

EDITORIALE

Il processo di aggiornamento dei metodi analitici IRSA mediante l'introduzione di tecniche a maggiore carattere strumentale, avviato nel numero precedente, continua con la presentazione di due nuovi metodi chimici, il primo rivolto alla determinazione di cloruro, nitrato e solfato in cromatografia ionica ed il secondo riguardante la determinazione del mercurio totale mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi. Il primo metodo viene incontro alle esigenze degli operatori preposti al controllo che, come risulta dalle risposte fin qui pervenute al questionario conoscitivo loro inviato, utilizzano la cromatografia ionica a livello pressochè routinario, almeno per quanto concerne la determinazione degli anioni nelle acque. Il metodo proposto è stato validato attraverso prove inter-laboratorio che hanno coinvolto 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Le prove, condotte su campioni multicomponenti sintetici e su campioni certificati, hanno permesso di corredare il metodo di dati di ripetibilità, riproducibilità e accuratezza.

Nel secondo metodo viene introdotta per la prima volta in un metodo IRSA una procedura di digestione basata sull'impiego delle microonde. Tale procedura prevede l'impiego di un limitato numero di reattivi e una minima manipolazione del campione, riducendo così sia i rischi di contaminazione ambientale, particolarmente rilevanti nel caso della determinazione del mercurio, sia i rischi per la salute degli operatori. L'impiego dell'amalgama su oro per la preconcentrazione del mercurio consente il dosaggio dell'analita a livelli di pochi ng/L in conformità con le normative più severe in materia di controllo delle acque.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, settembre 1999

DETERMINAZIONE DI CLORURO, NITRATO E SOLFATO. METODO PER CROMATOGRAFIA IONICA*

a cura di M. Camusso e S. Polesello, IRSA-CNR, Brugherio

RIASSUNTO

Viene presentato un metodo per la determinazione di cloruro, nitrato e solfato mediante cromatografia ionica nelle acque sotterranee, superficiali e di scarico. Nell'articolo vengono riportate oltre alla procedura completa del metodo, la diffusione nei laboratori dell'utilizzo di questa tecnica e la metodologia utilizzata per arrivare alla stesura e validazione del metodo.

SUMMARY

This paper describes a method for simultaneously determining chloride, nitrate and sulphate in fresh waters (surface, ground, mineral, meteoric), effluents and wastewaters by ion chromatography. The validation procedure for the technique and extent of its use in laboratories are also reported.

INDICE

DETERMINAZIONE DI CLORURO, NITRATO E SOLFATO. METODO PER CROMATOGRAFIA IONICA. 1

DETERMINAZIONE DI MERCURIO. METODO PER SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO A VAPORI FREDDI (CV-AAS). 15

* Il metodo è stato discusso e approvato dall'unità operativa "Anioni in cromatografia ionica" composto da : Cristofori M.C. (ENI, Ferrara), Davi M.L. (ARPA, Ferrara), Forese A. (PMP, Padova), Spezia S. (ENEL, Piacenza), Marani D. (IRSA, Roma), Petruzzelli D. (IRSA, Bari). Alla fase di validazione hanno collaborato : Achilli M. (ENEL, Segrate), Bettinelli M. (ENEL, Piacenza), Carniel A., Cirillo R. (PMP, Pordenone), Dell'Andrea E., Martini G. (PMP, Venezia), Tartari G. A. (III-CNR, Verbania-Pallanza), Torcini S. (Enea, Casaccia). All'elaborazione statistica ha collaborato: S. Colombini (IRSA, Brugherio)

INTRODUZIONE

L'analisi in cromatografia ionica si è ampiamente sviluppata dal 1975, con l'introduzione da parte di Small et al. (1975) della soppressione dell'eluente, ed è stata ormai accettata come la tecnica di routine più diffusa ed affidabile per l'analisi di ioni in diverse matrici (Haddad and Jackson, 1990).

I principali vantaggi rispetto ad altre tecniche convenzionali risiedono nella velocità di analisi (in genere meno di 15 minuti per un'analisi completa degli anioni), nel suo ampio intervallo dinamico (da $\mu\text{g/L}$ a decine di mg/L per ogni singolo anione), nella possibilità di analizzare contemporaneamente più ioni, nella alta selettività e sensibilità, e nella flessibilità e facilità di applicazione in diverse matrici anche da parte di utilizzatori non esperti (Lucy, 1996). In meno di dieci anni questa tecnica è stata accolta nei metodi dall'American Society for Testing and Materials (ASTM, 1984), in un metodo EPA per l'analisi degli anioni nelle acque potabili (EPA, 1991) e per l'analisi di anioni e cationi nelle deposizioni umide (EPA, 1986a, b). In tutto il mondo sono stati proposti ed accettati metodi che adottano la cromatografia ionica per le analisi delle acque: in particolare, in Italia l'UNICHIM ha proposto un metodo per l'analisi degli anioni nelle acque di scarico (UNICHIM, 1991) e l'IRSA per la determinazione dei solfiti nelle acque di scarico (IRSA-CNR, 1994).

DIFFUSIONE DELLA TECNICA NEI LABORATORI

Dalle risposte al questionario IRSA sulle tecniche utilizzate dai laboratori pubblici e privati per la determinazione dei parametri previsti per legge nelle acque, con riferimento all'utilizzo della cromatografia ionica, emerge quanto segue:

dei 32 laboratori che hanno a tutt'oggi risposto, di cui 29 appartenenti al settore pubblico (ARPA, PMP, USL) e 3 al settore privato, utilizzano routinariamente la cromatografia ionica 26 laboratori pari a circa un 80%. La suddetta tecnica viene impiegata per lo più per l'analisi degli anioni, mentre solo 8 dei 26 laboratori la utilizzano anche per l'analisi dei cationi alcalini e/o alcalino-terrosi (Tab.1).

Un'indicazione della diffusione dell'utilizzo della cromatografia ionica rispetto ad altre tecniche analitiche si può ottenere dai risultati dei circuiti internazionali di intercalibrazione legati al progetto AQUACON (Mosello et al, 1998a; 1998b), che coinvolgono complessivamente più di 200 laboratori. Per l'analisi degli anioni (cloruro, nitrato e solfato) la cromatografia ionica è la tecnica maggiormente utilizzata, mentre per i cationi alcalini ed alcalino-terrosi il suo utilizzo è comparabile alle tecniche di assorbimento (AAS) ed emissione atomica (ICP, AES) (Fig. 1).

Tab. 1 - Diffusione della cromatografia ionica nei laboratori (inchiesta IRSA)

Parametro	NO_2	NO_3	Cl	F	PO_4	SO_4	SO_3	NH_4	K	Na	Ca	Mg	Ba	Li
n (Laboratori)	8	23	21	14	10	24	5	5	7	7	7	7	1	4

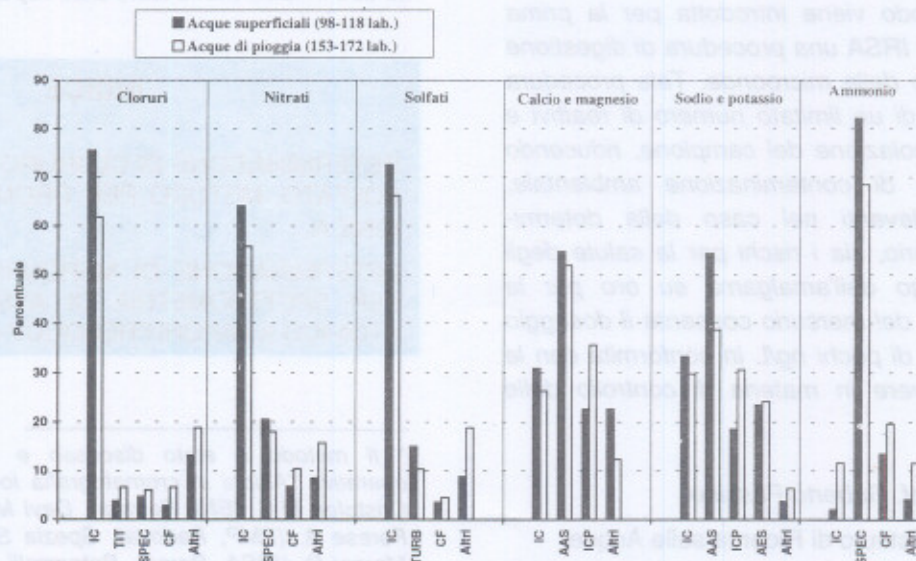


Fig. 1 - Utilizzo della cromatografia ionica rispetto ad altre tecniche negli esercizi di intercalibrazione AQUACON per acque superficiali ed acque di pioggia

CRITERI DEL METODO

Prima di elaborare una bozza preliminare del Metodo, l'Unità Operativa (U.O.) ha preso in esame e confrontato sia i Metodi Ufficiali esistenti in ambito internazionale, che le metodiche interne utilizzate nei laboratori in cui lavorano i componenti dell'U.O.

Da questa comparazione critica è scaturita una prima bozza di Metodo, che è stata discussa collegialmente paragrafo per paragrafo. Di seguito riportiamo i punti salienti e maggiormente discussi, sottolineando anche le novità introdotte e, a seguire, il testo definitivo strutturato secondo i criteri tradizionali dei Metodi IRSA.

Campo di applicazione

Il metodo è di applicazione vasta, sia per acque sotterranee, superficiali che di scarico. Il campo di applicazione è stato definito tra 0,1 e 100 mg/L, anche se la tecnica potenzialmente ha una sensibilità maggiore, operando con un volume di iniezione più grande o addirittura in preconcentrazione. A concentrazioni più basse, però, la precisione è critica, specie nel caso di laboratori che analizzino sia acque superficiali che reflui, e quindi si è imposto un limite inferiore che assicuri una adeguata precisione ed accuratezza del metodo. Il limite inferiore del campo di applicabilità è stato scelto in funzione del limite di quantificazione del metodo (ad un volume di iniezione di 50 µL), calcolato come 10 volte la deviazione standard dell'analita iniettato a basse concentrazioni. Il limite di quantificazione è risultato essere 0,14 mg/L per il cloruro, 0,07 mg/L per il nitrate e 0,07 mg/L per il solfato.

Interferenze

E' stato uno dei paragrafi più discussi e di difficile stesura. L'approccio tradizionale a questo problema, mutuato sostanzialmente dai metodi colorimetrici, è stato ritenuto insufficiente nel caso di un metodo cromatografico. Abbiamo distinto tre casi di interferenza per un metodo cromatografico.

Il primo è la *manca di risoluzione* tra picchi adiacenti: in questo caso è difficile definire con un numero quale sia il rapporto tra due specie che determini una sovrapposizione di picchi, in quanto questo rapporto dipende dalla quantità assoluta dei due composti presente nel campione, dal tipo di colonna, di eluente, dal volume iniettato. Abbiamo perciò indicato quali sono le coppie di difficile risoluzione sulle più usate colonne per cromatografia ionica, ed abbiamo indicato genericamente quale debba essere l'approccio generale utilizzabile per modificare la selettività di un sistema cromatografico (modifica dell'eluente, sostituzione del tipo di fase stazionaria); nel paragrafo dedicato alle specifiche della colonna si è però indicato con esattezza la

risoluzione minima accettabile ($R = 1$) nel caso di interferenti.

Il secondo tipo di interferenza è quella dovuta all'*effetto matrice*, cioè presenza di picchi estranei a carattere non periodico, disturbi sulla linea di base, dovuti alla presenza di sostanze di difficile eluizione come tensioattivi, acidi umici, che degradano la qualità dell'analisi cromatografica. In questo caso si propongono soluzioni generali quali l'uso di cartucce e filtri di pretrattamento del campione.

L'ultimo tipo di interferenza riscontrabile è quella dovuta alle sostanze che, accumulandosi progressivamente, riducono col tempo il *corretto funzionamento* del sistema cromatografico, oppure creano dei malfunzionamenti nel sistema: in questo caso è necessario, oltre ad operare secondo la classica buona prassi di laboratorio (filtrazione dei reagenti, degasaggio ecc.), controllare periodicamente i parametri cromatografici della colonna, come indicato in un paragrafo successivo.

