

EDITORIALE

Nell'ambito degli organi preposti alla standardizzazione dei metodi analitici (agenzie di protezione ambientale, commissioni nazionali e internazionali di standardizzazione) e della comunità scientifica in genere è ormai convinzione diffusa che, esaurita la fase - iniziata negli anni '70 - di messa a punto e sviluppo di metodologie analitiche per i parametri inseriti nelle diverse normative di tutela ambientale, si debba procedere ad una rigorosa revisione delle metodologie stesse attraverso l'adeguamento dei metodi correnti ai progressi in campo scientifico-tecnologico, la cancellazione di quelli ormai obsoleti, l'elaborazione di protocolli analitici meno dettagliati ma più flessibili e caratterizzati da prestazioni note in termini di precisione e accuratezza.

In questa operazione di revisione, una riduzione significativa degli scarichi prodotti nell'attività di controllo e dei rischi per la salute degli addetti costituisce certamente uno degli obiettivi da perseguire. Un contributo in tal senso può venire dal progressivo abbandono delle tecniche di estrazione liquido-liquido a favore dell'estrazione liquido-solido o con fluidi supercritici.

La proposta di metodo per l'analisi dei fenoli mediante estrazione liquido-solido con carbon black grafitizzato ed analisi in HPLC-UV e l'applicazione di un modello di validazione al metodo di analisi dei principali anioni in cromatografia ionica, oggetto dei due contributi presentati in questo numero del Notiziario, testimoniano l'intenzione dell'Istituto di orientare nelle direzioni precedentemente indicate le attività connesse alla standardizzazione dei metodi analitici.

Naturalmente per il conseguimento dei suddetti obiettivi fondamentale è l'apporto degli operatori del settore; a loro si rivolge il questionario riguardante le metodologie più correntemente utilizzate nell'attività di controllo. Tale questionario servirà all'Istituto per acquisire quelle informazioni di base necessarie a pianificare le attività future di standardizzazione in modo ancora più aderente alle esigenze degli operatori.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, gennaio 1997

DOSAGGIO DI FENOLI NELLE ACQUE: ESTRAZIONE PER MEZZO DI UNA CARTUCCIA DI CARBON BLACK GRAFITIZZATO E QUANTIFICAZIONE MEDIANTE HPLC

A. Di Corcia\*, G.M. Passariello\*\*, S. Marchese\* e S. Capri\*\*

\*Dip. di Chimica Università "La Sapienza", Roma,

\*\*CNR, Istituto di Ricerca Sulle Acque, Roma

RIASSUNTO--

Viene presentato un metodo per la determinazione dei fenoli nelle acque basato sull'estrazione in fase solida mediante carbon black grafitizzato ed analisi in HPLC-UV. Tale metodo prevede come prova di conferma la determinazione su un'aliquota dell'estratto degli acetilfenati ottenuti mediante derivatizzazione dei composti fenolici con anidride acetica. Dal confronto tra i tempi di ritenzione dei composti fenolici e dei derivati con quelli dei rispettivi standard è possibile ridurre al minimo la probabilità di falsi positivi.

SUMMARY

A method for determining phenol pollutants in environmental waters is described. The method requires a liquid-solid extraction of phenols by grafitized carbon black.

INDICE

EDITORIALE	1
DOSAGGIO DI FENOLI NELLE ACQUE: ESTRAZIONE PER MEZZO DI UNA CARTUCCIA DI CARBON BLACK GRAFITIZZATO E QUANTIFICAZIONE MEDIANTE HPLC	1
PROBLEMI DI TARATURA NELL'ANALISI DI ANIONI MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA IONICA SOPPRESSA	10
INFORMAZIONI	22
QUESTIONARIO	23

After the eluant is concentrated the phenols are separated and quantitated by reversed-phase liquid chromatography with UV detection.

Confirmatory analysis can be performed by reversed-phase HPLC-UV determination of the acetylderivatives of phenolic compounds.

## INTRODUZIONE

I fenoli sono inquinanti di rilevante interesse ambientale per la loro diffusione, risultato di differenti attività antropiche, in special modo industriali ed agricole, e per la loro tossicità nei confronti della vita acquatica e della salute umana.

