (Fig. 4.20.). In questo caso si può correggere il valore di conducibilità misurato per il contributo dell'idrogenione (Mosello *et al.* 1984).

In generale l'approccio del controllo statistico fornisce buone indicazioni per gli ioni presenti in maggiori concentrazioni, mentre per i rimanenti le indicazioni sono spesso carenti. Tuttavia in alcuni casi l'esistenza di un'origine comune permette l'esistenza di buone relazioni statistiche anche fra gli ioni minori; è il caso di sodio e cloruri nelle deposizioni atmosferiche (Mosello & Morselli 1992). Sta all'esperienza dell'analista, o di chi deve validare i dati, individuare il tipo di relazione di più semplice e valido utilizzo, in relazione alla tipologia del campione ed alla problematica esaminata.

4.2.12. DOCUMENTAZIONE

La documentazione deve permettere di reperire tutte le informazioni inerenti al processo analitico, campionamento, conservazione, pretrattamento del campione (es. filtrazione), calibrazione, misura e validazione del dato. Raramente tutte queste informazioni sono disponibili su un unico documento (manuale o protocollo interno al laboratorio); spesso le informazioni, benché ordinate, sono separate. Comunque, a

garanzia del buon funzionamento del laboratorio e della possibilità di reperire le informazioni, almeno tre blocchi di informazioni dovrebbero essere disponibili. Questi riguardano:

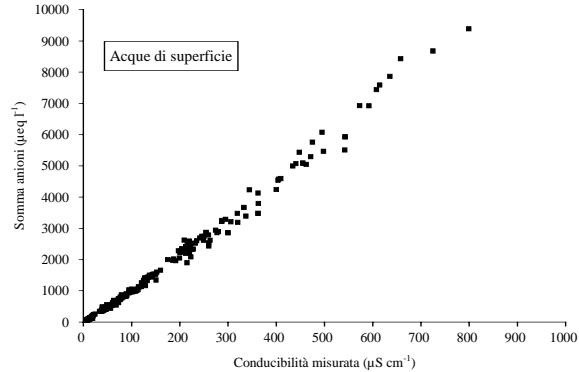


Fig. 4.18. Confronto fra conducibilità misurata e somma anioni per campioni di acque di superficie.

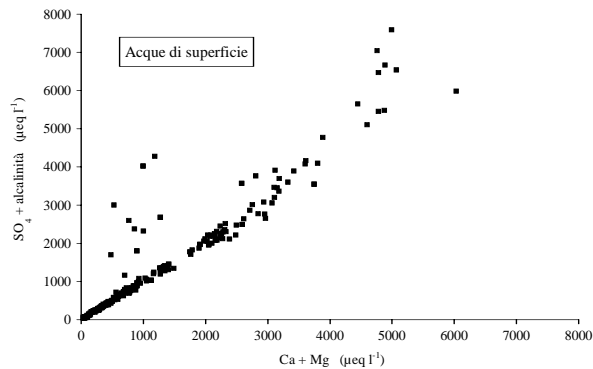


Fig. 4.19. Confronto fra la somma di calcio e magnesio e la somma di solfati e alcalinità per campioni di acque di superficie.

strumentazione analitica: manuali d'uso e manutenzione di ogni strumento, documenti relativi a contratti di manutenzione o a interventi tecnici di riparazione o revisione, modalità per il corretto uso e l'ordinaria manutenzione;

metodologie in uso: descrizione di ciascuna metodologia analitica comprensiva dei dettagli per permetterne una corretta esecuzione, inclusa la preparazione degli *standard*, le modalità di calibrazione, tutte le calibrazioni eseguite negli anni, le carte di controllo dei bianchi e delle ripetibilità a diverse concentrazioni;

prodotti chimici registro di carico e scarico con il quale si possa provvedere in tempo all'acquisto dei prodotti in esaurimento.

Una ulteriore documentazione importante, ma che non entra necessariamente nella *routine* del laboratorio, riguarda le variazioni delle metodologie analitiche o la sostituzione dei metodi e le prove eseguite per verificare la confrontabilità dei risultati ottenuti con il vecchio ed il nuovo metodo. È opportuno che questo materiale sia raccolto in un unico sito, mentre una copia delle metodologie in uso deve essere sempre disponibile per il personale che opera in laboratorio.

Nel laboratorio dell'Istituto Italiano di Idrobiologia la documentazione delle procedure analitiche è stata effettuata con modalità diverse nel corso degli anni. Di notevole aiuto è stata la continuità della presenza del personale addetto; sono tuttora disponibili le documentazioni originarie dei metodi utilizzati negli anni cinquanta. Inoltre, grazie al materiale conservato in archivio, è stato possibile risalire ai primissimi anni di attività.

Da circa quindici anni è in uso un protocollo interno per le metodologie analitiche, progressivamente adattato alle mutate condizioni analitiche. Questo volume riprende pressoché integralmente l'attuale protocollo interno nel capitolo 3, mentre gli aspetti più importanti dell'evoluzione dei metodi sono riportati nel secondo capitolo. Questo stesso volume costituisce un ulteriore passo nella raccolta e nella sistemazione organica delle informazioni che permettono di documentare l'evoluzione e lo stato attuale dell'attività analitica del laboratorio.

4.3. CONTROLLI DI QUALITÀ ESTERNI AL LABORATORIO

4.3.1. ESERCIZI DI INTERCALIBRAZIONE

Le intercalibrazioni costituiscono un indispensabile momento di confronto e di critica per l'attività analitica svolta in un laboratorio. La partecipazione attiva alla preparazione e all'esecuzione dell'esercizio e alla discussione dei risultati permette di approfondire problemi che solitamente non vengono considerati nella *routine* del laboratorio, affrontando aspetti metodologici quali l'individuazione degli errori sistematici e dell'accuratezza di un metodo. Le intercalibrazioni sono inoltre indispensabili in campagne di misura che vedano coinvolti più laboratori. In questi casi, anche se si opera con metodologie analitiche simili e con strumentazione adeguata, la confrontabilità dei dati prodotti non può comunque essere data per scontata, ma deve essere verificata.

Questi concetti sono ormai comunemente accettati e le intercalibrazioni sono entrate nella pratica dell'attività analitica. Inoltre sono oggi disponibili numerosi lavori che esaminano gli aspetti operativi (Steiner 1975; Grant 1985) e relativi all'elaborazione dei dati di esercizi interlaboratorio (Youden 1975; ISO 5725 1986)

Il laboratorio di chimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia ha partecipato attivamente a numerose intercalibrazioni a livello nazionale ed internazionale in relazione a studi diversi; tali attività sono riassunte in tabella 4.7. Fra le prime esperienze si possono ricordare le intercalibrazioni per le determinazioni dei composti dell'azoto e del fosforo organizzate dall'*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) nel 1974 e 1975 nell'ambito degli studi sulle cause dell'eutrofizzazione (Fricker 1980; OECD 1982). Erano invece mirate allo spettro io-

nico e alle misure di pH e conducibilità le intercalibrazioni svolte nell'ambito del Gruppo di Studio delle caratteristiche chimiche delle precipitazioni del Nord Italia (Novo 1987). Questa attività, che ha visto coinvolti oltre 20 enti di ricerca e controllo ambientale, era finalizzata a delineare per la prima volta un quadro unitario della chimica delle deposizioni atmosferiche nell'Italia settentrionale e nel Cantone Ticino. Il coordinamento dell'attività di intercalibrazione era collegiale, coinvolgendo numerosi laboratori; l'Istituto Italiano di Idrobiologia ha collaborato sia alla preparazione dei campioni sintetici utilizzati che all'elaborazione dei risultati.

Dal marzo 1985 al marzo 1987 l'Istituto Italiano di Idrobiologia, in collaborazione con l'Istituto dell'Ambiente del Centro Comune di Ricerche di Ispra e con l'Istituto di Ricerca sulle Acque del C.N.R. di Brugherio, si è fatto promotore di uno studio collaborativo al quale hanno partecipato circa 20 laboratori, dando vita ad un "Gruppo Informale di Limnologia". La collaborazione si è articolata in due aspetti di fondamentale importanza nella pratica limnologica: le analisi idrochimiche e gli studi sul fitoplancton (Mosello *et al.* 1987, 1989b). Le sei intercalibrazioni organizzate in quest'ambito hanno riguardato sia i principali soluti che i nutrienti algali; le discussioni dei dati che seguivano ciascuna intercalibrazione hanno costituito un importante momento di verifica e di collegamento fra i ricercatori operanti in campo limnologico.

Anche nell'attività di ricerca sull'acidificazione dei laghi alpini le intercalibrazioni sono state ampiamente utilizzate per assicurare qualità e confrontabilità dei risultati. Un primo progetto, svolto nell'ambito della Comunità Europea nel periodo 1988-91 ha visto impegnati, oltre all'Istituto, il Laboratorio Studi Ambientali del Dipartimento Ambiente e Territorio del Cantone Ticino, l'Istituto di Zoologia e Limnologia dell'Università di Innsbruck ed il Laboratorio Biologico della Provincia di Bolzano (Mosello *et al.* 1993d). Negli anni successivi, l'Istituto ha partecipato ad altri programmi di ricerca della Comunità Europea, in collaborazione con numerosi altri enti di ricerca di altri Paesi (Mosello *et al.* 1991b, 1992a; Marchetto *et al.* 1994). Particolare impegno è stato profuso nelle ricerche su *Acidification of Lakes: Paleolimnology and Ecology* (AL:PE), finalizzate allo studio chimico e biologico dei laghi remoti, iniziate nel 1988 e tuttora attive (Wathne *et al.* 1995). Il numero degli Istituti partecipanti è progressivamente cresciuto da sei sino a venticinque. Le analisi chimiche delle acque e delle deposizioni atmosferiche hanno un ruolo centrale in questi studi. Il coordinamento per le attività di analisi chimiche è stato congiuntamente svolto dall'Istituto Norvegese per la Ricerca sulle Acque (NIVA) e dall'Istituto Italiano di Idrobiologia. Sono state condotte due serie di intercalibrazioni, entrambe riguardanti la determinazione degli ioni principali, pH, conducibilità ed alcalinità. Il primo circuito di intercalibrazione è stato curato dal NIVA (Hovind 1988, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995) con approfondimenti sulle determinazioni di pH ed alcalinità (Hovind 1990). Sono stati inoltre considerati i composti dell'alluminio (Hovind 1989). Una seconda serie di intercalibrazioni è stata curata dall'Istituto Italiano di Idrobiologia, in collaborazione con l'Istituto Ambiente del Centro Comune di Ricerche di Ispra (Mosello *et al.* 1990c, 1992b, 1993c; Serrini *et al.* 1990, 1992, 1993; Mosello *et al.* 1995b).