Apparecchiatura: colonna di separazione a scambio ionico

Per non vincolarsi a determinate fasi stazionarie, che possono, in un futuro anche prossimo, essere sostituite da prodotti più innovativi, si è preferito definire la colonna di separazione dal punto di vista delle prestazioni minime necessarie ad avere risultati accurati, piuttosto che entrare nei dettagli della composizione chimica della fase stazionaria. Sono stati perciò definiti dei parametri cromatografici da calcolare prima dell'utilizzo di una nuova colonna, e che, verificati periodicamente, permettono di valutare anche il grado di usura della colonna stessa. A titolo di esempio si è poi scelto una colonna ed un eluente adatto a quella colonna, in modo da riportare una procedura completa di analisi, secondo uno schema più tradizionale. Questo stesso approccio è stato adottato anche dall'ISO in una proposta di metodo per l'analisi dei bromati in acque potabilizzate (ISO-DIS 15061).

Modalità di calibrazione

Uno dei punti di maggiore discussione è stata la scelta delle modalità di calibrazione. A partire da alcune esperienze compiute da membri della U.O. e da altri partecipanti alle prove di validazione (Tartari *et al.*, 1995; Achilli and Romele, 1997; Valsecchi e Polesello, 1997), si è posto l'accento sull'importanza di una corretta calibrazione per l'accuratezza dei dati analitici. Per motivi intrinseci alla tecnica, la cromatografia ionica presenta una scarsa linearità per vasti intervalli di concentrazione: si è perciò convenuto di restringere la calibrazione lineare ad un solo ordine di grandezza, proponendo in alternativa l'uso di una regressione quadratica, ormai disponibile in tutti i software cromatografici, per coprire un intervallo di calibrazione più ampio. La calibrazione

deve essere verificata almeno ogni 25 campioni, in modo da mantenere sotto controllo, mediante, ad esempio, l'uso di una carta di controllo di qualità, la stabilità del sistema.

Calcoli

Sono stati omessi i calcoli per ricavare i valori di concentrazione dalla retta di calibrazione, sia lineare che quadratica, in quanto questi vengono ottenuti, nella quasi totalità dei casi, direttamente mediante il sistema di acquisizione ed elaborazione dati (software, integratori) connesso al rivelatore.

Precisione ed accuratezza

In questa sezione, che ha mantenuto il titolo tradizionale riportato nei Metodi IRSA, sono stati descritti in breve i risultati delle prove di validazione interlaboratorio effettuate dai membri dell'U.O., in collaborazione con altri esperti del settore. Queste prove vengono descritte in dettaglio nel capitolo seguente.

VALIDAZIONE DEL METODO

Modalità e criteri delle prove interlaboratorio

La validazione del metodo è stata eseguita mediante una prova interlaboratorio che ha coinvolto un totale di 11 laboratori italiani qualificati, appartenenti ad enti pubblici e privati. Le analisi sono state effettuate con strumentazioni e colonne diverse. Questa esperienza è stata compiuta in due fasi: nella prima fase (febbraio-aprile 98) sono stati analizzati 2 campioni di acqua potabile e minerale opportunamente diluiti, in modo da valutare la ripetibilità e riproducibilità intra- e inter-laboratorio, e di verificare eventuali problemi risultanti dall'utilizzo della bozza proposta. Dall'analisi dei risultati di questa prima fase si è deciso di diminuire gli standard di calibrazione da 5 a 3 per la calibrazione lineare su un ordine di grandezza, in quanto il maggior carico di lavoro non era giustificato da un reale guadagno nella precisione dei dati prodotti. È stato perciò definito in questa fase il testo definitivo delle modalità di calibrazione, introducendo la possibilità di effettuare una calibrazione su due ordini di grandezza mediante una regressione quadratica.

La seconda fase delle prove di validazione interlaboratorio (giugno-agosto 98) è consistita nell'analisi di 2 campioni di acque di pioggia artificiali che avevano valori certificati per nitrato e solfato, e valori unicamente indicativi per cloruro. Dall'analisi di questi campioni di riferimento si è ottenuta, oltre alla ripetibilità e riproducibilità del metodo, anche l'accuratezza del metodo stesso.

Per le analisi sono stati adottati i seguenti criteri generali: per ciascun campione sono state eseguite

tre serie di cinque repliche ciascuna, per un totale, quindi, di 15 dati. Ciascuna serie di prove doveva essere distanziata almeno di una settimana dalla precedente, e le tre serie di misure dovevano essere completate entro due mesi dalla consegna del campione. Per i primi due campioni si era imposto che ciascuna serie di misure doveva essere preceduta da una sequenza completa di calibrazione secondo le modalità stabilite nella bozza, mentre si è lasciata la possibilità, nella seconda fase, di non ripetere la calibrazione nel caso si verificasse, secondo quanto imposto dalla bozza definitiva, la validità della calibrazione precedente.

Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati delle due serie di misure si è seguita la procedura riportata da Youden e Steiner (1975) che si basa sull'analisi della varianza (ANOVA) dopo eliminazione degli outlier mediante test standardizzati. Questa procedura è quella poi accolta in ambito ISO (1994) e IUPAC (1995) per la validazione di nuovi metodi.

Preparazione dei campioni

I primi due campioni (chiamati CAMPIONE A e B) sono stati preparati con acqua potabile (rispettivamente acqua minerale in bottiglia e acqua potabile di rete) filtrata attraverso filtro da 0,22 μm , opportunamente diluiti con acqua MilliQ. Non sono stati aggiunti stabilizzanti. È stata poi verificata l'omogeneità di questi campioni su tre aliquote da 100 mL, prese a caso, sul totale di 15 aliquote preparate per l'esercizio interlaboratorio. Per ciascun campione sono state eseguite 5-7 analisi in tre giorni consecutivi: il set di dati (espresso in unità arbitrarie di area) è stato sottoposto ad un test ANOVA. Per tutti gli analiti in entrambi i campioni, le medie non sono risultate significativamente diverse ($p < 0,01$) (Tabb. 2 e 3).

Dall'analisi dei dati del test interlaboratorio, si è inoltre dimostrato che i campioni, conservati a 4°C, non hanno presentato problemi di stabilità nel tempo necessario a completare le serie di analisi (2 mesi).

Per la seconda serie di prove sono stati utilizzati campioni di acqua di pioggia artificiale (SRM 2694-I e SRM 2694-II, chiamati rispettivamente NBS1 e NBS2) certificati dal National Bureau of Standard con più metodi analitici. In questo caso non sono state effettuate verifiche della stabilità ed omogeneità. In alcuni casi, come evidenziato dallo studio degli outlier, alcuni di questi campioni hanno presentato problemi di interferenze o di non omogeneità. I risultati complessivi, eliminati gli outlier, come vedremo in seguito, hanno comunque confermato con accuratezza i valori certificati.

Ricerca degli outlier

Una delle fasi più delicate dell'analisi dei risultati è l'omogeneizzazione dei risultati e la ricerca ed eliminazione degli outlier.

Per quanto riguarda la scelta del set iniziale di risultati, si è deciso di comprendere solo quei laboratori (N=9) che avevano completato le 3 serie di repliche, in quanto si è ritenuto che non fossero sufficienti 2 serie di misure per avere una stima della riproducibilità. La ricerca degli outlier è stata eseguita secondo il metodo descritto da Youden e Steiner (1975), dapprima come laboratorio intero, per la ricerca degli errori sistematici (Test di Thompson & Willke), e poi, in un secondo tempo, come risultato singolo, per la ricerca degli errori casuali (Test di Dixon). Nella Tab. 4 si riporta l'intero set di dati ottenuto, evidenziando in corsivo sottolineato le misure considerate come outlier, che sono state eliminate dall'elaborazione ANOVA seguente.

Ripetibilità e riproducibilità

Il trattamento statistico dei dati è stato effettuato in accordo con la norma ISO 5725 (ISO, 1994) basata sull'analisi della varianza. Si è creata una o più tavole ANOVA per ciascun analita. Ogni riga, che rappresenta un laboratorio, contiene le medie ottenute nei tre giorni diversi su ciascun campione da ciascun laboratorio. In ciascuna tavola ANOVA sono stati elaborati assieme i campioni che avevano concentrazioni simili di analita. Ad esempio, nel caso del cloruro, l'elaborazione ANOVA è stata effettuata su 7 laboratori (dopo eliminazione degli outlier), 3 campioni (aventi concentrazione di cloruro compresi tra 0,2 e 1 mg/L) e tre repliche per ogni campione ed ogni laboratorio. Dall'analisi ANOVA si ricavano tre grandezze, che sono la combinazione lineare delle reali varianze di una determinazione analitica:

$$\begin{aligned}MS_L &= \sigma_0^2 + r\sigma_{LS}^2 + k\sigma_L^2 \\MS_{LS} &= \sigma_0^2 + r\sigma_{LS}^2 \\MS_0 &= \sigma_0^2\end{aligned}$$

ove:

- σ_0^2 - varianza tra determinazioni replicate
- σ_{LS}^2 - varianza dell'interazione laboratorio-campione
- σ_L^2 - varianza tra i laboratori
- r - numero di repliche (nel nostro caso $r=3$)
- k - numero di campioni (variabile a seconda dell'analita).

Si ricava infine un valore di ripetibilità (s_r) e di riproducibilità (s_R), definiti, rispettivamente come:

$$\begin{aligned}S_r &= \sqrt{\sigma_0^2} \\S_R &= \sqrt{\sigma_0^2 + \sigma_{LS}^2 + \sigma_L^2}\end{aligned}$$

Si deve notare che, in questa elaborazione, si ricava un valore di ripetibilità *inter-dies* di un singolo laboratorio, non il valore di ripetibilità di due repliche successive nello stesso giorno, in quanto come

valore delle repliche, si è inserita la media di ciascuna serie di repliche giornaliere. Secondo le norme ISO (ISO, 1994), si definisce un limite di ripetibilità:

$$r = 2,8 s_r$$

ed un limite di riproducibilità

$$R = 2,8 s_R$$

per un livello di confidenza del 95%.

Accuratezza

La ripetibilità è una stima del grado di affidabilità di un metodo e si può perciò definire un *intervallo di confidenza*, (CI) come

$$CI = X \pm r$$

ove

X è la media di una serie di misure.

Per verificare l'accuratezza del metodo si confronta l'intervallo di confidenza (CI), determinato nella prova interlaboratorio, con il valore certificato del materiale di riferimento. Nel nostro caso, il metodo per cromatografia ionica è risultato accurato sia per il nitrato che per il solfato (Tab. 2 della proposta di metodo), mentre il valore di cloruro determinato nei due campioni è risultato del tutto simile al valore indicativo del materiale di riferimento.

Prove su matrici reali

Poiché tutte le prove interlaboratorio, per ovvie esigenze di stabilità ed omogeneità, sono state effettuate su matrici sintetiche o di acque potabili, si è valutato l'effetto matrice analizzando campioni di acque di varia provenienza, naturali e di scarico (Tab. 5). Analizzando in parallelo standard e matrici reali, si è cercato di evidenziare se vi erano notevoli variazioni nella ripetibilità *intra-dies* (cioè repliche consecutive nello stesso giorno), attribuibili all'effetto matrice. Per le acque naturali è stato possibile ripetere la sequenza di analisi per tre giorni distribuiti nell'arco di un mese conservando il campione secondo il protocollo. I campioni di acque di scarico sono stati analizzati in un'unica giornata per evitare problemi di stabilità o sedimentazione.

I valori di ripetibilità presentati in tabella come coefficiente di variazione percentuale (CV), indicano che in generale, per una sequenza ridotta di analisi, il metodo cromatografico non risente particolarmente dell'effetto matrice.

Si possono però evidenziare alcune eccezioni. I cloruri in basse concentrazioni in acque di pioggia a bassa forza ionica presentano una scarsa ripetibilità. La precisione della misura del nitrato nel campione di

liquame urbano è limitata dall'attività biologica del campione stesso.
 Nel campione proveniente da un'industria galvanica i nitriti, interferendo parzialmente coi cloruri, rendono la ripetibilità di questo picco inferiore a quella di altri campioni di pari concentrazione.

La peggiore ripetibilità del solfato, nel campione proveniente dagli scarichi di un macello, può, infine, essere attribuita alla presenza di acidi organici nel campione.