Composti fenolici sono presenti negli scarichi delle industrie della plastica, dei coloranti e delle cartiere (IRSA, 1987). I cloro e i nitro-fenoli sono i maggiori prodotti di degradazione degli erbicidi appartenenti alla classe dei fenossiacidi clorurati e degli organofosforati (Lacorte e Barcelo, 1994). Inoltre, i fenoli possono derivare dalla biodegradazione di prodotti naturali quali gli acidi umici e la lignina.

I fenoli, specialmente quelli clorurati, sono pericolosi per la salute umana anche quando sono presenti nelle acque a basse concentrazioni. La direttiva 80/778 della Comunità Economica Europea sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, recepita dalla legislazione italiana (DPR 236/88), fissa una massima concentrazione ammissibile (MAC) per i fenoli di 0,5 µg/L. Tuttavia, la scelta di un limite cumulativo per una classe di composti caratterizzati da struttura chimica, reattività e pericolosità diverse è ancora oggetto di dibattito in ambito comunitario. L'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS), in un recente documento, prende in considerazione quali sostanze nocive per l'uomo solo alcuni composti fenolici, fissando un MAC di 200 µg/L per il 2,4,6 - triclorofenolo e di 9 µg/L per il pentaclorofenolo. Quest'ultimo valore costituisce un limite guida per altri composti della classe utilizzati anch'essi come pesticidi.

L'OMS, inoltre, raccomanda un MAC di 10 µg/L per il 2-clorofenolo e di 40 µg/L per il 2,4-diclorofenolo; questi ultimi due valori sono stati stabiliti tenendo conto della capacità di questi composti di alterare le caratteristiche organolettiche di un'acqua al di sopra delle concentrazioni suddette.

L'Agenzia Americana per la Protezione Ambientale (US-EPA), inoltre, ha individuato undici fenoli come inquinanti prioritari ed ha assegnato a questi composti valori di MAC compresi tra 60 e 400 µg/L secondo il loro grado di tossicità (EPA, 1984a).

Tra le procedure standard per l'analisi dei fenoli la più nota si basa sulla reazione che ha luogo tra questi e la 4-amminoantipirina; tale reazione porta alla formazione di un composto colorato che viene rivelato spettrofotometricamente. Oltre alla scarsa sensibilità, tale metodo non differenzia i vari fenoli e gran parte di quelli sostituiti in para non reagiscono (Fontaine et al., 1974).

Allo scopo di giudicare con sufficiente sicurezza se gli standard imposti sono o non stati superati, sono necessari, invece, metodi analitici di sufficiente accuratezza e sensibilità in grado di apprezzare concentrazioni almeno dieci volte inferiori a questi, dell'ordine dei ng/L. Tra le tecniche strumentali, la gas cromatografia (EPA, 1984b; Bucholz e Pawliszyn, 1993), la gas cromatografia-spettrometria di massa (Elchelberger et al., 1983; EPA, 1984b) e la cromatografia liquida (Fritz, 1993; Brouwer e Brinkman, 1994; Coquart e Hennion, 1992; Puig e Barcelo, 1995; Di Corcia et al., 1994a) unite ad opportune procedure di preconcentrazione del campione, sono particolarmente indicate per la determinazione di composti fenolici in matrici complesse. Fino a qualche anno fa l'isolamento dei fenoli dalla matrice acquosa era invariabilmente eseguita mediante estrazione liquido-liquido (LLE). Questa tecnica è lenta, richiede una eccessiva manipolazione del campione con conseguente sua possibile contaminazione e fa uso di grandi quantità di solventi costosi, infiammabili e nocivi; inoltre, risulta inadeguata per composti polari molto idrofili e non si presta all'estrazione "in situ" del campione acquoso operazione che elimina i problemi di inquinamento, trasporto e conservazione di elevati volumi di acqua.

Tutte queste difficoltà hanno condotto allo sviluppo della tecnica di estrazione in fase solida (SPE) per mezzo di piccole cartucce contenenti adatti solidi adsorbenti. Il procedimento alla base della SPE è semplice e rapido: consiste nel far passare il campione attraverso la cartuccia contenente il solido adsorbente (0,3-1 g) e nella successiva eluizione degli analiti con piccoli volumi di una opportuna fase mobile.