Tab. 4.7. Attività di intercalibrazione a cui ha partecipato il laboratorio di idrochimica dell'Istituto Italiano di Idrobiologia.

Periodo	Enti organizzatori	N° partecipanti	N° esercizi	Contesto scientifico	Variabili analizzate	Riferimenti bibliografici
1974-75	EAWAG, OECD	9	2	Eutrofizzazione	NH ₄ , NO ₃ , N-Kjeld., RP, TP	Fricker 1980; OECD 1982
1983-84	Vari	20	12	Acidificazione delle deposizioni	pH, cond., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄	Novo 1987
1985-86	UFPA	20	1	Eutrofizzazione	NH ₄ , NO ₃ , TN, RP, TP, Cond.	
1988-96	NIVA	10-15	8	Acidificazione delle acque superficiali	pH, cond., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄ , C. Org., Al	Hovind, 1988, 1989, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996
1990	NIVA	13	1	Acidificazione delle acque superficiali	pH, alcalinità	Hovind 1990
1985-87	EI-JRC, CNR-III, CNR-IRSA	20	6	Eutrofizzazione	pH, cond., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄ , RP, TP, silicati	Mosello <i>et al.</i> 1987, 1989b
1989-90	BCR	14	3	Certificazione acque	Al, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S	Quevauxviller <i>et al.</i> 1992a, 1996; Reijnders <i>et al.</i> 1994
1989-92	EI-JRC, CNR-III	50-70	5	Acidificazione delle deposizioni	pH, cond., alc., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄	Mosello <i>et al.</i> 1990c, 1992b, 1993c; Serrini <i>et al.</i> 1990, 1992, 1993
1991	BCR	24	2	Certificazione pioggia	NH ₄ , Ca, Cl, H, Mg, NO ₃ , K, Na, SO ₄	Quevauxviller <i>et al.</i> 1993
1992-94	BCR	24	3	Certificazione acque	pH, cond., alc., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, NO ₃	Quevauxviller <i>et al.</i> 1996
1992-96	EI-JRC, CNR-III	70-120	6	Acidificazione delle deposizioni	Mg, Na, K, NH ₄	Mosello <i>et al.</i> 1992c, 1993a, 1994 a, b, 1995a, 1996
1990	CNR-IRSA, Univ. Roma	7	1	Metodica analitica	Solfiti per cromatografia ionica	Achilli <i>et al.</i> 1995
1994	ENEL CRAM	10	2	Acidificazione nebbie	pH, cond., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄ , metalli in traccia	
1991-96	CNR-III, EI-JRC, NIVA	15-20	6	Acidificazione delle acque superficiali	pH, cond., alc., Cl, SO ₄ , NO ₃ , Ca, Mg, Na, K, NH ₄	Mosello <i>et al.</i> 1995b

Acronimi Istituti: EAWAG, Institute for Aquatic Sciences and Water Pollution Control, Zurigo; OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development; UFPA, Ufficio Federale della Protezione dell'Ambiente, Berna; NIVA, Norwegian Institute for Water Research, Oslo; EI-JRC, Environment Institute, Joint Research Centre European Commission, Ispra; CNR-III, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza; CNR-IRSA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque, Brugherio; BCR, Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles; Univ. Roma, Università di Roma Istituto La Sapienza Dipartimento di Chimica; ENEL CRAM, Ente Nazionale Energia Elettrica, Centro Ricerca Ambiente e Materiali, Milano.

Un ulteriore impegno nel campo del controllo di qualità analitico è derivato dal coordinamento della rete italiana per lo studio della chimica delle deposizioni atmosferiche (RIDEP), svolto fra il 1988 ed il 1992 dall'Istituto per incarico del Ministero dell'Ambiente (Mosello 1993). L'attività mirava ad uniformare le metodologie di raccolta e trattamento dei campioni, a migliorare la confrontabilità dei dati prodotti nei circa quaranta laboratori partecipanti e ad eseguire un'elaborazione comune dei dati. Le intercalibrazioni hanno costituito sin dall'inizio dell'attività lo strumento più valido per migliorare il livello qualitativo delle analisi; l'organizzazione degli esercizi è stata effettuata dall'Istituto Italiano di Idrobiologia in collaborazione con l'Istituto dell'Ambiente del CCR di Ispra. Dopo ciascun esercizio si procedeva ad una discussione dei risultati, preventivamente distribuiti ai partecipanti, in riunioni che hanno costituito un utile momento di confronto. I risultati e la relativa discussione, imperniata sia su aspetti strettamente analitici che sulla validità della collaborazione ai fini della rete di rilevamento, sono stati successivamente pubblicati in una serie di pubblicazioni edite congiuntamente dal C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia e dal Ministero dell'Ambiente (Mosello *et al.* 1990c, 1992b, 1993c; Serrini *et al.* 1990, 1992, 1993).

In quest'ambito sono state svolte quattro intercalibrazioni annuali, dal 1989 al 1992; ai primi due esercizi hanno partecipato 34 e 38 laboratori, rispettivamente, che hanno analizzato pH, conducibilità e ioni principali su campioni di pioggia artificiali, presentanti caratteristiche chimiche prossime a quelle realmente riscontrate nell'Italia settentrionale. Le due successive intercalibrazioni sono state aperte anche a laboratori italiani, non direttamente coinvolti nella rete, e a laboratori stranieri, con i quali i due Istituti organizzanti erano in contatto. Alla terza e quarta intercalibrazione hanno quindi complessivamente partecipato 72 e 80 laboratori.

Al termine del programma RIDEP le intercalibrazioni sono continuate nell'ambito di una ricerca patrocinata dalla Comunità Europea, tendente a migliorare le prestazioni analitiche nei paesi del bacino del Mediterraneo (*Environmental Studies in the Mediterranean Basin: Analytical Quality Control and Assessment Project*, indicato con l'acronimo AQUACON). Il progetto, coordinato dall'Istituto Ambiente del Centro Comune di Ricerca di Ispra, è articolato in numerosi sottoprogetti, uno dei quali riguardante la chimica delle deposizioni atmosferiche (Muntau *et al.* 1994). Le intercalibrazioni del 1993, 1994 e 1995, svolte con modalità analoghe a quelle del quadriennio 1989-92, hanno visto un ulteriore aumento dei laboratori coinvolti (99, 108, 120 rispettivamente), collocati in oltre 20 Paesi (Mosello *et al.* 1994a, 1994b, 1995a, 1996). Un aspetto importante è costituito dal coinvolgimento di Paesi normalmente assenti dai circuiti di intercalibrazione internazionali, quali ad esempio l'Albania e l'Egitto. È inoltre da segnalare la partecipazione di 10 laboratori sudamericani (Argentina ed Uruguay). Il numero così elevato di partecipanti è stato determinato da due ordini di fattori: il primo riguarda indubbiamente l'aumentato interesse per le attività di controllo della qualità analitica da parte dei laboratori operanti in campo ambientale; il secondo è costituito dal coinvolgimento di laboratori già aderenti a differenti progetti di ricerca, tutti riguardanti le analisi delle acque.

I risultati di queste intercalibrazioni sono inoltre serviti per mettere a fuoco una serie di problemi analitici, riguardanti ad esempio la determinazione dell'alcalinità

(Serrini *et al.* 1995) ed il confronto fra le determinazioni eseguite in cromatografia ionica e con altre tecniche strumentali (Marchetto *et al.* 1995b).

4.3.2. CERTIFICAZIONE DI CAMPIONI

Un'applicazione particolare degli esercizi interlaboratorio è costituita dalla certificazione delle concentrazioni di particolari ioni o composti in soluzioni di provata stabilità. Questo permette di ottenere campioni di elevata affidabilità analitica, le cui caratteristiche sono certificate dall'Ente organizzatore; fra questi sono importanti il *Bureau Communautaire de Reference* (BCR) in Europa, ed il *National Bureau of Standards* negli Stati Uniti (Caroli 1993; Gallorini & Muntau 1995). L'ente organizzatore si può avvalere per la certificazione di strutture proprie (personale e laboratori), oppure può affidare l'operazione ad un gruppo selezionato di laboratori, di provata esperienza ed affidabilità nel campo. Il BCR utilizza questo secondo tipo di approccio, generalmente affidando la preparazione del campione, le prove di omogeneità e stabilità delle concentrazioni ad un laboratorio, mentre per la certificazione delle concentrazioni viene scelto un gruppo di laboratori di diversi Paesi dell'Unione Europea.

La procedura per la certificazione di un campione prevede dapprima uno studio di fattibilità, su soluzioni opportunamente preparate, per stabilire se sia tecnicamente possibile raggiungere gli obiettivi di stabilità nel tempo delle concentrazioni che costituiscono un requisito indispensabile. In questa fase vengono inoltre esaminati tutti gli aspetti relativi all'uso dei campioni, quali particolari problemi che possono emergere nella pratica di laboratorio. Lo studio di fattibilità serve inoltre al laboratorio organizzante, affiancato da esperti del BCR, per individuare il collettivo di laboratori da coinvolgere nel processo di certificazione. Normalmente si eseguono due o più prove per stabilire l'adeguatezza dei campioni; ciascun esercizio è seguito da una dettagliata discussione dei risultati, considerando le metodologie analitiche utilizzate e tutti gli aspetti sperimentali. Le metodiche analitiche devono essere tali da permettere le determinazioni usando misure fisiche diverse, ad esempio determinazioni spettrofotometriche, potenziometriche e cromatografiche, per una stessa variabile chimica.