Tab. 2 - Campione A

Cloruro		Nitrato		Solfato		N
Media	Varianza	Media	Varianza	Media	Varianza	
5,92457E6	8,33317E10	8,76555E6	4,05954E10	1,84195E7	7,50324E10	7
5,97172E6	6,87751E9	8,58093E6	7,38732E9	1,81577E7	1,07509E10	5
5,96958E6	9,7798E9	8,66485E6	2,98714E10	1,82011E7	2,17734E10	5
F = 0,10814 p = 0,89825		F = 1,80801 p = 0,20024		F = 2,74469 p = 0,10434		

Per $p=0,01$ le medie non sono significativamente diverse.

Tab. 3 - Campione B

Cloruro		Nitrato		Solfato		N
Media	Varianza	Media	Varianza	Media	Varianza	
2,76281E8	3,23438E12	8,06002E7	5,86322E10	1,71618E8	7,00351E11	7
2,73996E8	3,81263E12	8,07699E7	1,69999E11	1,70954E8	1,31436E11	5
2,7722E8	5,06438E12	8,08958E7	2,76578E11	1,71541E8	1,01546E11	5
F = 3,48063 p = 0,06158		F = 0,75789 p = 0,48828		F = 2,01354 p = 0,17307		

Per $p=0,01$ le medie non sono significativamente diverse

Tab. 4 - Risultati completi delle prove interlaboratorio (espressi in mg/L); outlier in corsivo sottolineato

Laboratori	CLORURO					
	NBS1			NBS2		
1	<u>0,31</u>	<u>0,27</u>	<u>0,34</u>	<u>1,29</u>	<u>1,15</u>	<u>1,22</u>
2	<u>0,90</u>	0,26	0,28	1,05	1,07	1,04
3	0,19	0,22	<u>0,12</u>	1,06	1,06	1,05
4	0,23	0,24	0,25	1,08	1,00	1,04
5	0,23	0,26	0,24	1,10	1,03	1,07
6	<u>0,16</u>	<u>0,19</u>	<u>0,25</u>	<u>0,83</u>	<u>0,86</u>	<u>0,84</u>
7	0,28	0,29	0,29	1,09	1,10	0,99
8	0,25	0,25	0,26	1,02	1,10	1,00
9	0,32	0,32	0,31	1,04	1,04	1,03

Lab. 1, 6 tutto il laboratorio

Lab. 2, 3 valori singoli

Laboratori	Campione A			Campione B		
	1	0,36	0,38	0,38	14,42	14,78
2	0,44	0,44	0,46	13,73	13,77	14,05
3	0,45	0,45	0,38	<u>10,67</u>	<u>10,92</u>	<u>10,59</u>
4	0,46	0,47	<u>0,54</u>	<u>9,87</u>	<u>10,14</u>	<u>9,91</u>
5	0,35	0,40	0,39	13,37	13,90	14,08
6	0,34	0,35	0,35	13,41	13,39	13,77
7	0,35	0,39	0,48	13,75	14,11	14,34

segue tabella

segue tabella

8	0,41	0,42	0,48	14,39	14,19	14,10
9	0,42	0,45	0,45	13,61	13,63	13,66

Lab. 3, 4 valori singoli

Lab. 4 curva calibrazione con le altezze

NITRATO						
Laboratori	NBS1 (assente)			NBS2		
1				7,45	7,34	7,30
2				7,10	6,96	6,88
3				7,60	7,60	7,74
4				7,09	7,04	7,21
5				6,88	6,92	7,09
6				7,12	7,12	7,05
7				7,35	7,16	7,19
8				7,05	7,46	7,08
9				6,91	6,79	6,76

No outlier

Laboratori	Campione A			Campione B		
1	1,04	1,04	0,99	8,85	8,64	8,57
2	<u>0,86</u>	<u>0,87</u>	<u>0,86</u>	8,99	8,56	8,62
3	<u>1,16</u>	1,06	1,00	<u>7,22</u>	<u>7,32</u>	<u>6,98</u>
4	<u>1,22</u>	<u>1,22</u>	<u>1,22</u>	<u>12,69</u>	<u>12,55</u>	<u>12,57</u>
5	0,97	1,03	1,05	8,26	8,44	8,53
6	0,93	0,97	0,96	8,41	8,44	8,56
7	1,03	1,01	1,03	8,74	8,92	9,67
8	1,01	0,96	0,97	8,74	8,78	8,71
9	1,01	0,98	0,98	8,39	8,40	8,41

Lab. 4 tutto il laboratorio

Lab. 2, 3, 7 valori singoli

SOLFATO						
Laboratori	NBS1			NBS2		
1	2,78	2,44	2,43	<u>14,10</u>	<u>13,47</u>	<u>13,50</u>
2	2,77	2,70	2,93	10,99	10,97	10,56
3	3,00	<u>3,42</u>	3,02	10,99	10,88	10,65
4	2,77	2,78	2,78	10,86	10,91	10,91
5	2,72	2,76	2,75	10,67	10,73	10,83
6	2,77	2,93	2,93	11,09	11,03	10,83
7	2,76	2,70	2,68	11,19	10,99	10,79
8	2,79	2,82	2,86	10,98	11,06	11,12
9	2,80	2,81	2,80	10,27	10,24	10,15

Lab 1, 3 valori singoli

Laboratori	Campione A			Campione B		
1	1,58	1,63	1,62	14,65	13,97	14,11
2	1,64	1,64	1,66	14,05	13,83	13,91
3	<u>1,56</u>	<u>1,58</u>	<u>1,45</u>	<u>10,11</u>	<u>10,64</u>	<u>10,61</u>
4	<u>1,48</u>	<u>1,48</u>	<u>1,48</u>	<u>12,08</u>	<u>12,16</u>	<u>12,00</u>
5	1,59	1,65	1,60	13,69	13,82	13,88

segue tabella

segue tabella

6	1,62	1,60	1,59	13,45	13,58	13,77
7	1,60	1,67	1,67	14,58	13,71	14,06
8	1,59	1,70	1,68	14,03	14,10	14,10
9	1,65	1,66	1,65	13,38	13,38	13,40

Lab 3, 4 tutto il laboratorio

Tab. 5 - Prove su matrici reali: *acque naturali*: ripetibilità calcolata analizzando il medesimo campione in un solo laboratorio 5 volte in un giorno per tre giorni distribuiti nell'arco di un mese (n = 15); *acque di scarico*: ripetibilità calcolata analizzando il medesimo campione in un solo laboratorio 5 volte in un giorno (n = 5)

Campione	Fattore di diluizione	Cloruro (mg/L)	CV (%)	Nitrato (mg/L)	CV (%)	Solfato (mg/L)	CV (%)
Acque naturali							
pioggia*	1	0,39	17,0	1,79	1,4	2,20	1,3
fiume	1	3,33	2,1	4,82	1,0	9,31	0,3
fiume montano	1	19,03	0,2	9,25	0,6	25,8	0,2
lago	1	2,30	0,3	2,39	0,6	27,3	0,2
acqua potabile**	1	nd		nd		90,7	1,2
Scarichi urbani e industriali							
liquame urbano	1	37,04	2,1	0,88	8,7	35,65	0,6
acqua processo	100	2131	2,2	12,92	2,6	77,06	0,8
impianto biologico	100	899,60	0,3	59,70	0,2	897,40	1,4
industria tessile	100	591,60	0,8	19,10	1,2	2850,40	0,5
impianto di brunitura	100	819,80	1,1	74,70	1,7	1287,40	1,1
vetreria	40	22,10	1,6	46,63	2,7	37,72	1,9
industria galvanica	50	69,75	3,7	4,04	3,7	80,92	1,1
macello carni	50	86,97	1,0	447,30	0,9	54,06	3,9
industria tintoria	10	85,80	1,0	< dl		400,00	1,6
metalmecanica	5	53,03	0,9	< dl		73,20	0,8

Iniezione manuale tranne *fiume montano*, *lago* e *acqua potabile* per i quali è stato utilizzato un autocampionatore

* *pioggia*: analisi effettuate in un solo giorno (n=5)

** *acqua potabile*: analisi effettuate in due laboratori (n=30)

nd = non determinato

< dl = sotto il limite di rivelabilità

BIBLIOGRAFIA

ACHILLI M., ROMELE L. (1997): "Use of factorial experimental design for the rapid evaluation of main and interactive factors affecting linearity in calibration curves for sulfate analysis by ion chromatography.", *J. Chromatogr. A*, **770**, 29-37.

ASTM (1984): "Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography", D4327-84, *Annual Book of ASTM Standards*, vol.11.01, Philadelphia, 336-342.

EPA (1986a): "*Chloride, Orthophosphate, Nitrate and Sulfate in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography*", Method 300.6.

EPA (1986b): "*Dissolved Sodium, Ammonium, Potassium, Magnesium, and Calcium in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography*", Method 300.7.

EPA (1991): "*Test Method: the determination of Inorganic Anions in Water by ion Chromatography*", Method 300.0.

HADDAD P. R., JACKSON P. E. (1990): "*Ion Chromatography: principles and applications*", Elsevier, Amsterdam.

IRSA-CNR (1994): "Metodi Analitici per le Acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, 342 pp., Roma, Italia.

ISO (1994): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", ISO standard 5725, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 331-343.

LUCY C.A. (1996): "Recent advances in ion chromatography: a perspective", *J. Chromatogr. A*, **739**, 3-13

MOSELLO, R., BIANCHI M., GEISS H., MARCHETTO A., SERRINI G., SERRINI LANZA G., TARTARI G.A., MUNTAU H. (1998a): "AQUACON-MedBas Subproject N°5. Freshwater analysis. Intercomparison 1/97", Joint Res. Centre European Commission, *Rep. EUR 18075 EN*, 66 pp.

MOSELLO, R., BIANCHI M., GEISS H., MARCHETTO A., SERRINI G., SERRINI LANZA G., TARTARI G.A., MUNTAU H., (1998b): "AQUACON-MedBas Subproject N°6. Acid rain analysis. Intercomparison 1/97", Joint Res. Centre European Commission, *Rep. EUR18135 EN*, 65 pp.

SMALL H, STEVENS T.S., BAUMANN W.C. (1975): "Novel ion exchange chromatographic method using conductometric detection", *Anal. Chem.*, **47**, 1801-

TARTARI G. A., MARCHETTO A., MOSELLO R., (1995): "Precision and linearity of inorganic analyses by ion chromatography", *J. Chromatogr. A*, **706**, 21-29.

UNICHIM (1991): "Norma UNI 9813: Analisi degli anioni mediante cromatografia ionica e mediante cromatografia liquida ad alta pressione", 27 pp.

VALSECCHI S., POLESELLO S., (1997): "Problemi di taratura nell'analisi di anioni mediante cromatografia ionica soppressa", *Notiziario dei metodi analitici per le acque IRSA-CNR*, gennaio, 10-22.

YOUTEN W. J., STEINER E. H., (1975): "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC, Arlington, VA,.

DETERMINAZIONE DI CLORURO, NITRATO E SOLFATO MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea di specie anioniche mediante cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla separazione degli analiti mediante colonna di scambio anionico in base alla loro affinità per la fase stazionaria. L'eluente, contenente gli analiti separati, passa poi attraverso

un dispositivo di derivatizzazione chimica post-colonna detto soppressore che scambiando protoni con la fase mobile ha lo scopo di abbassare la conducibilità di fondo dell'eluente, per formazione dell'acido debole coniugato, e di esaltare il segnale dell'analita, che viene rivelato mediante un conduttimetro in linea.

Il riconoscimento degli analiti viene effettuato confrontando il tempo di ritenzione dei picchi del campione con il tempo di ritenzione di standard. La concentrazione viene determinata confrontando l'area del picco con la curva di calibrazione dell'analita costruita mediante una serie di standard a diverse concentrazioni.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate ed agli scarichi domestici ed industriali per concentrazioni comprese tra 0,1 e 100 mg/L per cloruro, nitrato e solfato.

Campioni, che presentano concentrazioni più elevate, possono essere analizzati dopo un'opportuna diluizione.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Sostanze con tempi di ritenzione simili a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione, specie se presenti in elevate quantità. Questo tipo di interferenza, facilmente individuabile nei cromatogrammi per la presenza di picchi parzialmente sovrapposti, è dipendente dal tipo di colonna e dalla forza dell'eluente. Ogni qual volta si verifichi un evento del genere, è necessario modificare la forza dell'eluente oppure cambiare il tipo di colonna, secondo le indicazioni delle case produttrici. In questo paragrafo vengono descritte le più comuni interferenze riscontrabili nelle analisi effettuate con i modelli più diffusi di colonne a scambio anionico.