L'esito positivo dello studio di fattibilità costituisce la premessa per la vera e propria azione di certificazione. Le analisi vengono ripetute sul campione da certificare, preparato in quantità tale da consentire, dopo le prove necessarie, una disponibilità adeguata alla domanda di campione prevista. Nuovamente i risultati dei diversi laboratori vengono confrontati e discussi, eliminando quelli che presentano il minimo margine di indecisione. L'intera attività viene infine valutata da una commissione del BCR e del laboratorio organizzante, che stabilisce se convalidare le analisi per la certificazione e provvede alla stesura di un rapporto tecnico sul materiale. Questo rapporto fornisce un quadro completo dei risultati e delle metodologie usate dai singoli laboratori, i valori certificati con le relative indeterminazioni, nonché tutte le indicazioni per un corretto uso dei campioni. La decisione positiva comporta la commercializzazione del campione certificato e del relativo rapporto tecnico.

La laboriosità della preparazione, solo in parte riflessa dal prezzo di mercato, e l'intervento di tante competenze, comporta che i campioni certificati non debbano essere considerati come *standard*, benché di elevata qualità. Essi sono piuttosto da

utilizzarsi in momenti particolari dell'attività analitica, quali ad esempio la messa a punto di nuove metodiche, l'esatta calibrazione di uno strumento, il confronto fra le prestazioni di due metodologie analitiche. I campioni certificati possono inoltre essere utilizzati per la calibrazione di *standard* secondari, quali ad esempio soluzioni o campioni naturali opportunamente stabilizzati, da usarsi per più mesi nel laboratorio per le analisi di *routine*.

L'intero processo di certificazione, che si svolge in genere nell'arco di due o tre anni, costituisce un'importante esperienza di lavoro per i laboratori ed il personale che vi partecipa. Esso permette infatti il confronto fra metodologie estremamente diversificate per la misura di uno stesso analita ed il confronto con le procedure usate in altri laboratori, permettendo un esame critico di quanto svolto nel proprio laboratorio.

L'Istituto Italiano di Idrobiologia ha partecipato alla certificazione di tre materiali, costituiti da soluzioni acquose. Il primo (anni 1989-'90) ha riguardato la certificazione di calcio, magnesio, sodio, potassio, solfati, cloruri, fosforo reattivo e totale, alluminio, ferro e manganese in una soluzione acquosa, stabilizzata grazie al valore acido di pH (circa 1). Hanno preso parte all'esercizio 14 laboratori di otto paesi europei. I due campioni, a diverso ordine di concentrazione, sono stati certificati con le sigle CRMs 398 e 399; il relativo rapporto tecnico è stato redatto da Quevauviller *et al.* (1992a); una successiva presentazione è stata fatta da Quevauviller *et al.* (1992b).

Una seconda azione di certificazione ha riguardato le concentrazioni di calcio, magnesio, sodio, potassio, solfati, cloruri e nitrati in campioni sintetici simulanti acque meteoriche. Hanno partecipato alla certificazione 24 laboratori di 10 diversi paesi; i campioni sono stati siglati come CRMs 408 e 409 (Quevauviller *et al.* 1993; Reijnders *et al.* 1994).

Sono state infine certificate le concentrazioni dei nitrati in campioni artificiali di acque superficiali (CRMs 479 e 480), da parte di 15 laboratori di 9 Paesi europei (Quevauviller *et al.* 1996).

5. CONCLUSIONI

Il laboratorio di chimica del C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia svolge la sua attività da 59 anni, essendo stato avviato alla fondazione dell'Istituto, avvenuta nel 1938. Questi anni hanno visto un costante progresso tecnologico, in risposta sia alle nuove e crescenti necessità di ricerca, sia all'evoluzione della strumentazione e delle metodologie analitiche. Per quanto riguarda il primo aspetto, la problematica più estesamente affrontata è stata quella dell'eutrofizzazione, in quanto questa è la forma più diffusa di deterioramento della qualità delle acque lacustri italiane. All'interno di questa problematica la determinazione del fosforo reattivo e, dal 1973, del fosforo totale, ha costituito l'impegno più significativo, sia per le modeste concentrazioni analizzate, spesso al limite di quantificazione dei metodi, che per le esigenze di precisione ed accuratezza. La qualità di questi dati analitici è fondamentale per valutare le differenze fra i processi che si svolgono alle diverse profondità, ma anche per seguire l'evoluzione nel tempo dei livelli medi nell'intero corpo d'acqua. Infatti è generalmente accettato che il fosforo nella maggioranza dei laghi italiani costituisce la variabile che meglio sintetizza il livello trofico delle acque.

Ulteriori impegni analitici sono derivati dagli studi sui metalli pesanti in tracce, anch'essi presenti a livelli di microgrammi per litro. Questa attività ha inoltre messo in evidenza la problematica dei prelievi e del trattamento del campione, in quanto operazioni quali la filtrazione e l'acidificazione sono in grado di influenzare sostanzialmente i risultati.

Gli studi sulla chimica delle deposizioni atmosferiche hanno determinato la necessità di quantificare alcuni ioni a livelli di concentrazioni molto basse; questo è stato possibile solo grazie all'introduzione della cromatografia ionica, avvenuta nel 1984 per gli anioni e nel 1990 per i cationi. Questa metodologia ha inoltre permesso uno studio su formiati ed acetati, composti di notevole interesse per lo studio dei processi che avvengono in atmosfera.

Oltre alle nuove necessità e possibilità di determinazioni analitiche, l'aspetto che si è progressivamente affermato nelle pratiche di laboratorio negli ultimi dieci anni è quello del controllo di qualità. Ovviamente anche in passato esistevano procedure e metodologie formalizzate che guidavano l'esecuzione delle analisi nel laboratorio; tuttavia è solo dalla seconda metà degli anni settanta, con il crescere dell'attenzione per le ricerche ambientali, con l'aumentare di studi coinvolgenti più laboratori e con l'emanazione di leggi nazionali e comunitarie, che si delinea la necessità di un maggiore controllo della qualità analitica.

La capacità di adeguamento del laboratorio è stata pronta e completa, anche alla luce dei numerosi rapporti di collaborazione sempre esistiti con altri Istituti di ricerca. Si ricordano in tal senso gli studi sull'eutrofizzazione promossi dall'OECD (1972÷'78), il Gruppo di Studio per la chimica delle deposizioni atmosferiche nel Nord Italia (1982÷'85), il coordinamento nazionale degli studi sulla chimica delle deposizioni atmosferiche (1988÷'92), le ricerche patrocinate dalla Comunità Europea (1986÷'96). Queste attività hanno richiesto la partecipazione, ed in molti casi l'organizzazione, di numerosi esercizi di intercalibrazione, estremamente utili per mettere a fuoco e risolvere i problemi analitici. Molto formativa è stata anche la partecipazione alla certificazione analitica di soluzioni acquose, svolta in collaborazione con i migliori laboratori europei nell'ambito delle attività del *Bureau Communautaire de Reference* della Comunità Europea. Queste collaborazioni e le diverse e nuove attività di ricerca unite alla più sofisticata strumentazione, hanno determinato la necessità di una maggior formalizzazione delle procedure di analisi, del controllo della qualità analitica e della validazione dei risultati.

Il presente volume costituisce un tentativo di documentare sia l'evoluzione che lo stato attuale delle procedure analitiche nel laboratorio, e va a sostituire un manuale interno in uso ormai da quindici anni, pur con i necessari aggiornamenti avvenuti al variare delle condizioni di lavoro. Questo volume quindi non è stato concepito come manuale per le analisi chimiche ad uso generale, anche se si ritiene che numerosi aspetti delle pratiche adottate nel nostro laboratorio possano avere un interesse più ampio.

In conclusione è opportuno ribadire che il controllo della qualità analitica non è una procedura statica, o un insieme di procedure che si acquisiscono e si introducono nell'uso corrente. Al contrario si tratta di un processo interattivo che richiede la piena partecipazione degli operatori e degli addetti al laboratorio ai diversi livelli. Infatti il controllo della qualità analitica, inteso come il complesso di tutte le operazioni dal prelievo del campione al controllo del dato analitico, una volta acquisito va mantenuto ed aggiornato nel tempo, alla luce delle nuove esigenze di ricerca e dell'evoluzione tecnologica.

RIASSUNTO

Il laboratorio di chimica ha sempre costituito un settore importante nelle attività di ricerca condotte dall'Istituto Italiano di Idrobiologia, sin dalla sua fondazione, nel 1938. Questo volume esamina l'evoluzione dell'attività analitica, nell'arco degli oltre 59 anni trascorsi e fa il punto sulle metodiche e procedure attualmente in uso, ponendo le basi per valutare la confrontabilità dei dati chimici raccolti in diversi periodi su importanti ecosistemi quali i laghi Maggiore, Orta ed i laghi profondi subalpini. Su questi ambienti sono da tempo in corso studi sull'evoluzione delle caratteristiche trofiche, all'interno dei quali gli aspetti chimici sono molto importanti. Studi sull'evoluzione chimica a lungo termine sono inoltre in corso su deposizioni atmosferiche, laghi alpini e corsi d'acqua, in relazione alle problematiche dell'acidificazione e dell'arricchimento di azoto.

Il volume, dopo una introduzione che definisce gli scopi ed i contesti di ricerca all'interno dei quali sono eseguite le misure, si articola in tre parti principali.

Viene dapprima considerato lo sviluppo delle metodologie analitiche e della strumentazione dal 1938 ad oggi, ricostruito puntualmente sulla base di riferimenti pubblicati e di materiale d'archivio, individuando le caratteristiche di precisione e ripetibilità di ciascuna metodica e i momenti di transizione da una metodologia analitica alla successiva. Un ampio spazio è dato in questo capitolo alla strumentazione utilizzata, considerando anche in questo caso le prestazioni dei singoli strumenti.