Elevate quantità di cationi e di acidi organici poco ritenuti (ad esempio acido acetico e formico in concentrazione superiore a 100 mg/L) possono interferire con il cloruro. I clorati, presenti in genere solo in acque trattate in processi ossidativi, interferiscono parzialmente, in alcune colonne, con il nitrato. I picchi di alcuni composti, presenti in genere come componenti minoritari, possono presentare una non completa risoluzione coi picchi degli analiti (è il caso delle coppie cloruro/nitrito; bromuro/nitrato). In questo caso è necessario ottimizzare la separazione per ottenere un fattore di risoluzione, $R > 1$. In alcune colonne, la presenza di acidi organici poliprotici, in particolare l'acido tartarico, può interferire con la determinazione del solfato. L'interferenza si manifesta o come incompleta risoluzione del picco cromatografico del solfato, oppure come

peggioramento nella ripetibilità dell'area integrata del picco stesso.

L'acqua contenuta nel campione iniettato dà luogo ad un picco negativo all'inizio del cromatogramma, in quanto la sua conducibilità è inferiore a quella dell'eluente. Questo picco negativo, tanto maggiore quanto minore è la forza ionica del campione, può rendere meno accurata la determinazione del cloruro in concentrazioni inferiori a 0,5 mg/L. Questa interferenza può essere eliminata aggiungendo al campione una piccola aliquota di eluente concentrato (100 µL di eluente concentrato 100 volte per 10 mL di campione). In tal caso un'analoga procedura deve essere utilizzata anche nella preparazione delle soluzioni standard.

In caso di presenza di sostanze organiche con elevata affinità per resine scambiatrici ioniche a base aromatica, come polifenoli, tensioattivi, acidi umici, può essere necessario purificare il campione mediante filtrazione su cartucce, a base di polivinilpirrolidone polimerizzato, resine macroporose di divinilbenzene o equivalenti, in grado di trattenere selettivamente questo tipo di sostanze. La presenza di queste sostanze si evidenzia sul cromatogramma come disturbi o picchi molto allargati sulla linea di base, a carattere non periodico.

L'analisi frequente di campioni contenenti metalli disciolti può portare col tempo alla perdita delle caratteristiche di efficienza e risoluzione della colonna: è consigliabile purificare questo tipo di campioni mediante filtrazione su cartucce in grado di sequestrare metalli, disponibili commercialmente.

Per campioni contenenti particolato sospeso, si consiglia la filtrazione attraverso 0,45 µm prima dell'iniezione.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il prelievo del campione dovrà essere effettuato in accordo con quanto previsto nel capitolo "Metodi di Campionamento". A causa dei piccoli volumi analizzati, si deve prestare particolare cura nella manipolazione dei campioni al fine di non introdurre contaminazione negli stessi.

Il cloruro è stabile in soluzione. La concentrazione di nitrato può essere affetta dall'attività biologica del campione. L'ossidazione di nitrito e solfito, eventualmente presenti, può dar luogo a misure in eccesso rispettivamente di nitrato e solfato. Di conseguenza i campioni devono essere analizzati nel minor tempo possibile dopo il prelievo, al più tardi entro 48 ore, mantenendo gli stessi fino al momento dell'analisi a 4°C e al riparo dalla luce.

5 - APPARECCHIATURA

5.1 - Vetreria di laboratorio di classe A

5.2 - Cromatografo ionico

Costituito da: pompa isocratica capace di fornire un flusso da 0,5 a 5 mL/min; soppressore chimico od elettrochimico; rivelatore a conducibilità con compensazione della temperatura.

5.3 - Colonna di separazione a scambio anionico

Colonna impaccata con resine pellicolari a bassa capacità, funzionalizzate con gruppi ammonici quaternari, supportate su polimero a base aromatica, con relativa precolonna di fase analoga, in grado di dare una separazione efficiente dei picchi degli analiti. La colonna scelta deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi dei tre analiti: i valori accettabili dei parametri cromatografici (ad una concentrazione di 1 mg/L per ciascun analita) sono i seguenti:

fattore di capacità: $0,5 < k < 12$

efficienza: $N > 3000$ piatti teorici

fattore di risoluzione: $R_s > 1,5$ (è ammissibile $R_s > 1$ nel caso di coppie di difficile risoluzione indicate tra le specie interferenti al par. 3)

fattore di asimmetria: $0 < A_s < 4$

Il calcolo di tutti i parametri cromatografici della colonna deve essere effettuato almeno due volte l'anno; per matrici più complesse la verifica deve essere più frequente. Nel caso in cui la colonna non presenti più i requisiti cromatografici sufficienti, si deve procedere al lavaggio e rigenerazione della colonna secondo le istruzioni della casa costruttrice, o alla sostituzione della medesima.

5.4 - Sistema di acquisizione dati

Mediante personal computer o integratore

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua ad elevata purezza, caratterizzata da conducibilità $< 0,1$ µS/cm e filtrata su membrana da 0,2 µm.

6.1 - Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3)

6.2 - Idrogenocarbonato di sodio (NaHCO_3)

6.3 - Acido solforico concentrato

(Se necessario) (H_2SO_4 ; $d = 1,84$ g/L).

6.4 - Cloruro di sodio (NaCl)

6.5 - Nitrato di sodio (NaNO_3)

6.6 - Solfato di potassio (K_2SO_4)

6.7 - Soluzione eluente

($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$): la molarità deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna. Ad esempio, per una soluzione Na_2CO_3 1,8 mM/ NaHCO_3 1,7 mM: preparare una soluzione concentrata, sciogliendo 19,078 g di Na_2CO_3 e 14,282 g di NaHCO_3 in 1 L di acqua. Diluire 100 volte questa soluzione (10 mL in 1 L) in un matraccio tarato. La soluzione concentrata è stabile per sei mesi in bottiglia di polietilene, polipropilene o vetro. L'eluente deve essere preparato fresco ogni qual volta si inizi una sessione di analisi.

6.8 - Rigenerante

(Per i soppressori chimici a membrana) soluzione di H_2SO_4 12,5 mM
Portare a 4 L con acqua in matraccio tarato 2,8 mL di H_2SO_4 concentrato.

6.9 - Preparazione delle soluzioni standard concentrate

Preparare una serie di soluzioni concentrate di 1000 mg/L di analita, pesando i rispettivi sali conservati in essiccatore e precedentemente essiccati in stufa per almeno 30 min a 105°C. Queste soluzioni, conservate a 4°C al buio in bottiglie di polietilene o polipropilene, sono stabili 6 mesi.

6.9.1 - Soluzione standard concentrata di cloruro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,648 g di cloruro di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.2 - Soluzione standard concentrata di nitrato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,371 g di nitrato di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.3 - Soluzione standard concentrata di solfato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,814 g di solfato di potassio anidro in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. In sostituzione alle precedenti, si possono usare soluzioni commerciali di opportuna concentrazione, purché in corso di validità e accompagnate da un certificato di analisi che consenta la riferibilità della misura a standard primari.

6.10 - Modalità di calibrazione e preparazione delle soluzioni standard

La scelta della modalità di calibrazione dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola calibrazione. Per intervalli di

concentrazioni fino ad un ordine di grandezza è possibile utilizzare curve di calibrazione lineari con tre punti, mentre per intervalli di concentrazioni fino a due ordini di grandezza bisogna utilizzare curve di calibrazione quadratiche o, in alternativa, regressioni lineari pesate, calcolate con almeno cinque livelli di concentrazione. Per le calibrazioni lineari non superiori ad un ordine di grandezza è necessario preparare tre standard a concentrazioni corrispondenti ai due estremi ed al centro dell'intervallo di misura. Ad esempio è possibile dividere l'intervallo di misura definito dall'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-100 mg/L) in tre intervalli (0,1-1; 1-10; 10-100 mg/L); per ciascuno dei tre intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 1-10 gli standard devono essere 1; 5; 10 mg/L). A seconda della tipologia dei campioni può essere necessario coprire l'intervallo di misura con due o più rette di calibrazione. Se si evidenzia un netto discostamento dalla linearità ($R^2 < 0,999$, oppure variazione dei valori dei fattori di risposta¹, RF, più elevata del $\pm 5\%$ attorno al valore medio di RF), è consigliabile interpolare i punti degli standard con una curva di calibrazione quadratica. Per le determinazioni su due ordini di grandezza con una sola calibrazione, è indispensabile ricorrere ad una regressione quadratica o, in alternativa, ad una regressione lineare pesata, calcolate con almeno cinque punti. Gli standard di calibrazione vanno scelti in corrispondenza del valore minimo, massimo, del 5, 10 e 50% dell'intervallo di misura (ad esempio per l'intervallo 0,1-10 mg/L gli standard consigliati sono 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/L). La preparazione degli standard di calibrazione multielemento deve essere eseguita aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderati, volumi misurati di soluzioni concentrate in matracci tarati, portando a volume con acqua. Le soluzioni di calibrazione a concentrazione bassa (0,1-1 mg/L) devono essere preparate giornalmente mentre quelle a concentrazione più elevata (1-100 mg/L) possono essere utilizzate per una settimana.

7 - PROCEDIMENTO

Portare tutti gli standard, i campioni, l'eluente e l'eventuale rigenerante a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi. Poiché la temperatura influenza i parametri cromatografici, è preferibile mantenere la temperatura del laboratorio controllata durante lo svolgimento della calibrazione e delle successive analisi. Accendere il cromatografo, impostare le condizioni strumentali di lavoro, lasciare stabilizzare il sistema e controllare che la conducibilità sia stabile.

¹ Il fattore di risposta RF può essere facilmente calcolato per ogni concentrazione di standard come:

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

In caso di perfetta linearità della curva di calibrazione e di intercetta nulla i valori di RF sono uguali per ogni valore di concentrazione.

7.1 - Condizioni cromatografiche

Le condizioni strumentali da controllare sono: il volume d'iniezione; la composizione dell'eluente; il flusso dell'eluente; la conducibilità di fondo; la pressione del sistema. E' inoltre importante verificare che sia impostato sul rivelatore il fattore di compensazione della temperatura.

Nel caso di un soppressore chimico a membrana si deve definire e controllare anche il flusso del rigenerante (tipicamente H_2SO_4 12,5 mM a 4-5 mL/min).

7.2 - Verifica della funzionalità strumentale

Raggiunte le condizioni d'analisi, deve essere verificata la perfetta funzionalità strumentale mediante l'iniezione di uno standard, a scelta all'interno dell'intervallo di lavoro. Bisogna verificare la risoluzione tra i picchi e la riproducibilità dei tempi di ritenzione (massimo discostamento ammissibile rispetto all'ultimo controllo dell'efficienza: $\pm 5\%$) dei singoli analiti. E' necessario, inoltre, verificare mediante l'iniezione di un campione d'acqua ad elevata purezza (considerato come bianco) la presenza di eventuali interferenti dovuti al sistema.

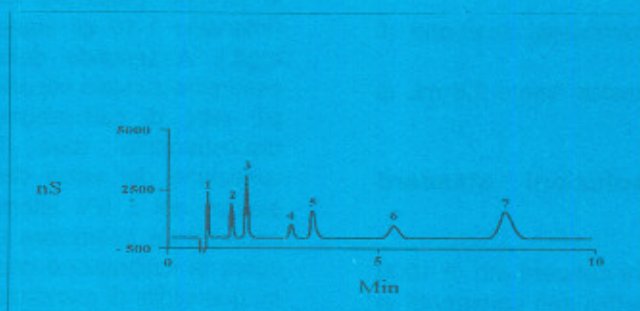


Fig. 1 - Cromatogramma di uno standard multiplo: 1. F (0,5 mg/L), 2. Cl (0,5 mg/L), 3. NO_2 (1,0 mg/L), 4. Br (1,0 mg/L), 5. NO_3 (2,0 mg/L), 6. PO_4 (3,0 mg/L), 7. SO_4 (3,5 mg/L) Volume di iniezione : 50 μ L; eluente : Na_2CO_3 1,8 mM/ $NaHCO_3$ 1,7 mM, flusso dell'eluente: 2 mL/min, fattore di compensazione della temperatura 1,7%/°C, colonna: Dionex IonPac AS4A

7.3 - Calibrazione

7.3.1 - A partire dalle soluzioni concentrate da 1000 mg/L, preparare le soluzioni multicomponenti di calibrazione (vedi par. 6.10).

7.3.2 - Iniettare una aliquota della prima soluzione standard ed acquisire il cromatogramma. Il volume di iniezione deve essere uguale per standard e campioni. Quando si usa un sistema di iniezione con "loop", esso deve essere condizionato con almeno 3 volumi di campione prima dell'iniezione. L'iniezione può essere effettuata con una siringa o un autocampionatore. Nel caso si usi una siringa di plastica monouso, questa deve essere risciacquata con acqua deionizzata ed avvinata con la soluzione d'analisi prima dell'iniezione. La stessa procedura deve essere adottata per le fiale dell'autocampionatore.

Ripetere l'operazione per le altre soluzioni in modo da costruire una curva di calibrazione. Verificare la curva di calibrazione, almeno ogni 25 campioni e alla fine della sessione di analisi, mediante l'iniezione di uno standard di controllo di concentrazione compresa nell'intervallo di lavoro.

Se il valore dell'area dello standard di controllo iniettato si discosta per $\pm 5\%$ dal valore dell'area dello stesso standard utilizzato per la curva di calibrazione, è necessario rifare la calibrazione.

7.4 - Determinazione

Iniettare una aliquota del campione ed acquisire il cromatogramma. Per l'iniezione dei campioni bisogna attenersi alle stesse condizioni descritte per gli standard al paragrafo 7.3.2.

Il riconoscimento qualitativo degli anioni viene effettuato per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni standard di calibrazione. Nei casi dubbi è necessario assicurarsi della corretta attribuzione effettuando un'aggiunta nota dell'analita al campione e verificando che vi sia un aumento dell'altezza del picco cromatografico relativo.

Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa ricavando le concentrazioni dalla curva di calibrazione.

Nel caso la concentrazione del campione oltrepassasse il limite superiore della calibrazione, utilizzare delle soluzioni di calibrazione a maggiore concentrazione nei limiti imposti dal campo di applicabilità del metodo (0,1-100 mg/L). Per concentrazioni superiori si deve diluire il campione.

Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità (0,1 mg/L) possono essere analizzati aumentando il loop di iniezione fino a 200 μ L con l'effetto di aumentare la sensibilità analitica dello strumento. La preparazione degli standard e la calibrazione in questo intervallo di concentrazioni è però molto delicata, pertanto

si consiglia di preparare gli standard con la soluzione eluente e di calibrare con cinque standard nell'intervallo 0,05-0,5 mg/L.

8 - CALCOLI

La concentrazione degli anioni nel campione si ricava dalla curva di calibrazione costruita per ciascun analita.

9 - PRECISIONE E ACCURATEZZA

Il metodo è stato validato mediante un esercizio di intercalibrazione condotto da 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Questo esercizio è stato effettuato analizzando due campioni multicomponenti sintetici, preparati per lo scopo, e due

campioni certificati (acqua di pioggia artificiale SRM 2694-I e 2694-II) forniti dal National Institute of Standards (NIST). Dall'analisi ANOVA dei dati ottenuti dai laboratori, dopo eliminazione degli outlier secondo procedure standardizzate (Youden and Steiner, 1975; ISO 1994; IUPAC, 1995), si è ricavato la ripetibilità e la riproducibilità del metodo alle concentrazioni in esame in matrici sintetiche (Tab. 1). Ulteriori dati di ripetibilità e riproducibilità ottenuti per intervalli diversi di concentrazione e matrici diverse sono riportati in altri metodi ufficiali (ASTM 1991, ISO, 1992 e 1995).

L'accuratezza del metodo è stata dimostrata confrontando i valori medi di concentrazione per i tre analiti, ottenuti nell'esercizio di intercalibrazione, coi valori certificati dei materiali di riferimento (Tab. 2).

Tab. 1 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: ripetibilità e riproducibilità. Media (X), deviazione standard della ripetibilità (s_r), deviazione standard della riproducibilità (s_R), limite di ripetibilità (r); limite di riproducibilità (R) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725

	n lab	n campioni	X	s_r	s_R	r^a	$r(\%)$	R^b	$R(\%)$
cloruro	7	2	0,26	0,030	0,047	0,8	32,3	0,13	50,6
			0,43				19,5		30,6
	7	1	1,05	0,038	0,040	0,11	10,1	0,11	10,7
nitrate	6	1	13,8	0,23	0,32	0,65	4,7	0,90	6,5
	6	1	1,00	0,025	0,036	0,070	7,0	0,10	10,0
	7	2	7,09	0,18	0,26	0,50	7,0	0,73	10,3
solfato			8,65				5,8		8,4
	7	2	1,63	0,072	0,097	0,20	12,2	0,27	16,6
			2,76				7,2		9,8
	6	2	10,8	0,17	0,33	0,49	4,5	0,92	8,5
			13,8				3,6		6,7

^a $r = 2,8 s_r$

^b $R = 2,8 s_R$

Tab. 2 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: accuratezza. Media (X), intervallo di confidenza (CI), valore certificato (μ) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725

	n lab	X	CI^a	μ
cloruro	7	0,26	0,26±0,08	(0,24)*
	7	1,05	1,05±0,11	(1,0)*
nitrate	7	7,09	7,09±0,50	7,06±0,15
solfato	7	2,76	2,76±0,20	2,75±0,05
	6	10,8	10,8±0,49	10,9±0,2

^a $CI = X \pm r$

* valori indicativi non certificati

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1991): "Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography", D4327, Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia.

ISO 10304-1 (1992): "Water quality. Determination of dissolved fluoride, chloride, nitrite, orthophosphate, bromide, nitrate and sulfate ions, using liquid chromatography of ions. Part 1: Method for water with low contamination", ISO, Geneva.

ISO 5725 (1994): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", ISO, Geneva.

ISO 10304-2 (1995): "Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 2: Determination of bromide, chloride, nitrate, nitrite, orthophosphate and sulfate in waste water", ISO, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", Pure & Appl. Chem., 67, 331-343.

YOUNDEN, W. J. e STEINER E. H. (1975): "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC, Arlington, VA.

APPENDICE: 1 - VALUTAZIONE DEI PARAMETRI CROMATO-GRAFICI DI UNA SEPARAZIONE

1.1 - Valutazione del fattore di capacità k

Definendo un tempo di ritenzione corretto

$$t'_r = t_r - t_m$$

ove t_r è il tempo di ritenzione dell'analita e t_m il tempo necessario alla fase mobile per arrivare al rivelatore, si può calcolare il fattore di capacità:

$$k = t'_r / t_m$$

1.2 - Valutazione del fattore di risoluzione R

La risoluzione R tra due picchi si calcola secondo la seguente equazione:

$$R_{2,1} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{2b} + W_{1b})}$$

ove

$R_{2,1}$: è la risoluzione tra la coppia di picchi 2,1

t_{R1} : è il tempo di ritenzione, in secondi, del primo dei due picchi

t_{R2} : è il tempo di ritenzione, in secondi, del secondo picco

w_{1b} : è l'ampiezza alla base del primo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

w_{2b} : è l'ampiezza alla base del secondo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

W_{1b} , W_{2b} sono le ampiezze alla base del triangolo isoscele costruito sul picco Gaussiano, generato tracciando le tangenti ai punti di flesso (Fig. 1A).

1.3 - Valutazione dell'efficienza

L'efficienza della colonna può essere espressa in numero di piatti teorici, N , calcolati secondo la seguente equazione:

$$N = 16 (t_r / w_b)^2$$

1.4 - Valutazione del fattore di asimmetria A_s

La simmetria dei picchi viene espressa, quantitativamente, dall'equazione:

$$A_s = b/a$$

ove b e a sono le distanze della curva dalla verticale nel punto di massimo, misurate al livello del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente dopo e prima del punto di massimo (Fig. 2A).

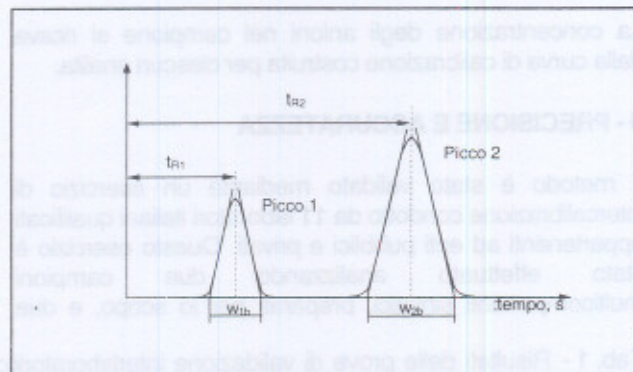


Fig. 1A - Rappresentazione grafica del calcolo della risoluzione R tra due picchi

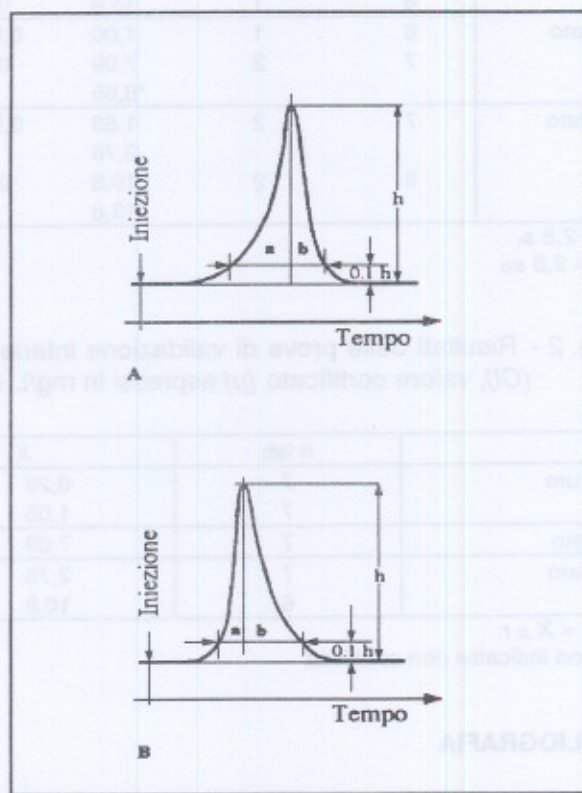


Fig. 2A - Rappresentazione grafica del calcolo del fattore di asimmetria.

DETERMINAZIONE DI MERCURIO. METODO PER SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO A VAPORI FREDDI (CV-AAS)*

A cura di Campanella L.*, Mastroianni D.***, Spezia S.***, Capri S.**, Pettine M.**, e Bettinelli M.***

* Università "La Sapienza" - Roma

** Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Roma

*** ENEL, UML, Piacenza

RIASSUNTO

Viene descritta una procedura analitica per la determinazione del mercurio totale in acque di scarico e naturali. Il campione acquoso viene sottoposto a mineralizzazione con acido nitrico in forno a microonde e analizzato mediante spettroscopia di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) in due possibili configurazioni strumentali (sistema "batch" oppure "flow injection"), utilizzando sodio boro idruro come agente riducente del mercurio (metodo A). L'impiego della trappola di oro per la preconcentrazione del mercurio mediante amalgama consente di determinare l'analita a livelli di pochi ng/L (metodo B).

SUMMARY

An analytical procedure for the determination of total mercury in wastewaters and natural waters is described. Aqueous samples are firstly digested with nitric acid by using the microwave-oven technique; the analysis of mercury is then performed by cold vapor atomic absorption spectrometry (CV-AAS) using two possible instrumental apparatus (batch system or flow injection). Sodium borohydride is used as the reducing agent for mercury in solution (Method A). The use of amalgamation traps on gold for the preconcentration of mercury lowers the detection limit of the analyte (Method B).

INTRODUZIONE

La determinazione analitica del mercurio, la sua presenza nell'ambiente acquatico, la sua speciazione e lo studio degli effetti dovuti alle varie forme in cui può essere presente costituiscono motivi di grande interesse per la comunità scientifica.