Una seconda parte del lavoro riguarda le metodiche analitiche attualmente in uso, a cominciare dal pretrattamento e conservazione dei campioni. Per ciascuna variabile considerata vengono esaminati il principio del metodo, il *range* di utilizzo e la ripetibilità, i reagenti e la strumentazione utilizzata, le procedure di calibrazione, la precisione e i principali riferimenti bibliografici. Le procedure di calibrazione sono inoltre esaminate a livello generale per le diverse metodologie di analisi: spettrofotometria ad assorbimento molecolare ed atomico, analisi in flusso continuo e in cromatografia ionica.

L'ultimo capitolo è dedicato ai controlli di qualità analitica, aspetto al quale è data molta importanza nell'attività di routine. Fra i controlli di qualità interni, sono considerati l'uso dei bianchi, di carte di controllo, la valutazione di precisione ed accuratezza, le procedure da seguire nel caso della sostituzione di metodiche analitiche, unitamente ad alcuni aspetti pratici, quali ad esempio la valutazione del numero di cifre significative da attribuire ai risultati e la documentazione delle procedure e dei risultati delle analisi. Sono quindi esaminati i metodi attualmente in uso per il controllo della consistenza interna dei risultati, basati sul controllo del bilancio ionico e sul confronto fra conducibilità misurata e calcolata. Fra i controlli di qualità esterni sono riportate le numerose intercalibrazioni alle quali l'Istituto ha partecipato o ha organizzato, inquadrando nel contesto di ricerca che le ha rese necessarie. Un ulteriore importante momento di confronto con altri laboratori è risultato la partecipazione alla certificazione di soluzioni acquose, nell'ambito delle attività del *Bureau Communautaire de Reference* della Comunità Europea.

Le conclusioni sottolineano la necessità di inserire stabilmente le procedure di controllo di qualità nell'attività analitica quotidiana, cogliendo ogni occasione per criticare e mettere alla prova le procedure adottate.

Analytical methods and quality control in the chemical laboratory of the Istituto Italiano di Idrobiologia (Consiglio Nazionale delle Ricerche)

SUMMARY

The chemical laboratory has always been an important sector in the research activity of the Istituto Italiano di Idrobiologia since its foundation in 1938. This volume examines the work of analysis as it has evolved in the course of these 59 years, and describes the present situation as regards methods and procedures. One of our aims is to evaluate the comparability of chemical data collected at different times in such important ecosystems as Lakes Maggiore, Orta and the deep subalpine lakes; these environments have for many years been the object of studies on the evolution of their trophic characteristics, and the chemical aspect of these studies is most important. Studies on long-term chemical evolution are also in progress on atmo-

spheric depositions, alpine lakes and watercourses, related to problems of acidification and nitrogen enrichment.

After an introduction which defines the aims and the research contexts within which the measurements are performed, the volume is divided into three main sections.

First, the development of analytical methods and instruments from 1938 to the present is described; the reconstruction is based strictly on published references and material from the Institute's archives, and specifies the characteristics of the precision and repeatability of each method, as well as the moments of transition when one analytical method gave way to the next. The instruments used are dealt with fully in this chapter, with descriptions of the performance of individual instruments.

The second part of the volume describes the analytical methods currently in use, starting from the pre-treatment and preservation of the samples. For each variable considered, there is an examination of the principle behind the method, range of use and repeatability, reagents and instruments used, calibration procedures, precision and the major bibliographic references. The calibration procedures are also examined at a general level for the various methods of analysis: molecular and atomic spectrophotometry, flow injection and ion chromatography analysis.

The last chapter is devoted to analytical quality controls, to which great importance is attached during our routine work. We consider here the use of blanks, control charts, evaluation of precision and accuracy, procedures to be followed when the substitution of an analytical method is required, together with some practical aspects such as the evaluation of the number of significant figures to assign to the results, the documentation of the procedures and the results of the analyses. Also described are the methods currently in use for checking the internal consistency of the results, based on ionic balance control and on the comparison between measured and calculated conductivity. As regards external quality controls, mention is made of the numerous intercalibrations which the Institute has participated in or organised, viewing them in the research context which made them necessary. Another important opportunity for comparison with other laboratories is offered by the Institute's participation in the certification of water solutions, under the aegis of the Bureau Communautaire de Reference of the European Community.

The conclusions stress the necessity for making quality control procedures an integral part of routine analytical work, and for taking every opportunity to test and make a critical evaluation of the procedures adopted.

Analytische Methoden und Qualitätskontrollen im chemischen Labor des Istituto Italiano di Idrobiologia (Consiglio Nazionale delle Ricerche)

ZUSAMMENFASSUNG

Das chemische Labor war schon immer ein wichtiger Bestandteil der Forschungsaktivitäten, die vom Istituto Italiano di Idrobiologia, seit seiner Gründung im Jahre 1938, durchgeführt worden sind. Dieser Band untersucht die Entwicklung der analytischen Tätigkeiten, die mehr als die letzten 59 Jahre umfassen, und geht genauer auf die Methodik und Prozeduren ein, die momentan angewendet werden. Eines der Ziele ist die Vergleichbarkeit der chemischen Daten zu bewerten, die in

verschiedenen Perioden aus bedeutenden Ökosystemen, den tiefen subalpinen Seen Lago Maggiore und Lago d'Orta, gesammelt wurden. Über diese Seen laufen derzeit Studien über die Entwicklung der trophischen Charakteristika von denen unter anderen die chemischen Aspekte von großer Bedeutung sind. Außerdem laufen Studien über die chemische Langzeitenentwicklung von atmosphärischen Depositionen, sowie über alpine Seen und Wasserläufe, in Bezug auf die Problematik der Versauerung und der Stickstoffanreicherung.

Nach einer Einführung, in der die Forschungsziele und -zusammenhänge definiert werden gemäß derer die Messungen ausgeführt werden, ist der Band in drei Teile gegliedert:

Zuerst wird die Entwicklung der analytischen Methodik und der Ausrüstung von 1938 bis heute betrachtet, die basierend auf Veröffentlichungen und archivierten Material genau rekonstruiert wird. Dabei wird die Präzision und der Wiederholbarkeit jeder einzelnen Methode definiert und der Zeitpunkt an dem eine analytische Methode von der nächsten ersetzt wurde. Ein großer Teil des Kapitels wird der verwendeten Ausrüstung gewidmet und auch in diesem Fall wird auf die Leistung der einzelnen Instrumente eingegangen.

Der zweite Teil der Arbeit betrifft die analytischen Methoden, die im Augenblick verwendet werden, beginnend bei der Vorbehandlung und Konservierung der Proben. Für jede der behandelten Variablen werden auf die Prinzipien der Methode sowie auf den verwendeten Meßbereich, die Wiederholbarkeit, die Reagenzien, die verwendete Ausrüstung, die Verfahren für die Kalibrierung, die Präzision und auf die wichtigsten Literaturhinweise eingegangen. Darüberhinaus wird auf einem allgemeinen Level auf die Kalibrierungsverfahren für verschiedene Analysemethoden wie Atomabsorptionsspektroskopie, kontinuierliches fließanalyse und Ionenchromatographie eingegangen.

Das letzte Kapitel ist den Qualitätskontrollen in der Analytik gewidmet und dabei wird sehr viel Gewicht auf Routinearbeiten gelegt. Unter den internen Qualitätskontrollen, wird der Gebrauch von Blindproben, qualitätskontrollkarten, die Bewertung von Präzision und Genauigkeit betrachtet, sowie die Verfahren, die befolgt werden müssen, sollte eine analytische Methode durch eine andere ersetzt werden. Dazu kommen einige praktische Aspekte wie zum Beispiel wieviele signifikante Ziffern einem Ergebnis hinzugefügt werden müssen und die Dokumentation der Verfahren und der Analyseergebnisse. Daher wird auf diejenigen Methoden eingegangen, die im Augenblick für die Kontrolle der internen Konsistenz der Ergebnisse verwendet werden, basierend auf der Kontrolle der Ionenbilanz und dem Vergleich zwischen gemessener und berechneter Leitfähigkeit. Unter den externen Qualitätskontrollen werden die zahlreichen Interkalibrationen aufgeführt, an denen das Institut teilgenommen hat oder die es organisiert hat zusammen mit dem Forschungshintergrund der die Interkalibrationen notwendig gemacht hat. Ein überaus wichtiger Augenblick für den Vergleich mit anderen Labors war Teilnahme an der Beurkundung von wässrigen Lösungen, im Bereich der Aktivitäten des Bureau Commaunitaire de Reference der europäischen Gemeinschaft.

Die Folgerungen unterstreichen die Notwendigkeit ständig Verfahren der Qualitätskontrolle bei der Ausführung der täglichen Analytik einzusetzen und jede

Möglichkeit wahrzunehmen die verwendeten Verfahren zu kritisieren und zu prüfen.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i colleghi che hanno operato nel settore analitico fin dai primi anni di attività dell'Istituto, per l'attenzione sempre prestata agli aspetti relativi alla qualità ed alla documentazione delle analisi. Senza il loro impegno gran parte di questo lavoro sarebbe stato impossibile.

Si ringraziano inoltre per la revisione critica del testo R. de Bernardi, A. Calderoni, P. Guilizzoni, S. Pollesello, A. Marchetto e A. Boggero dell'Istituto Italiano di Idrobiologia e G. Tartari del CNR Istituto di Ricerca sulle Acque di Brugherio.