Il mercurio è caratterizzato da un tenore medio nella crosta terrestre di circa 0,08 ppm (IRSA, 1986a). Per le sue proprietà chimico-fisiche il mercurio è

largamente utilizzato in campo industriale. Il principale impiego dell'elemento è nell'industria del cloro e degli alcali (dove il mercurio è utilizzato da catodo nelle celle elettrolitiche), nella produzione di barometri, lampade, batterie, nelle applicazioni medicinali e nella fabbricazione della carta e di polveri detonanti (IRSA, 1986b). Esiste in tre stabili stati di ossidazione: (0), (I) e (II). La speciazione dell'elemento è influenzata da diversi fattori quali pH, potenziale redox e presenza di complessanti inorganici e organici. Il mercurio (II), ad esempio, forma complessi stabili con i cloruri ma anche con cisteina, amminoacidi e acidi idrossicarbossilici (Moore e Ramamoorthy, 1984). Una frazione significativa del mercurio nelle acque naturali è associata ai solidi sospesi (30 - 80%), dando luogo ad un rilevante trasporto solido per questo elemento. A livello del sedimento, il mercurio può reagire con i solfuri formando HgS insolubile; questo importante meccanismo detossificante può, però, essere annullato dalla riossigenazione del sedimento a seguito di risospensione e/o movimentazione di materiali sedimentati. Un secondo importante meccanismo di rimozione dalla fase acquosa del mercurio è costituito dalla volatilizzazione dell'elemento. Nei sedimenti, oltre che come solfuro, il mercurio può essere presente come mercurio metallico o come specie organica ed inorganica adsorbita; composti metalloorganici possono essere prodotti a seguito di processi biologici ed alcuni di questi possono essere parzialmente rilasciati alla colonna d'acqua. Nella maggior parte delle acque naturali il metilmercurio costituisce solo una piccola parte del mercurio totale (<1%). Intervalli tipici per le acque naturali sono 0,5 - 10 ng/L per il mercurio disciolto e 1 - 20 ng/L per il mercurio totale (Ferrara et al., 1986; Cossa et al., 1987).

Con l'emanazione del D. L. 130/92, recepimento della direttiva comunitaria sulla qualità delle acque idonee alla vita dei pesci, sono stati introdotti limiti più restrittivi per il mercurio rispetto alla disciplina sugli scarichi: 0,5 µg/L come valore imperativo e 0,05 µg/L come valore guida. Obiettivi di qualità ancor più stringenti sono quelli previsti dal recentissimo decreto del Ministero dell'Ambiente per la salvaguardia della laguna di Venezia (0,005 µg/L per il bacino scolante; 0,003 µg/L e 0,001 µg/L, valori imperativo e guida, rispettivamente, per la laguna).

Le metodologie analitiche standardizzate finora proposte (ISO, 1983; IRSA, 1994; APHA, 1995) forniscono un limite di rivelabilità compreso tra 0,2 e 0,5 µg/L e risultano quindi inapplicabili all'analisi del mercurio nelle acque naturali ai bassi livelli richiesti dalle normative più recenti. Emerge quindi la necessità di prevedere procedure analitiche caratterizzate da prestazioni adeguate, in termini di precisione, accuratezza, sensibilità, ai requisiti imposti dalle normative.

Un esame della bibliografia ha permesso di evidenziare come la spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) rappresenti ancora la tecnica più conveniente e diffusa per la

* Il metodo è stato discusso e approvato dal gruppo di lavoro Metalli composto da: Campanella L. (UNI-Roma), Bettinelli M. (ENEL UML-Piacenza), Camusso M. (IRSA-Brugherio), Capri S. (IRSA-Roma), Falciani R. (CSM-Roma), Manna F. (UNI-Roma), Mastroianni D. (IRSA-Roma), Muccioli G. (ENICHEM-Ravenna), Perdicaro R. (MiPA-Roma), Petruzzelli D. (IRSA-Bari), Pettine M. (IRSA-Roma), Solari M. (AUSIMONT-Milano), Spezia S. (ENEL UML-Piacenza), Torcini S. (ENEA-Roma).

determinazione del mercurio. Il mercurio (II) ottenuto dal trattamento preliminare di ossidazione del campione viene ridotto a mercurio elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura. Altre tecniche come la spettrometria di fluorescenza atomica o la ionizzazione laser (Ferrara et al., 1980; Pagano et al., 1994) sono state proposte per l'analisi del mercurio, ma, pur offrendo prestazioni superiori in termini di limiti di rivelabilità raggiungibili, rimangono di impiego limitato sia per la complessità delle apparecchiature utilizzate sia per il loro costo elevato.

La procedura analitica descritta in questo lavoro si basa anch'essa sulla spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi. Rispetto alle metodologie standardizzate citate in precedenza è prevista una rapida ossidazione preliminare (10 minuti) in forno a microonde al posto della tradizionale ossidazione con permanganato e persolfato di potassio in bagno termostatico a 95 °C per due ore. Un'opportuna aliquota di campione proveniente dal trattamento di ossidazione viene quindi sottoposta a riduzione mediante sodio boridruro utilizzando due possibili configurazioni strumentali (sistema batch oppure flow injection). Successivi arricchimenti del mercurio su una retina di oro consentono la determinazione dell'analita a livelli di ng/L.

Nota: i rischi di contaminazione ambientale per questo elemento sono elevati, si consiglia pertanto ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare disponendo di reattivi "bianchi" e soluzioni di riferimento di opportune caratteristiche e verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate ad intervalli regolari di tempo su campioni certificati prodotti da organismi internazionali.

METODO A

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il mercurio viene determinato mediante spettroscopia di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253,7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "batch" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici e la trasformazione di tutto il mercurio presente a mercurio (II). Successivamente il mercurio (II), ridotto dal sodio boro idruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale presente negli scarichi urbani e industriali nell'intervallo di concentrazione 1-50 µg/L.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Per determinare anche i composti organometallici contenenti mercurio che non reagiscono quantitativamente con il sodio boridruro è consigliabile sottoporre il campione ad un trattamento di mineralizzazione in presenza di HNO₃ (1 M) in forno a microonde. Eventuali sostanze organiche volatili possono essere eliminate nella fase di strippaggio che precede la riduzione. In tale fase viene eliminato anche l'eventuale cloro che può essere presente. La incompleta eliminazione di questi composti (sostanze organiche volatili e cloro libero) è causa di interferenza positiva poiché assorbono alla stessa lunghezza d'onda dei vapori del mercurio (253,7 nm).

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare i campioni debbono essere stabilizzati aggiungendo, subito dopo il prelievo 1 mL di HNO₃ concentrato di grado ultrapuro per ogni 100 mL di campione. L'analisi deve essere effettuata prima possibile. Per una lunga conservazione del campione si consiglia di acidificare come descritto in precedenza e quindi congelare. Qualora si voglia determinare il solo mercurio disciolto il campione deve essere filtrato attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm prima di effettuare l'aggiunta di HNO₃. Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o policarbonato o altro materiale caratterizzato da una scarsa cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO₃ 1M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza.

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Spettrofotometro ad assorbimento atomico

Corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici che consenta il montaggio della cella di misura.

5.2 - Lampada a catodo cavo a mercurio oppure del tipo senza elettrodi (EDL)

5.3 - Cella di misura in vetro o quarzo con finestre di quarzo o altro materiale trasparente a 253,7 nm

La cella di misura è fissata alla camera del bruciatore e mantenuta a temperatura ambiente; negli strumenti moderni può essere riscaldata a una temperatura di 200 °C tramite un apposito fornello elettrico al fine di prevenire eventuali condense dei vapori di mercurio durante la fase di lettura. La cella è allineata con la radiazione emessa dalla lampada a mercurio.

5.4 - Sistema flow injection

5.4.1 - Pompa peristaltica per il trasporto delle soluzioni

5.4.2 - Valvola con loop di caricamento del campione (normalmente il loop ha una capacità di 500 µL)

5.4.3 - Separatore gas - liquido

Si tratta di una membrana semipermeabile che permette solo il passaggio della fase gassosa contenente il mercurio metallico

5.4.4 - Regolatore di pressione

5.5 - Forno a microonde

Capace di generare una potenza di almeno 600 W e possibilmente in grado di monitorare sia la pressione che la temperatura all'interno dei recipienti utilizzati per la mineralizzazione.

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione dei reattivi deve essere ad elevato grado di purezza (18 MΩ·cm a 25 °C).

6.1 - Acido nitrico concentrato (d= 1,40 kg/L) di grado ultrapuro

6.2 - Acido cloridrico concentrato (d = 1,19 kg/L) di grado ultrapuro

6.3 - Soluzione di NaBH₄ al 3% in NaOH all'1%

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di politene da 1 litro contenente circa 500 mL di H₂O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di NaBH₄, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4 °C.

6.4 - Soluzione di NaBH₄ (0,2 %) in NaOH (0,05%) per sistema flow injectio

Sciogliere 0,5 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di politene da 1 litro contenente circa 500 mL di H₂O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 2 grammi di NaBH₄, quindi portare a

volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata ad una temperatura non superiore a 4 °C.

Nota: il sodio boridruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.

6.5 - Soluzione standard di mercurio (1 mg/mL)

Si consiglia di utilizzare soluzioni standard certificate di mercurio. Le soluzioni standard per la curva di calibrazione si ottengono per diluizioni successive della soluzione precedente, con acqua contenente HNO₃ all' 1%. Preparare almeno tre soluzioni standard nel campo di applicabilità del metodo.

7 - PROCEDIMENTO

7.1 - Mineralizzazione con microonde in presenza di acido nitrico

Il mercurio nei corpi idrici naturali può trovarsi sottoforma di composti organici (es. dimetilmercurio, fenilmercurio), oppure adsorbito sul particolato. Per queste ragioni al fine di determinare il contenuto di mercurio totale, il campione da analizzare deve essere preliminarmente sottoposto ad un trattamento di mineralizzazione.

La procedura di mineralizzazione con le microonde presenta notevoli vantaggi perché permette di liberare il mercurio con ottimi recuperi ed inoltre riduce notevolmente i tempi di trattamento del campione. La procedura di mineralizzazione è basata sull'esposizione controllata alle microonde di campioni in presenza di acido nitrico. Nella procedura seguita in questo lavoro le soluzioni (campioni e bianchi) acidificate con HNO₃ (concentrazione finale di acido 1 M, compresa l'aggiunta effettuata all'atto del prelievo), sono state poste in contenitori di teflon PFA chiusi ermeticamente e sottoposte a mineralizzazione per almeno 10 minuti erogando una potenza variabile tra 250 e 600 W.

Il volume di campione da sottoporre a mineralizzazione, la durata della stessa e la potenza erogata potranno tuttavia essere ottimizzati in funzione della strumentazione disponibile e della particolare matrice analizzata. Vengono riportati due esempi di sistemi per la mineralizzazione con microonde, uno dotato di controllo della temperatura applicata (Tab. 1) e l'altro che si basa sulla variazione delle potenze erogate (Tab. 2).

In entrambi i casi sono stati utilizzati contenitori a media pressione (max 30 bar) in teflon, liner interno di capacità da 45 mL (massimo volume consigliato 15 mL). L'efficacia della procedura di mineralizzazione è stata verificata in presenza di composti organomercurici. Questi composti non possono essere determinati con la tecnica a vapori freddi se prima non vengono decomposti e non vengono liberati ioni mercurici (II).

Tab. 1 - Microonde con controllo della temperatura

Stadio	Potenza (Watt)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	250	2	80
2	400	3	130
3	600	5	170

Tab. 2 - Microonde con controllo delle potenze erogate

Stadio	Potenza (Watt)	Tempo (min)
1	250	2
2	400	3
3	600	3
4	0	1
5	600	2

In Tab. 3 sono riportati i recuperi ottenuti con soluzioni a diversa concentrazione di cloruro di fenilmercurio, mercurio acetato ed etil mercurio. Per ogni prova sono state condotte cinque repliche. Recuperi non soddisfacenti (40-50%) sono stati ottenuti, invece, riscaldando la soluzione del composto organomercurico in presenza di HNO₃ 1M a 140 °C in stufa per un'ora. Anche in questo caso sono stati utilizzati recipienti in teflon chiusi ermeticamente.

Tab. 3 - Recupero di composti organomercurici dopo attacco con HNO₃ 1 M in forno a microonde

Valore atteso (µg/L)	Valore trovato (µg/L)
<i>Fenilmercurio</i>	
5	5,79 ± 0,21
5	5,65 ± 0,16
10	10,2 ± 0,15
12	12,4 ± 0,18
<i>Mercurio acetato</i>	
10	10,4 ± 0,58
<i>Etil Mercurio</i>	
35	35,6 ± 0,32

Qualora risulti necessario lavorare in condizioni diverse da quelle descritte nel metodo (per esempio trattare campioni ad elevato carico organico), utilizzare, ad esempio, digestori in teflon capaci di sopportare pressioni più elevate (≥ di 250 PSI), allungare i tempi di esposizione alle microonde, aumentare la concentrazione di HNO₃ (oltre 2 M) e aggiungere una soluzione di KMnO₄.