BIBLIOGRAFIA

- A.A.V.V. 1980. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.*, 52: 2242-2249.
- Achilli, M., M. Bianchi & H. Muntau. 1995. *Fogwater intercomparison 1995*. Rapporto CISE S.p.A., Environment Division, Segrate, Italy.
- Ambrosetti, W., L. Barbanti, R. Mosello & A. Pugnetti. 1992. Limnological studies on the deep southern alpine lakes Maggiore, Lugano, Como, Iseo and Garda. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 50: 117-146.
- Ambrosetti, W., L. Barbanti, R. Mosello, A. Rolla & D. Ruggiu. 1983. *Mescolamento, caratteristiche chimiche, fitoplancton e situazione trofica nei laghi profondi subalpini*. C.N.R. Collana del Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'Ambiente", AQ/2/20, 151 pp.
- Analytical Methods Committee. 1987. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112: 199-204.
- Analytical Methods Committee. 1994. Is my calibration linear? *Analyst*, 119: 2363-2366.
- A.P.H.A., A.W.W.A. 1936. *Standard methods for the examination of water, Sewage and industrial wastes*. Am. Publ. Health Ass., New York.
- A.P.H.A., A.W.W.A., F.I.S.I.W.A. 1955. *Standard methods for the examination of water, Sewage and industrial wastes*. Am. Publ. Health Ass., New York: 522 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1960. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., New York: 626 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1971. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., New York: 874 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1976. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., Washington: 1193 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1981. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., Washington: 1134 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1985. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health Ass., Washington: 1268 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Amer. Publ. Health Ass., Washington.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Amer. Publ. Health Ass., Washington.
- A.S.T.M. 1984. Water. Anions in water by ion chromatography. In: *Annual book of A.S.T.M. standards*. Vol. II: 4327-4384.
- Armocida, G. 1988. *L'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco De Marchi. Cinquanta anni di ricerche. Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 16: 115 pp.
- Baldi, E. 1947. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto dalla fondazione (1939) al 1946. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 3: 1-15.

- Baldi, E. 1949a. Alcuni caratteri generali dei laghi marginali subalpini. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 10: 50-69.
- Baldi, E. 1949b. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto negli anni 1947-48. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 5: 1-19.
- Baldi, E. 1949c. Il Lago d'Orta, suo declino biologico e condizioni attuali. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 5: 145-188.
- Baldi, E. 1951. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto negli anni 1949-1950. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 6: 1-28.
- Baldi E., L. L. Cavalli & L. Pirocchi. 1947b. Ulteriori ricerche sulla distribuzione spaziale del mesoplankton pelagico in un grande lago oligotrofo. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 3: 121-149.
- Baldi, E., L. Pirocchi & V. Tonolli 1947a. *Relazione preliminare sulle ricerche idrobiologiche e limnologiche nelle acque del Lago di Como*. Mimeo Istituto Italiano di Idrobiologia: 42 pp.
- Baldi, E., L. Pirocchi & V. Tonolli 1949. *Relazione preliminare sulle ricerche idrobiologiche condotte sul Lago di Lugano (1946-1947)*. Ispettorato Federale Svizzero per la Pesca, Berna.
- Baldi, E., V. Tonolli & L. Tonolli Pirocchi. 1953. La differente evoluzione di due laghi già costituenti un unico bacino: il Lago Maggiore e il Lago di Mergozzo. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 7: 49-107.
- Barbanti, L., R. Mosello, A. Pugnetti & D. Ruggiu 1986. La limnologia del Lario: dai primi studi alle ricerche attuali. Atti Simposio *Risanamento del Lago di Como: la ricerca scientifica*, Como, 25 Ottobre 1986.
- Barbieri, A. & R. Mosello. 1992. Chemistry and trophic evolution of Lago di Lugano in relation to nutrient budget. *Aquatic Sciences*, 54: 219-237.
- Baudo, R., G. Galanti, P. Guilizzoni & P.G. Varini. 1979a. Determinazione dei metalli pesanti in tessuti vegetali: Metodologia analitica. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 37: 111-119.
- Baudo, R., G. Galanti, P. Guilizzoni & P.G. Varini. 1979b. Relationships between heavy metals and aquatic organisms in Lake Mezzola hydrographic system (Northern Italy). I. Hydrochemistry. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 37: 163-185.
- Benoiel, M. J. 1994. Sample storage for inorganic compounds in surface waters- a review. In proc. Workshop on trends in surface water analysis. Lisbon, 23-25 January 1994. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 57: 197-206.
- Bilonick, A.R. & D.G. Nichols. 1983. Temporal variations in acid precipitation over New York State - What the 1965-1979 U.S.G.S. data reveal. *Atmosph. Environ.*, 17: 1063-1072.
- Blakar, J.A. & J. Digernes. 1984. Evaluation of acidification based on former colorimetric determination of pH: the effect of indicators on pH in poorly buffered water. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 22: 679-685.
- Bonacina, C. 1970. Il Lago d'Orta: ulteriore evoluzione della situazione chimica e della struttura della biocenosi planctonica. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 26: 141-204.
- Bonomi, G. 1968. Le acque lacustri dell'Italia settentrionale: la situazione attuale dei grandi laghi prealpini. In: *Il problema delle acque in Italia. Part II*. FAST, Milano, 5-7 luglio 1967: 23-105.
- Bonomi, G. & M. Gerletti. 1967. Il Lago d'Isèo: primo quadro limnologico generale (termica, chimica, plancton e benton profondo). *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 22: 149-145.
- Bonomi, G., A. Calderoni & R. Mosello. 1977. Some remarks on the recent evolution of the deep Italian subalpine lakes. *Symp. Biol. Hung.*, 19: 87-111.
- Bonomi, G., M. Gerletti, E. Indri & L. Tonolli. 1970. Report on Lake Maggiore. In: *Large Lakes and Impoundments*. O.C.S.E. Symposium, Uppsala, 13-16 May 1968: 299-341.
- Bossolasco, M. & G. Cicconi. 1961. Vergleichende untersuchungen über die chemische zusammensetzung der luft und der niederschlags. *Zeit. Geofisica Pura e Applicata*, (Proc. Forth Int. Symp. on Condensation Nuclei, Frankfurt/M-Heidelberg, May 1961), 50: 3-15.
- Britton, H.T.S. 1934. *Conductometric analysis*. Chapman & Hall, London.
- Calaresu, G. 1994. *Buone pratiche di laboratorio nei laboratori di analisi*. Società Editoriale Farmaceutica, Milano: 189 pp.
- Calderoni, A. & R. Mosello 1976. Apporti chimici al Lago Maggiore attraverso il Fiume Toce. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 33: 125-159.

- Calderoni, A., R. Mosello & R. de Bernardi. 1994. Recovery of Lago d'Orta by liming. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 25: 2016-2020.
- Calderoni, A., R. Mosello & A. Quirici. 1991. Chemical response of Lake Orta (Northern Italy) to liming. 1991. *Arch. Hydrobiol.* 4: 421-439.
- Caroli, S. 1993. Certified reference materials. Use, manufacture and certification. *Analytica Chimica Acta*. 283: 573-582.
- Corbella, C., N. Della Croce & O. Ravera. 1956. Plancton, benton e chimismo delle acque e dei sedimenti in un lago profondo (Lago Maggiore). *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 9: 125-262.
- Corbella, C., V. Tonolli & L. Tonolli Pirocchi. 1958. I sedimenti del Lago d'Orta, testimoni di una disastrosa inquinazione cupro-ammoniacale. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 10: 9-52
- Cowling, E.B. 1982. A historical resumé of progress in scientific and public understanding of acid precipitation and its consequences. *Envir. Sci. Technol.*, 16: 110A-123A.
- D'Elia, C.F., P.A. Stendler & N. Corwin. 1977. Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *Limnol. Oceanogr.*, 22: 760-764.
- Decet F. & R. Mosello. 1994. Le indagini chimiche sulle piogge in Europa tra '700 e '800. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 49: 47 pp.
- Denney, R. C. & R. Sinclair. 1987. Visible and Ultraviolet Spectroscopy. ACOI, Thames Polytechnic. London: 197 pp.
- de Bernardi, R & L. Nobili. 1989. Bibliographic references from 1900 to 1988 on scientific and technical aspects concerning Lago Maggiore. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 46: 287-324.
- de Bernardi, R. & D. Ruggiu. 1989. Lago Maggiore. In: H. Sas (Coord.). Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, Experiences, Extrapolations. *Acad. Verlag Richarz*: 463-480.
- de Bernardi, R., G. Giussani & E. Grimaldi. 1984. Lago Maggiore. In: F. B. Taub (Ed.): *Lakes and Reservoirs*, Elsevier, Amsterdam: 247-266.
- de Bernardi, R., G. Giussani, M. Manca & D. Ruggiu 1988. Long-term dynamics of plankton communities in Lago Maggiore (N. Italy). *Verh. int. Ver. Limnol.*, 23: 729-733.
- Della Lucia, M., A. Marchetto, M. Mosello & G.A. Tartari. 1996. Studies on a chemical gradient of atmospheric deposition from the Po Valley to the Alps. *Water Air Soil pollution*, 87: 171-187.
- De Giuli, E. 1979. *Apporti chimici al Lago Maggiore attraverso i principali tributari (fiumi Ticino immissario, Maggia, Toce, Bardello, Tresa) ed uscite attraverso il Ticino emissario nel 1978*. Tesi, Facoltà di Scienze Università di Milano: 104 pp.
- Dorschel, C.A., J.L. Ekmanis, J.E. Oberholtzer, F.V. Warren & B.A. Bidlingmeyer. 1989. LC detectors: evaluation and practical implications of linearity. *Anal. Chem.*, 61: 951A-968A.
- Durst, R.A., W. Davison, K. Toth, J. E. Rothert, M. E. Peden & B. Griepink. I.U.P.A.C. 1991. Analysis of wet deposition (acid rain): determination of the major anionic constituents by ion chromatography. *Pure & Appl. Chem.*, 63: 907-915.
- E.A.W.A.G. 1964. *Schweiz Lebensmittelbuch*, IV ed., Auflage S. 203. Zurigo 1964.
- Ellis, M.M., B.A. Westfall & M.D. Ellis. 1948. *Determination of water quality*. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, Research rep. 9: 122 pp.
- EMEP. 1996. *EMEP manual for sampling and chemical analysis*. Norwegian Institute for Air Research. Kjeller, Norway.
- Environmental Protection Agency (E.P.A.). 1981. *Quality Assurance Handbook for Air Pollution Measurement Systems: Volume V. Manual for precipitation Measurement Systems*. EPA-600/4-82- 042a.
- E.P.A. 1986a. Method 300.6. Chloride, orthophosphate, nitrate and sulphate in wet deposition by chemical suppressed ion chromatography.
- E.P.A. 1986b. Method 300.7. Dissolved sodium, ammonium, potassium, magnesium and calcium in wet deposition by chemical suppressed ion chromatography.
- E.P.A. 1991. Method 300.0. Test method: the determination of inorganic anions in water by ion chromatography.
- Eriksson, E. 1952a. Composition of atmospheric precipitation. Part I. Nitrogen compounds. *Tellus*, 4: 280-303.
- Eriksson, E. 1952b. Composition of atmospheric precipitation. II. Sulfur, chloride, iodine compounds. Bibliography. *Tellus*, 4: 280-303.

- Eriksson, E. 1959. The early circulation of chloride and sulphur in nature: meteorological, geochemical and pedological implications. Part I. *Tellus*, 11: 375-403.
- Eriksson, E. 1960. The early circulation of chloride and sulphur in nature: meteorological, geochemical and pedological implications. Part II. *Tellus*, 12: 63-109.
- Ferrari, C. 1948. *Ricerche sul Lago d'Orta*. Tesi Facoltà di Scienze, Università di Milano: 93 pp.
- Fresenius W. & K.E. Quentin. 1988. *Water Analysis*. W. Schneider (Ed). Springer-Verlag Berlin: 804 pp.
- Fricke, H.J. 1980. *OECD eutrophication programme. Regional project Alpine lakes*. Swiss Federal Board for Environmental Protection, Bern: 234 pp.
- Fritz, S., D. T. Gjerde & C. Pohlandt. 1982. *Ion chromatography*. Hüthig, Heidelberg, Germany: 203 pp.
- Gallorini, M & H. Muntau. 1995. Materiali di riferimento e analisi di elementi in traccia. *Ann. Ist. Super. Sanità*. 31 (2): 255-259.
- Galloway J. N., B. J. Cosby & G. E. Likens. 1979. Acid precipitation: measurement of pH and acidity. *Limnol. Oceanogr.*, 24 (6): 1161-1165.
- Garfield, F.M. 1991. *Quality assurance principles for analytical laboratories*. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA: 196 pp.
- Garibaldi, L., C. Brizzio, V. Mezzanotte, A. Varallo & R. Mosello. 1995. The continuing evolution of Lake Iseo (N. Italy): the appearance of anoxia. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 53: 191-212.
- Gerletti, M. 1974. *Indagini sul Lago di Garda*. Quaderni I.R.S.A., 18: 540 pp.
- Golterman, H.L. (Ed.). 1969. *Methods for chemical analysis of water*. I.B.P. Handbook, 8. Blackwell Sci. Publ., Oxford: 172 pp.
- Golterman, H.L., R.S. Clymo & M.A.M. Ohnstand. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. I.B.P. Handbook No. 8, Blackwell, Oxford: 213 pp.
- Gran, G. 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titration II. *Analyst* 77: 661-671.
- Grant, T.W. 1985. *Use of statistics to develop and evaluate analytical methods*. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA: 183 pp.
- Grasshoff K. & H. Johannsen. 1972. A new sensitive and direct method for the determination of ammonia in sea water. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 34: 516-521.
- Green, J.M. 1996. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, 68: 305A-309A.
- Griepink, B. 1992. Quality assurance and validation of results. In: M. Stoeppler (Ed.), *Hazardous metals in the environment*. Elsevier, Amsterdam: 517-534.
- Grimaldi, E. 1980. Water pollution and reclamation priorities in Northern Italy. *Water Quality Bul.* 5: 70-74
- Haines, T. 1981. Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems: a review. *Trans. am. Fish. Soc.*, 110: 669-707.
- Henriksen, A. 1982. Alkalinity and acid precipitation research. *Vatten*, 38: 82-85.
- Henriksen, A. & K. Balmer. 1977. Sampling, preservation and storage of water samples for analysis of metals. *Vatten*, 1: 33-38.
- Hovind, H. 1988. Intercalibration 8802. pH, k_{25} , HCO_3 , NO_3 , NO_2 , Cl, SO_4 , Ca, Mg, Na, K. NIVA Report 0-81014-02, Oslo: 40pp.
- Hovind, H. 1989. Intercalibration 8903 Dissolved organic carbon, and aluminium fractions. NIVA Rep. 86001, Oslo: 27pp.
- Hovind, H. 1990. Intercalibration 9004. pH and alkalinity. NIVA Report 86001, Oslo, 37 pp.
- Hovind, H. 1991. Intercalibration 9105. pH, k_{25} , HCO_3 , NO_3 + NO_2 , Cl, SO_4 , Ca, Mg, Na, K and TOC. NIVA Report 86001, Oslo: 43 pp.
- Hovind, H. 1992. Intercalibration 9206. pH, conductivity, alkalinity, nitrate+nitrite, chloride, sulphate, calcium, magnesium, sodium, potassium, aluminium, and dissolved organic carbon. NIVA Report, ISBN 82-577-2164-6, Oslo: 70 pp.
- Hovind, H. 1993. Intercalibration 9307. pH, conductivity, alkalinity, nitrate+nitrite, chloride, sulphate, calcium, magnesium, sodium, potassium, total aluminium, reactive and non-labile aluminium, TOC and COD-Mn. NIVA Report, ISBN 82-577-2370-3, Oslo: 50 pp.

- Hovind, H. 1994. *Intercalibration 9408. pH, conductivity, alkalinity, nitrate+nitrite, chloride, sulphate, calcium, magnesium, sodium, potassium, total aluminium, TOC and DOC*. NIVA Report, ISBN 82-577-2616-8, Oslo: 74 pp.
- Hovind, H. 1995. *Intercalibration 9509. pH, conductivity, alkalinity, nitrate+nitrite, chloride, sulphate, calcium, magnesium, sodium, potassium, total aluminium, aluminium-reactive and nonlabile, TOC and COD-Mn*. NIVA Report, ISBN 82-577-2849-7, Oslo: 58 pp.
- Hovind, H. 1996. *Intercalibration 9610. pH, conductivity, alkalinity, nitrate+nitrite, chloride, sulphate, calcium, magnesium, sodium, potassium, total aluminium, aluminium-reactive and nonlabile, TOC and COD-Mn*. NIVA Report, ISBN 82-577-3099-8, Oslo: 54 pp.
- International Standard Organization. 1982. *General requirements for the technical competence of testing laboratories*. ISO-guide 25: 46 pp.
- International Standard Organization. 1986. *Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for standard test method by inter-laboratory tests*. ISO Report 5725-1986 (E): 49 pp.
- I.R.S.A. 1976. Solfati. In: C.N.R. Metodi analitici per le acque. *Quaderni IRSA*, 11: 12 pp.
- I.R.S.A., C.N.R. 1994. *Metodi analitici per le acque*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. Roma: 342 pp.
- I.S.O. 5725. 1986. *Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*. UDC 519.248:620.1: 48 pp.
- IUPAC. 1991. Analysis of wet deposition (acid rain): determination of the major anionic constituents by ion chromatography. *Pure & Appl. Chem.*, 63: 907-915.
- Koroleff, F. 1970. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. In: *Information on techniques and methods for sea water analyses*. I.C.E.S. (Int. Council Explor. Sea), Interlaboratory rep. 3: 19-22.
- Kramer, K. J. M. 1994. Inorganic contaminant in the water column: sampling and sampling strategy. In proc. Workshop on trends in surface water analysis. Lisbon, 23-25 January 1994. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 57: 179-188.
- Kramer J. R., A. W. Andren, R. A. Smith, A. H. Johnson, R. B. Alexander & G. Oehlert. 1986. Stream and lakes. In: *Acid deposition: long term trends*. National Academy Press. Washington, D. C.: 231-299.
- Linnet, N. 1970. *pH measurements in theory and practice*. Radiometer A/C, Copenhagen: 188 pp.
- Maldura, C. 1929. La misura della concentrazione idrogenionica nelle acque. *Boll. Pesca Pisc. Idrobiol.*, 5: 482-491.
- Manca, M., A. Calderoni & R. Mosello. 1992. Limnological research in Lago Maggiore: studies on hydrochemistry and plankton. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 50: 171-200.
- Marchetto, A., R. Mosello, R. Psenner, A. Barbieri, G. Bendetta, D. Tait & G.A. Tartari. 1994. Evaluation of the level of acidification and the critical loads for Alpine lakes. *Ambio*, 23: 150-154.
- Marchetto, A., R. Mosello, R. Psenner, G. Bendetta, A. Boggero, D. Tait & G.A. Tartari. 1995a. Factors affecting water chemistry of alpine lakes. *Aquatic Sciences*, 55: 81-89.
- Marchetto, A., R. Mosello, G.A. Tartari, H. Muntau, M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G. Serrini & G. Serrini Lanza. 1995b. The precision of IC analyses compared with that of other analytical techniques through intercomparison exercises. *J. Chromatogr. A*, 706: 13-19.
- Marchetto, A., M. Bianchi, H. Geiss, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini-Lanza, G.A. Tartari & R. Mosello. 1997. Performances of analytical methods for freshwater analysis assayed through intercomparison exercises. I. Total alkalinity. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 56: 1-13.
- Mentasti, E. & E. Pellizzetti. 1975. Kinetic spectrophotometric determination of chloride and bromide at low concentrations. *Anal. Chim. Acta*, 78: 227-230.
- Menzel, D.W. & N. Corwin. 1965. The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 280-282.
- Meckeret, F. J. H. 1955. Ion-exchange procedures for the examination of (I) total ionic concentration, (II) chlorides and (III) sulphates in natural waters. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, Communication n° 4.