7.2 - Determinazione

7.2.1 - Metodo della calibrazione esterna con il sistema batch

Preparare una curva di calibrazione all'inizio di ogni ciclo analitico utilizzando soluzioni di lavoro in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate ed analizzare tutte le soluzioni e il bianco nelle stesse condizioni strumentali.

7.2.2 - Metodo delle aggiunte note con il sistema batch

I sistemi attuali di correzione del fondo non sono in grado di rimuovere l'eventuale effetto prodotto da alcune specie chimiche costituenti la matrice del campione. Per effettuare determinazioni accurate in questi casi è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Procedere, quindi, alla determinazione del mercurio considerando il valore del bianco dei reattivi come indicato in seguito.

Il campione proveniente dal trattamento di mineralizzazione viene suddiviso in quattro aliquote, delle quali una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni di mercurio dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione, sulla base di letture preliminari riferite ad una retta di taratura esterna.

Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco mediante uno spettrofotometro ad assorbimento atomico equipaggiato con il sistema batch alla lunghezza d'onda di 253,7 nm, utilizzando una fenditura di 0,7 nm e il correttore di fondo inserito. Trasferire aliquote di 10 mL nel recipiente di reazione e utilizzare argon UPP come gas di trasporto.

La concentrazione totale di mercurio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

7.2.3 - Condizioni operative per il sistema batch

Si riportano a titolo di esempio le condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio in assorbimento atomico con il sistema batch.

Purge 1	5 sec	lettura
Reazione	15 sec	
Purge 2	40 sec	
temp. cella	200 °C	

La fase "purge 1" ha lo scopo di eliminare dal campione composti volatili che possono interferire nella misura; per assicurare una eliminazione completa si può aumentare opportunamente la durata del purge 1. Durante la fase di reazione con NaBH₄ il mercurio (II) viene ridotto a mercurio metallico che viene trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar)

nella cella di misura. La fase "purge 2" consente la pulizia del sistema e la sua preparazione alla lettura del successivo campione.

7.2.4 - Condizioni operative per il sistema flow injection.

La procedura di analisi con il sistema flow injection è condotta utilizzando la soluzione riducente (6.4) e la soluzione di trasporto costituita da HCl al 3% (w/v). Si ricorre al metodo della calibrazione esterna o alla tecnica delle aggiunte note, seguendo le modalità già descritte nei paragrafi 7.2.1 e 7.2.2.

In Tab. 4 si riportano a titolo di esempio le condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio in assorbimento atomico con il sistema flow injection, il cui schema di funzionamento è riportato in Fig. 1.

8 - CALCOLI

8.1 - Calcolo della concentrazione determinata mediante il metodo della calibrazione esterna

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione del mercurio nel campione utilizzando la curva di calibrazione. Nel caso in cui sia stata eseguita una diluizione del campione, occorre moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

8.2 - Calcolo della concentrazione determinata mediante il metodo delle aggiunte note

La concentrazione di mercurio nel campione analizzato può essere calcolata graficamente o analiticamente.

Tab. 4 - Analisi del mercurio con il sistema flow injection

Stadio	Tempo (s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Posizione valvola	Lettura
0	15	sì	sì	Riempimento	
1	10	sì	sì	Riempimento	
2	20	no	sì	Iniezione	si

T(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2.

rpm = giri/min.

Temperatura cella: 200 °C.

Flusso di argon: 90 mL/min.

Volume di campionamento: 500 µL.

Flusso carrier (HCl): 10 mL/min.

Flusso riducente (NaBH₄): 6 mL/min.

8.2.1 - Procedimento grafico.

Costruire la retta standard con le concentrazioni aggiunte (µg/L) sull'asse delle ascisse e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, sull'asse delle ordinate. L'assorbanza del campione, a concentrazione incognita, viene posta sull'asse delle ordinate a concentrazione aggiunta di analita uguale a zero. La concentrazione incognita di mercurio si ricava dall'intercetta della retta sperimentale con l'asse delle x, misurando con la stessa scala di concentrazione il segmento compreso tra il punto di intersezione suddetto e il punto d'incontro degli assi x e y.

8.2.2 - Procedimento analitico.

Siano C₀, C₁, C₂, C₃, rispettivamente le concentrazioni del campione incognito senza aggiunta (C₀) e quelle del campione con la 1°, 2°, 3° aggiunta. A₀, A₁, A₂, A₃, saranno le corrispondenti assorbanze. Il calcolo della concentrazione incognita del campione (C₀) potrà effettuarsi con la relazione seguente:

$$C_0 = A_0 / f$$

in cui A₀ è l'assorbanza del campione senza aggiunte e f è il valore medio dei rapporti degli incrementi di assorbanza e dei corrispondenti incrementi di concentrazione.

9 - PRECISIONE

Prove effettuate (n=5) con entrambe le procedure di analisi descritte (batch e flow injection) su campioni di acqua deionizzata addizionati con mercurio inorganico alle concentrazioni indicate hanno fornito i seguenti intervalli di valori di ripetibilità espressi come coefficiente di variazione percentuale (CV):

Concentrazione (µg/L)	CV %
0,5	4,5 - 5,5
1,0	3,5 - 4,0
2,0	3,0 - 3,5
5,0	1,5 - 2,0
10,0	1,5 - 2,0

9.1 - Limite di rivelabilità

Effettuando 10 determinazioni su campioni con un contenuto di mercurio di 0,5 µg/L si è potuto calcolare una concentrazione minima determinabile, espressa come tre volte la deviazione standard, di 0,1 µg/L.

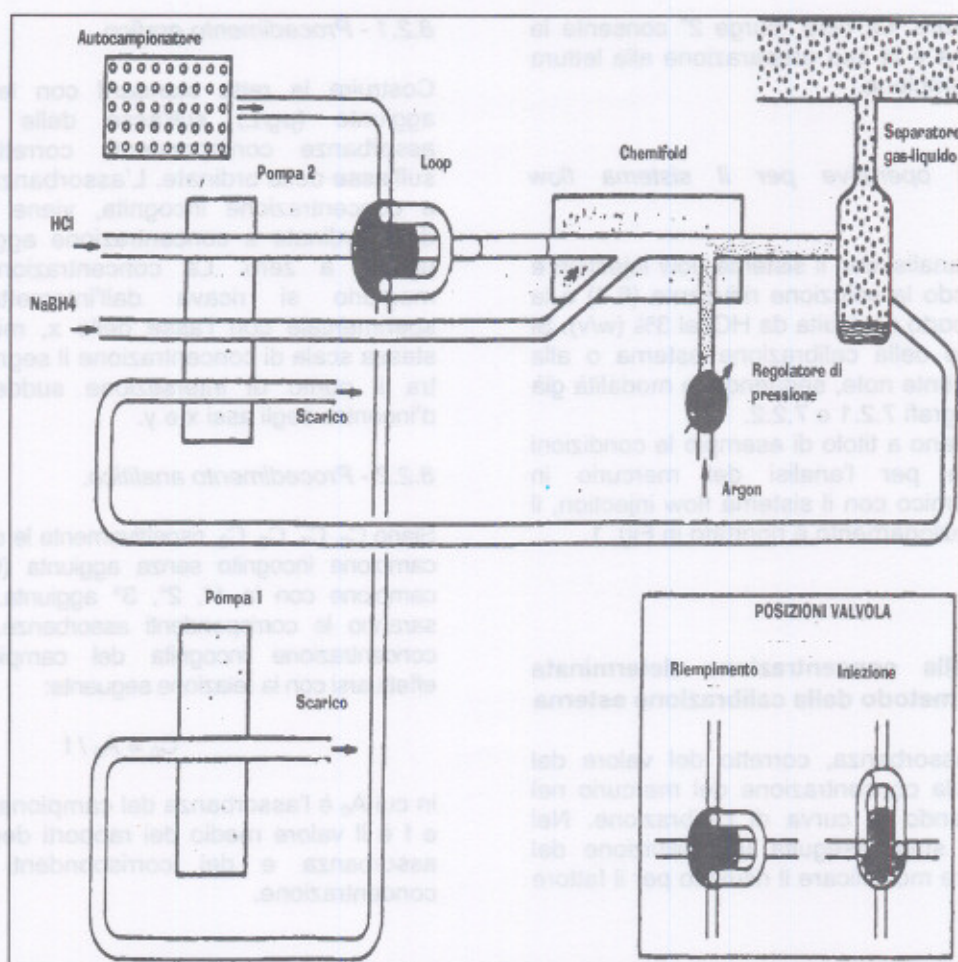


Fig. 1 – Rappresentazione schematica del sistema flow injection

METODO B

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il mercurio viene determinato mediante spettroscopia di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253,7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: il sistema batch oppure il flow injection. Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici e la trasformazione di tutto il mercurio presente a mercurio (II). Successivamente il mercurio (II), ridotto dal sodio boro idruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte dapprima su una retina di oro (amalgama) e, successivamente, nella cella di misura.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale presente negli scarichi urbani, industriali e nelle

acque naturali nell'intervallo di concentrazione 0,01-1 µg/L.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Vale quanto riportato al punto 3 del metodo A.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare considerando le basse concentrazioni di mercurio da analizzare, il campionamento e la conservazione dei campioni possono rappresentare se effettuati erroneamente, una importante sorgente di contaminazione. Per ridurre drasticamente questo rischio effettuare il prelievo con recipienti (polipropilene o policarbonato o altro materiale caratterizzato da una irrilevante capacità di cessione e adsorbimento di metalli) preventivamente trattati con HNO₃ 1 M per 48 ore e quindi neutralizzati effettuando lavaggi con acqua ad elevato grado di purezza. I campioni debbono essere

stabilizzati aggiungendo, subito dopo il prelievo 1 mL di HNO_3 concentrato di grado ultrapuro per ogni 100 mL di campione. L'analisi deve essere effettuata prima possibile e, comunque, entro una settimana. Qualora si voglia determinare il solo mercurio disciolto, il campione deve essere filtrato sotto pressione con corrente d'azoto di grado ultrapuro attraverso un filtro a membrana in policarbonato da $0,45 \mu\text{m}$ (precedentemente condizionato secondo la procedura descritta per i contenitori), prima di effettuare l'aggiunta di HNO_3 .

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Spettrofotometro ad assorbimento atomico

Corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici che consenta il montaggio della cella di misura e del dispositivo per l'arricchimento del mercurio mediante amalgama su oro.

5.2 - Lampada a catodo cavo a mercurio oppure del tipo senza elettrodi (EDL).

5.3 Cella di misura.

Vale quanto riportato al punto 5.3 del metodo A.

5.4 - Sistema di iniezione flow injection.

5.4.1 - Pompa peristaltica per il trasporto delle soluzioni.

5.4.2 - Valvola con loop di caricamento del campione da $1000 \mu\text{L}$.

5.4.3 - Separatore gas - liquido.

Si tratta di una membrana semipermeabile che permette solo il passaggio della fase gassosa contenente il mercurio metallico.

5.4.4 - Regolatore di pressione.

5.5 - Forno a microonde.

Vale quanto riportato al punto 5.5 del metodo A.

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione dei reattivi deve essere ad elevato grado di purezza ($18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ a 25°C).

6.1 - Acido nitrico concentrato ($d = 1,40 \text{ kg/L}$) di grado ultrapuro.

6.2 - Acido cloridrico concentrato ($d = 1,19 \text{ kg/L}$) di grado ultrapuro.

6.3 - Soluzione di NaBH_4 al 3% in NaOH all'1%.

Vale quanto riportato al punto 6.3 del metodo A.

6.4 - Soluzione di NaBH_4 (0,2%) in NaOH (0,05%) per sistema flow injection.

Sciogliere 0,5 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di politene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 2 grammi di NaBH_4 , quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata ad una temperatura non superiore a 4°C .

Nota: il sodio boroidruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.

6.5 - Soluzione standard di mercurio (1 mg/mL)

Vale quanto riportato al punto 6.5 del metodo A.

7 - PROCEDIMENTO

7.1 - Mineralizzazione con microonde in presenza di acido nitrico.