- McQuarner N. R., P. D. Kluckner & D. K. Sandelberg. 1983. Chemical analysis of acid precipitation: pH and acidity determinations. *Environ. Sci. Technol.* 17: 431-435.
- Midgley, D. & R. L. Parker. 1989. Non-linear of calibration in the determination of anions by ion-cromatography with suppressed conductivity detection. *Talanta*, 36: 1277-1283.
- Miles, L.J. & K.J. Yost. 1982. Quality analysis of USGS precipitation chemistry data for New York. *Atmospheric Environ.*, 16: 2889-2898.
- Minoia, C. & S. Caroli. 1989. Applicazioni dell'ETA-AAS Zeeman nel laboratorio chimico e tossicologico. Vol. 1: *Acque, alimenti, ambiente*. Libreria Cortina, Padova: 367 pp.
- Migley, D. & K. Torrance. 1978. *Potentiometric water analysis*. Wiley and Sons, Chichester: 409 pp.
- Molvaersmyr, K. & W. Lund. 1983. Acid and bases in fresh-water: interpretation of results from Gran plot. *Water Res.*, 17 (3): 303-307.
- Mosello, R. 1973. *Il carico chimico convogliato dal Fiume Toce al Lago Maggiore*. Tesi Facoltà di Scienze, Università di Milano: 99 pp.
- Mosello, R. 1986. Effects of acid deposition on subalpine and Alpine lakes in NW Italy. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 44: 117-146.
- Mosello, R. 1988. The trophic evolution of Lake Maggiore as indicated by water chemistry and nutrient loads. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 46: 69-87.
- Mosello, R. 1993. Rapporto sull'attività della rete RIDEF nel quinquennio 1988-92. RIDEF n. 13. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, 44: 118 pp.
- Mosello, R. & A. Calderoni. 1990. Pollution and recovery of Lake Orta (N. Italy). In: Giesy, J.P., R. Baudo & H. Muntau (Eds), *Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants*. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI., USA: 349-363.
- Mosello, R. & A. Marchetto. 1995. Chemistry of atmospheric deposition in Italy: results from a five year study. *Ambio*, 25: 21-25.
- Mosello, R. & L. Morselli. 1992. Situazione degli studi sulla chimica delle deposizioni atmosferiche umide nel 1989 in Italia. RIDEF n. 5. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, 33: 40 pp.
- Mosello, R. & G. Tartari. 1982. Chemistry of the precipitation in the L. Maggiore watershed (N. Italy). *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 40: 163-180.
- Mosello, R. & G.A. Tartari. 1992. Formiate and acetate in wet deposition at Pallanza (NW Italy) in relation to major ion concentrations. *Water Air Soil Poll.*, 63: 397-409.
- Mosello, R. & B. M. Wathne. 1995. Conclusions. Water chemistry. In: Wathne, B.M. & S. Patrick (Eds). *AL:PE - Acidification of Mountain Lakes: Paleolimnology and Ecology*. Part 1: April 1991-April 1993. Ecosystem Res. Rep., European Commission, Rep. EUR 16129 EN: 80-85.
- Mosello, R., R. Baudo & G.A. Tartari. 1986. Metal concentrations in a highly acidic lake: L. Orta (Northern Italy). *Mem. Ist. ital. Idrobiol.* 44: 73-96.
- Mosello, R., A. Calderoni & R. de Bernardi. 1990a. Mass budget as a tool for predicting the response to liming of the acidified, ammonium polluted L. Orta. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 24: 1044-1048.
- Mosello, R., A. Calderoni & E. De Giuli. 1981. Bilancio chimico del Lago Maggiore nel 1978. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 39: 7-29.
- Mosello R, A. Calderoni & G.A. Tartari. 1989a. pH-Related variations in trace metal concentrations in Lake Orta (Italy). *The Science of the Total Environment*, 87/88: 255-268.
- Mosello, R., A. Marchetto & F. Decet. 1993b. Chemistry of atmospheric deposition and freshwater acidification: the Italian research. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 50: 417-455.
- Mosello, R., A. Marchetto & G.A. Tartari. 1988. Long-term changes in the chemistry of bulk deposition at Pallanza (N.W. Italy). 3rd International Conference, *Environmental Contamination*, Venice, 26-29 September 1988: 233-235.
- Mosello, R., A. Marchetto & G.A. Tartari. 1989c. Trends in the chemistry of atmospheric deposition at subalpine and Alpine sites in Northern Italy. Proc. W.M.O. Technical Conference Monitoring and Assessment of Changing Composition of the Troposphere, Sofia, Bulgaria, 23-27 October 1989: 33-36.
- Mosello, R., A. Marchetto & G.A. Tartari. 1989d. Trends in chemistry of a subalpine river (R. Cannobino, NW Italy) compared with atmospheric deposition. Proc. Workshop *Convention on long range transboundary air pollution*, Espoo, Finland, 3-5 October 1988: 51-60.

- Mosello, R., G. Tartari & G.A. Tartari. 1985. Chemistry of bulk deposition at Pallanza (N. Italy) during the decade 1975-1984. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 43: 311-322.
- Mosello, R., B.M. Wathne & G. Giussani (Eds.). 1992a. Limnology on groups of remote lakes: ongoing and planned activities. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, 32: 128 pp.
- Mosello, R., A. Marchetto, G.A. Tartari & L. Guzzi. 1991b. Susceptibility to acidification of Italian lakes with emphasis on Alpine lakes. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 49: 63-78.
- Mosello, R., H. Muntau, G. Serrini & A. Marchetto. 1995b. Intercomparison exercises performed in the framework of the AL:PE 1 research project. In: Wathne, B.M. & S. Patrick (Eds). *AL:PE - Acidification of Mountain Lakes: Paleolimnology and Ecology*. Part 1: April 1991-April 1993. Ecosystem Res. Rep., European Commission, Rep. EUR 16129 EN: 262-272.
- Mosello, R., D. Ruggiu, A. Pugnetti & M. Moretti. 1991a. Observed trends in the trophic conditions and possible recovery of the deep subalpine Lake Como (Italy). *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 49: 79-97.
- Mosello, R., R. Baudo, G. Tartari, M. Camusso, G. Marengo & H. Muntau. 1987. Prime esperienze di intercalibrazione del Gruppo Informale di Limnologia: analisi chimiche. *Atti VII Congresso A.I.O.L.*, Trieste, 11-14 Giugno 1986: 373-384.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, H. Muntau & G. Serrini. 1990c. Intercalibrazione RIDEF 1/89. RIDEF n. 2. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 24: 43 pp.
- Mosello, R., A. Barbieri, P. Mandrioli, G. Righetti, C. Sabbioni, G. Tartari & G.A. Tartari. 1984. Relazioni fra alcune variabili chimiche nelle acque di pioggia e loro uso nella verifica dei risultati analitici. *Atti delle Giornate di Studio SEP/Pollution 1984*: 115-123.
- Mosello, R., R. Baudo, G. Tartari, G. Serrini, H. Muntau, A. Novo & M. Maspero. 1990b. Metodologie e controlli di qualità per lo studio della chimica delle deposizioni atmosferiche in Italia. RIDEF n. 1. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 23: 56 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1993a. *AQUACON-MedBas Subproject 6: Acid rain analysis. Results of the second interlaboratory exercise*. Environment Institute, JRC Report, Commission of the European Communities, Ispra: 50 pp.
- Mosello R., A. Barbieri, G. Bendetta, A. Boggero, A. Marchetto, R. Psenner, D. Tait & G. A. Tartari. 1993d. Quantification of the susceptibility of alpine lakes to acidification. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 52: 355-386.
- Mosello, R., R. Baudo, G. Tartari, M. Camusso, G. Marengo, H. Muntau, A. Barbieri & G. Righetti. 1989b. Potenzialità e limiti delle intercalibrazioni chimiche in campo limnologico. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 18: 95pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini Lanza & G.A. Tartari. 1992b. Intercomparison 1/91. RIDEF n. 6. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 35: 48 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1992c. *AQUACON-MedBas Subproject 6: Acid rain analysis. Results of the first interlaboratory exercise*. Environment Institute, JRC Report, Commission of the European Communities, Ispra: 26 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini Lanza & G.A. Tartari. 1993c. Intercomparison 1/92. RIDEF n. 10. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 40: 49 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1994a. *AQUACON-MedBas Subproject 6: Acid rain analysis. Results of the third interlaboratory exercise*. Environment Institute, JRC Report, Commission of the European Communities, Ispra: 57 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1994b. *AQUACON-MedBas Subproject N°6. Acid rain analysis. Intercomparison 1/93*. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.* 47: 36 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1995a. *AQUACON-MedBas Subproject N° 6. Acid rain analysis. Intercomparison 1/94*. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 54: 44 pp.
- Mosello, R., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, G.A. Tartari, G. Serrini, G. Serrini Lanza & H. Muntau. 1996. *AQUACON-MedBas Subproject N° 6. Acid rain analy-*

- sis. Intercomparison 1/95. Environment Institute, JRC Report, Commission of the European Communities, Ispra, Rep. EUR 16425 EN: 50 pp.
- Mulik, J. D. & E. Sawicki. 1979. *Ion chromatographic analysis of environmental pollutants*. Vol. 2 Ann Arbor Science Publishers Inc. Ann Arbor, Michigan: 435 pp.
- Muntau, H., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, G. Serrini, G. Serrini Lanza, G. A. Tartari & R. Mosello. 1994. Il progetto AQACON-MedBas: valutazione, verifica e controllo della qualità analitica nei paesi del Mediterraneo. *Boll. Chim. Igien.*, 45: 453-461.
- Novo A. 1987. Deposizioni atmosferiche nel Nord Italia. Rapporto finale anni 1983-1984. *Quaderni Ing. Ambientale*, 6: 63 pp.
- O.E.C.D. 1968. *Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to phosphorus and nitrogen as factors in eutrophication*. OECD Technical Report DAS/CSI/68.27. Revised 1971: 159 pp.
- O.E.C.D. 1982. *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control*. O.E.C.D., Paris: 154 pp.
- Odèn, S. 1976. The acidity problem - an outline of concepts. *Wat. Air Soil Pollut.*, 6: 137-166.
- Perkin Elmer. 1971. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. Norwalk, Connecticut, USA.
- Perkin Elmer. 1976. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. Norwalk, Connecticut, USA.
- Perkin Elmer. 1980. *Analytical Methods for furnace atomic absorption spectroscopy*. Norwalk, Connecticut, USA.
- Perkin Elmer. 1982. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy* (supplement to 1976 edition). Norwalk, Connecticut, U.S.A.
- Picotti, M. 1963. La composizione chimica delle precipitazioni atmosferiche di alcune stazioni italiane. *Atti XIII Convegno Ass. Geof. ital.*, Roma, 21-23 Novembre: 69-80.
- Pirocchi, L. 1947. Struttura e vicende delle biocenosi mesoplanctoniche del Lago Maggiore. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 3: 57-119.
- Piangerelli, V., F. Nerini, S. Cavalli, C. Reschiotto & R. Draisci. 1995. Determinazione rapida IC di cationi del I e II gruppo. *Laboratorio 2000*. 9-3; 34-40.
- Proctor, G.M. & D.W. Hood. 1954. Determination of inorganic phosphate in the sea water by an iso-butanol extraction procedure. *J. Mar. Res.*, 13: 122-132.
- Prudnikov, E. D. & Y. S. Shapkina. 1984. Random errors in analytical methods. *Analyst*, 109: 305-307.
- Quevauviller, Ph. & E. A. Maier. 1994. Trends in surface water analysis. Conclusions of the Workshop. In proc. Workshop on trends in surface water analysis. Lisbon, 23-25 January 1994. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 57: 255-262.
- Quevauviller, Ph., K. Vercoetere & B. Griepink. 1992b. Certified Reference Materials (CRMs 398 and 399) for the Quality Control of major element in freshwater. *Mikrochimica Acta* 108: 195-204.
- Quevauviller, Ph., K. Vercoetere, D. Bousfield & B. Griepink. 1992a. *The certification of the contents (mass fractions) of Al, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and S in freshwater. Low element content CRM 398. High element content CRM 399*. Commission European Communities, BCR information. Report EUR 14062 EN: 64 pp.
- Quevauviller, Ph, D. van Renterghem, B. Griepink, H.F.R. Reijnders & H. van der Jagt. 1993. *The certification of the contents (amount of substance contents) of ammonium, calcium, chloride, hydronium, magnesium, nitrate, potassium, sodium and sulphate in simulated rainwater. Low content CRM 408, high content CRM 409*. BCR information. report EUR 15024 EN: 85 pp.
- Quevauviller, Ph., M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, J. Cosano & R. Mosello. 1996. Certified reference materials (CRMs 479 and 480) for the quality control of nitrate determination in freshwater. *Analyst*, 121: 83-88.
- Reed, A. H., R. J. Henry & W. B. Mason. 1971. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clinical Chemistry*, 17 (4): 275-284.
- Reijnders, H.F.R., P. Quevauviller, D. Van Renterghem, B. Griepink & H. van der Jagt. 1994. Certified reference materials (CRM 408 and 409) for quality control of main components

- (ammonium, calcium, hydronium, magnesium, nitrate, potassium, sodium and sulphate) in simulated rain water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348: 439-444.
- Riehm, H., E. Quellmalz & M. Kraus. 1965. Ergebnisse atmosphaerisch-chemischer Untersuchungen in Mitteleuropa. *Zschr. biol. Aerosol-Forsch.*, 12: 43-454.
- Rider, B. F. & M. G. Mellon. 1946. *Colorimetric determination of nitrites*. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 18: 96.
- Rodier, J. 1971. *L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau*. Dunod, Paris: 700 pp.
- Rodier, J. 1984. *L'analyse de l'eau*. Dunod, Paris: 1365 pp.
- Rowland, A. P., C. Woods & V. H. Kennedy. 1995. Control of errors in anion chromatography applied to environmental research. *J. Chromatography A*, 706: 229-239.
- Ruggiu, D. & R. Mosello. 1984. Nutrient levels and phytoplankton characteristics in the deep southern alpine lakes. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 22: 1106-1112
- Ruggiu, D., M. Manca, P. Guilizzoni, R. Mosello & R. de Bernardi 1988. Studi sullo stato trofico e sulla evoluzione trofica dei laghi. *Acqua-Aria*, 20: 39-51.
- Ruzicka, J. & E.H. Handersen. 1988. *Flow Injection Analysis*. Wiley Interscience, New York.
- Sawicki, E., J. D. Mulik & E. Wittgenstein. 1978. *Ion chromatographic analysis of environmental pollutants*. Vol. 1. Ann Arbor Science Publishers Inc. Ann Arbor, Michigan: 210 pp.
- Saini, G. & A. Liberti. 1980. *Chimica analitica*. UTET, Torino: 814 pp.
- Schaug, J. 1988. *Quality assurance plan for EMEP. EMEP/CC - Report 1/88*. Norwegian Institute Air Research, Lillestrom. Norway: 31 pp.
- Serrini, G., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, R. Mosello & H. Muntau 1990. Intercalibrazione RIDEP 1/90. RIDEP n. 3. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 27: 41 pp.
- Serrini G., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, R. Mosello, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini Lanza & G.A. Tartari. 1992. Intercalibrazione 1/91. RIDEP n. 7. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 36: 49 pp.
- Serrini G., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, R. Mosello, H. Muntau, G. Serrini Lanza & G.A. Tartari. 1993. Intercalibrazione 1/92. RIDEP n. 9. *Documenta Ist. ital. Idrobiol.*, 39: 51 pp.
- Serrini, G., M. Bianchi, H. Geiss, A. Marchetto, L. Morselli, H. Muntau, G. Serrini Lanza, G.A. Tartari & R. Mosello 1995. Problemi e metodi nella determinazione dell'alcalinità. *Acqua Aria*. 4: 27-36
- Slavin, W. 1969. *Spettroscopia di assorbimento atomico*. ETAS Kompass, Milano: 312 pp.
- Steiner, E. H. 1975. Planning and analysis of results of collaborative tests. In: *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington. USA: 88 pp.
- Strickland, J.D.H. & T.R. Parson. 1968. *A practical handbook for seawater analysis*. Bull. Fish. Res. Board Canada, Ottawa.
- Stumm, W. & J.J. Morgan. 1981. *Aquatic chemistry*. Wiley and Sons, New York. 780 pp.
- Tartari, G. 1980. *Idrochimica e bilancio chimico del Lago di Mergozzo*. Tesi Facoltà di Scienze, Università di Milano: 147 pp.
- Tartari, G. & R. Mosello. 1984. Caratteristiche idrochimiche delle precipitazioni dell'Italia Settentrionale: necessità e problemi connessi all'installazione di una estesa rete di rilevamento. *Atti delle Giornate di Studio SEP/Pollution 1984*: 347-366.
- Tartari, G. 1987. Deposizioni acide. Appunti sulla situazione italiana. *Inquinamento*, 29(9): 8-15.
- Tartari, G.A., A. Marchetto & R. Mosello. 1995. Precision and linearity of inorganic analyses by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 706: 21-29.
- Tartari, G., S. Valsecchi & S. Cavalli. 1993. Limiti di rivelabilità, linearità e ripetibilità nella determinazione mediante cromatografia ionica di anioni nelle acque. *Acqua Aria*. 8: 873-882
- Tecator FIAstar Application Short Note ASTN 5-1984. Determination of silica by flow injection analysis.
- Tecator. 1988. *An introduction to the use of Flow Injection Analysis*. Tecator AB. Hoganas, Sweden: 72 pp.
- Thomsen J., K. Johnson & R. Petty. 1983. Determination of reactive silicate in seawater by flow injection analysis. *Anal. Chem.*, 55: 2378-2382.

- Tonolli, V. 1954. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto nell'anno 1953. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 8: 9-28.
- Tonolli, V. 1956. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto negli anni 1954 e 1955. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 9: 9-22.
- Tonolli, V. 1958. Relazione del Direttore sull'attività scientifica dell'Istituto negli anni 1956 e 1957. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 10: 317-329.
- Tonolli, L., M. Gerletti & G. Chiaudani. 1975. Trophic conditions of Italian lakes as a consequence of human pressures. In: Hasler, A.D. (Ed.), *Coupling of Land and Water Systems*. Ecol. Stud. Vol.: 215-225.
- UNICHIM. 1991. Norma UNI 9813. Analisi degli anioni mediante cromatografia ionica e mediante cromatografia liquida ad alta pressione: 1-27.
- Vaccarone, M. 1983. *Apporti di nutrienti al Lago Maggiore in relazione al suo livello trofico*. Tesi Facoltà di Scienze, Università di Milano.
- Valderrama, J.C. 1977. *Methods used by the Hydrographic Department of the National Board of Fisheries*. Goteborg, Sweden.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109-122.
- Vijverberg, F.A.J.M & W.P. Cofino. 1987. *Control procedures: Good Laboratory Practice and Quality Assessment*. ICES-report 6, Copenhagen.
- Vollenweider, R.A. 1962. Sull'uso dei metodi conduttometrici per la titolazione dell'alcalinità totale, dei cloruri e dei solfati nelle acque dolci. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 15: 29-42.
- Vollenweider, R.A. 1963. Studi sulla situazione attuale del regime chimico e biologico del Lago d'Orta. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 16: 21-125.
- Vollenweider, R. A. 1964. Ueber oligomiktische Verhältnisse des Lago Maggiore und einiger anderer insubrischer Seen. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 17: 191-206
- Vollenweider, R.A. 1965. Materiali ed idee per una idrochimica delle acque insubriche. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 19: 213-286.
- Weiss, J. 1986. *Handbook of ion chromatography*. Edward L. Johnson Ed.. Dionex Corporation Sunnyvale, California: 244 pp.
- Welz, B. 1976. *Spettroscopia di assorbimento atomico*. Teoria, tecniche operative, applicazioni. Ed. ETAS Libri, Sonzogno: 331 pp.
- Westcott, C.C. 1978. *pH measurements*. Academic Press, New York: 172 pp.
- Wathne, B.M., S.T. Patrick, D. Monteith & H. Barth. 1995. *Acidification of Mountain Lakes: Palaeolimnology and Ecology*. AL:PE1 Report for the period April 1991 - April 1993. European Commission Report EUR 16129 EN. Ecosystems Res. 9: 292 pp.
- Winkler, L.W. 1888. The determination of dissolved oxygen in water. *Berlin. Deut. Chem. Ges.*, 21: 2843.
- Yost R.W., L.S. Ettre & R.D. Conlon. 1990. *Introduzione pratica alla cromatografia in fase liquida (HPLC)*. Morgan Edizioni Tecniche: 233 pp.
- Youden, W. J. 1975. Statistical techniques for collaborative tests. In: *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington. USA: 88 pp.