Vale quanto riportato al punto 7.1 del metodo A.

7.2 - Determinazione

7.2.1 - Metodo della calibrazione esterna con il sistema batch e amalgama su oro.

Vale quanto riportato al punto 7.2.1 del metodo A.

7.2.2 - Metodo delle aggiunte note con il sistema batch e amalgama su oro.

Procedere alla determinazione del mercurio utilizzando la tecnica delle aggiunte note e considerando il valore del bianco dei reattivi come indicato in seguito. Il campione proveniente dal trattamento di mineralizzazione viene diviso in quattro aliquote da 10 mL, delle quali una rimane tale quale, mentre le altre vengono addizionate di concentrazioni crescenti di mercurio, dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione sulla base di letture preliminari riferite ad una retta di taratura esterna. Misurare l'assorbimento delle quattro soluzioni e del bianco con uno spettrofotometro di assorbimento atomico equipaggiato con il sistema batch e amalgama su oro (Fig. 2) alla lunghezza d'onda di $253,7 \text{ nm}$, utilizzando una fenditura di $0,7 \text{ nm}$ e il correttore di fondo inserito. Trasferire ciascuna aliquota da 10 mL nel recipiente di reazione e utilizzare argon UPP come gas di trasporto.

Il numero degli arricchimenti va ottimizzato dall'operatore al fine di ottenere una idonea risposta strumentale. La concentrazione totale di mercurio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

7.2.3 - Condizioni operative per il sistema in batch e amalgama su oro.

A titolo di esempio si riportano alcune tipiche condizioni operative:

Purge 1	40 sec	
Reazione	10 sec	lettura
Purge 2	30 sec	
temp.cella	200 °C	

Durante la fase di reazione con NaBH_4 il mercurio (II) viene ridotto a mercurio metallico e trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) su una retina di oro sulla quale il mercurio si amalgama consentendo, attraverso successivi arricchimenti, di aumentare la sensibilità strumentale. Effettuare quindi il riscaldamento ($T=200^\circ\text{C}$) della retina di oro; in questa fase l'apertura di una valvola consente il passaggio di un flusso di argon (purificato a seguito del passaggio attraverso una maglia di oro) che trasferisce il mercurio atomico nella cella di misura.

7.2.4 - Condizioni operative per il sistema flow injection e amalgama su oro.

La procedura di analisi con il sistema flow injection è condotta utilizzando la soluzione riducente (6.4) e la soluzione di trasporto costituita da HCl al 3% (w/v). Si ricorre al metodo della calibrazione esterna o alla tecnica delle aggiunte note.

In Tab. 5 si riportano a titolo di esempio le condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio in assorbimento atomico con il sistema flow injection e amalgama su oro.

Tab. 5 - Analisi del mercurio con il sistema flow injection e amalgama su oro

Stadio	Tempo (s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Posizione valvola	Lettura
Pre-fill	15	sì	sì	Riempimento	
1	10	sì	sì	Riempimento	
2	20	no	sì	Iniezione	
3	20	no	sì	Iniezione	sì

T(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2.

rpm = giri/min.

Temperatura cella: 200°C .

Flusso di argon: 90 mL/min.

Volume di campionamento: 1000 μL .

Flusso carrier (HCl): 10 mL/min.

Flusso riducente (NaBH_4): 6 mL/min.

Al fine di ottenere una idonea risposta strumentale l'operatore dovrà realizzare un opportuno arricchimento del mercurio sull'amalgama mediante ripetizione degli stadi 1 e 2. Passare quindi allo stadio n° 3, effettuando il riscaldamento ($T=200^\circ\text{C}$) della retina di oro contenuta nell'amalgama; in questa fase l'apertura di una valvola consente il passaggio di un flusso di argon che trasferisce il mercurio atomico nella cella di misura.

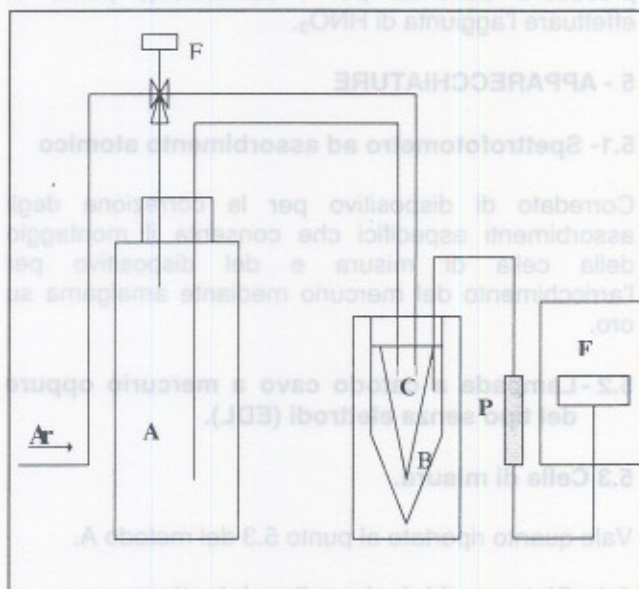


Fig. 2 - Esempio schematico del sistema batch. A = recipiente del riducente; B = contenitore di reazione; C = cono di immissione del riducente; P = amalgama; F = cella di misura; E = valvola multivie

8 - CALCOLI

Vale quanto riportato ai punti 8.1, 8.2.1 e 8.2.2 del metodo A.

9 - PRECISIONE

Prove effettuate ($n=5$) con entrambe le procedure di analisi descritte (batch + amalgama e flow injection + amalgama) su campioni di acqua deionizzata addizionati con mercurio inorganico alle concentrazioni indicate hanno fornito i seguenti intervalli di valori di ripetibilità espressi come coefficiente di variazione percentuale (CV):

Concentrazione (ng/L)	CV %
50	3,0 - 4,0
100	3,0 - 3,5
200	3,5 - 4,0
500	2,5 - 3,0
1000	1,5 - 2,0

Nelle misure condotte con il sistema in batch sono stati effettuati tre arricchimenti da 10 mL ciascuno, mentre con il flow injection sono stati concentrati sull'amalgama 30 mL di campione.

9.1 – Limite di rivelabilità

Effettuando 10 determinazioni su campioni con un contenuto di mercurio di 10 ng/L si è potuto calcolare una concentrazione minima determinabile, espressa come tre volte la deviazione standard, di 6 ng/L.

CONCLUSIONI

La procedura analitica descritta può essere efficacemente impiegata nella determinazione del mercurio totale in acque di scarico. Si tratta di una procedura operativamente semplice che include una fase di digestione che prevede, rispetto alle procedure standardizzate tradizionali, l'impiego di un limitato numero di reattivi e una ridotta manipolazione del campione. In tal modo vengono minimizzati i rischi di contaminazione ambientale, particolarmente rilevanti nella determinazione dell'analita in oggetto e ridotti i rischi per la salute degli operatori preposti alle operazioni di controllo.

Il ricorso alla formazione di amalgama con oro consente il dosaggio del mercurio a livelli di pochi ng/L, rendendo possibile l'estensione della procedura indicata all'analisi di acque superficiali e sotterranee per verificare il rispetto delle normative più severe in materia di controllo delle acque.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1995): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XVIII Ed., (Washington), 3-18/3-20.

Cossa S. e Noel J. (1987): "Concentration of mercury in near shore surface waters of the Bay of Biscay and in the Gironde estuary", *Mar. Chem.*, **20**, 389-396.

Ferrara R., Seritti A., Barghigiani C. e Petrosino A. (1986): "Mercury levels in the dissolved and particulate fractions of the Tyrrhenian sea", *Mar. Chem.*, **18**, 227-232.

Ferrara R., Seritti A., Barghigiani C. e Petrosino A. (1980): "Improved instrument for mercury determination by atomic fluorescence spectrometry with a high-frequency electrodeless discharge lamp", *Analyt. Chim. Acta*, **117**, 391-395.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 17-20.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 244-252.

IRSA (1994): "Metodi analitici per le Acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, 133-136.

ISO (1983): "Determination of total mercury by flameless atomic absorption spectrometry - Part 1: Method after digestion with permanganate-peroxodisulfate", 5666/1, 16-21.

Moore J. W. e Ramamoorthy S. (1983): "Heavy metals in natural waters-Applied monitoring and impact assessment", De Santo Ed., Springer-Verlag, New York.

Pagano S. T., Smith B. W. e Winefordner J. D. (1994): "Determination of mercury in microwave-digested soil by laser-excited atomic fluorescence spectrometry with electrothermal atomization", *Talanta*, **41**, 2073-2078.

APPENDICE 1

I vapori di mercurio metallico prodotti a seguito della reazione con sodio boro idruro sono altamente tossici e rappresentano, se inalati, un serio pericolo per l'operatore. Si consiglia pertanto di procedere ad un intrappolamento di tali vapori. Ciò si realizza attraverso un sistema a circolazione chiusa come quello riportato in Fig. 3.

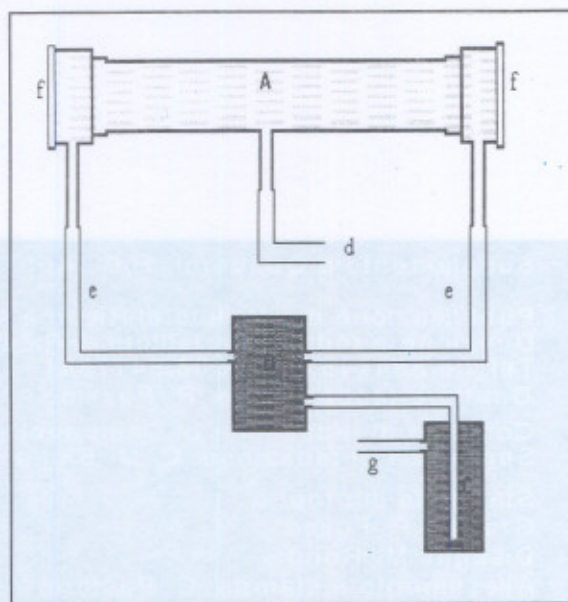


Fig. 3 - Descrizione schematica del sistema a circolazione chiusa utilizzato per intrappolare i vapori di mercurio.

I vapori di mercurio elementare vengono trasportati mediante un flusso di gas inerte (Ar) attraverso il tubo (d) nella cella di misura (A), chiusa all'estremità da finestre (f) costituite di materiale trasparente a 253,7 nm. Successivamente vengono convogliati tramite i tubi di collegamento (e) prima in una Drain Trap (B) e poi in una trappola (C) contenente un filtro a carbone attivo che trattiene il mercurio. L'uscita della trappola a carbone attivo (g) è collegata, tramite un tubo, ad una cappa aspirante provvista anche essa di filtro in carbone attivo. Il carbone attivo deve essere sostituito periodicamente e sottoposto a smaltimento nel rispetto delle normative vigenti.

APPENDICE 2 - NORME PRECAUZIONALI PER L'UTILIZZO DELLE MICROONDE NEI LABORATORI CHIMICI.

Esistono molte raccomandazioni d'uso e norme di sicurezza specifiche per ogni modello di forno a microonde. In questa appendice non potendo farne

una lista completa ci si limiterà a riportare alcune prescrizioni fondamentali rimandando per informazioni più dettagliate al manuale d'uso dello strumento e alla consultazione di un documento IRSA in fase di elaborazione.

Durante la mineralizzazione la pressione all'interno dei contenitori può raggiungere valori elevati: si consiglia pertanto l'uso di contenitori idonei e provvisti di valvole di sfogo. Deve inoltre essere assicurata una efficace aspirazione dall'interno del forno a microonde ad una cappa per evitare che la rottura della valvola di sfogo di un contenitore possa immettere nell'ambiente vapori acidi con pericolo per l'operatore. Lo strumento deve essere a chiusura ermetica e dotato di sistemi di sicurezza automatici in grado di interrompere l'emissione di microonde ed inoltre deve avere una idonea schermatura per evitare la dispersione delle microonde nell'ambiente esterno. Ciò è necessario per prevenire l'esposizione degli operatori alle radiazioni. In ogni caso si deve evitare l'uso di forni a microonde di tipo domestico.

istituto di ricerca sulle acque - cnr NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a Quaderni, 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma
Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta
Segreteria di redazione: C. M. Blundo

Stampato in proprio

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allattamento e stampa: C. Pastore