L'estrazione in fase solida rispetto alla estrazione liquido-liquido presenta i seguenti vantaggi:

- 1) La manipolazione del campione, l'uso di vetreria e i volumi di solventi organici impiegati sono significativamente ridotti.
- 2) Le condizioni di spedizione e di conservazione del campione sono notevolmente semplificate, poichè il campione d'acqua può essere direttamente estratto nel sito di campionamento e l'estratto può essere agevolmente trasportato al laboratorio per le successive fasi dell'analisi.
- 3) Il tempo di analisi è drasticamente ridotto.
- 4) L'efficienza di estrazione per composti polari è maggiore.

Tra gli adsorbenti l'octadecilsilice, silice chimicamente modificata con catene alchiliche aventi 18 atomi di carbonio, risulta certamente il più popolare. Diversi protocolli analitici sviluppati per l'analisi di fenoli nelle acque prevedono l'impiego di cartucce contenenti detto adsorbente. Tuttavia la C-18 trattiene bene i composti poco polari, mentre quelli polari (fenolo, 4-nitrofenolo) sono poco trattenuti campionando elevati volumi di acqua.

I carbon black grafitizzati (GCB) si sono dimostrati ottimi materiali adsorbenti per l'estrazione di pesticidi, cloroaniline e alchilbenzensolfonati da campioni acquosi (Cai et al., 1995; Di Corcia et al., 1993; Di

Corcia et al., 1994b). I GCB, adsorbenti aspecifici e non porosi, si ottengono per riscaldamento a 2700-3000 °C del carbon black. Attualmente, per la SPE, è disponibile in commercio un GCB, Carbograph-1, avente una superficie non porosa, sostanzialmente non polare ed omogenea con un'area superficiale di 100 m<sup>2</sup>/g.

Pur essendo considerato omogeneo, tale materiale contiene piccole quantità di eterogeneità geometriche e chimiche. La natura delle eterogeneità chimiche presenti sulla superficie del Carbograph-1 è stata investigata mediante analisi polarografica; è stata dimostrata la presenza di gruppi chinonici, fenolici, carbossilici e di gruppi chimici ossigenati aventi la struttura di sali di benzopirilio (Campanella et al., 1982). La presenza di questi ultimi gruppi, capaci di scambiare anioni, è stata sfruttata con successo per il frazionamento di pesticidi neutro-basici da quelli acidi (Di Corcia e Marchetti, 1992).

Recentemente, è stato sviluppato un metodo analitico veloce, sensibile e accurato per la determinazione degli 11 Fenoli della USEPA nelle acque mediante SPE con cartucce da un grammo di Carbograph-1 e analisi dell'estratto all'HPLC con rivelatore spettrofotometrico UV-Vis. Tale metodo prevede come prova di conferma dell'eventuale presenza di composti fenolici la divisione dell'estratto in due aliquote; mentre una viene analizzata tal quale, l'altra viene fatta reagire in ambiente basico a caldo con anidride acetica per convertire i fenoli in acetilfenati e analizzata nelle stesse condizioni della prima. Mediante il confronto dei tempi di ritenzione dei due estratti con quelli dei rispettivi standards si riducono al minimo le probabilità di avere falsi positivi.

Con questo metodo di analisi sono stati campionati 2 litri di acqua di rubinetto, 1 litro di acqua di superficie e 0,05 litri di acqua di scarico proveniente da un depuratore, a flussi di 50-70 mL/min, con fattori di arricchimento fino a 10000 volte e recuperi superiori al 90%.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficienza del metodo suddetto su matrici acquose ambientali, contaminate artificialmente con quantità note di fenoli e l'applicazione del medesimo all'analisi di campioni potenzialmente soggetti ad un inquinamento da composti fenolici.

## 1 - PARTE SPERIMENTALE

### 1.1 - Reattivi e prodotti chimici

Gli standards dei fenoli furono acquistati da differenti fornitori. Le soluzioni standard individuali furono preparate sciogliendo 100 mg di ciascun fenolo in 100 mL di metanolo. Per le prove di recupero fu preparata una soluzione di lavoro contenente tutti gli undici fenoli combinando 1 mL di ognuna delle 6 soluzioni individuali (4-nitrofenolo, 2,4-dinitrofenolo, 2-nitrofenolo, 4,6-dinitro-2-metilfenolo, 2,4-dicloro-2-metilfenolo e pentacloro-2-metilfenolo) con 2 mL di ciascuna delle 5 soluzioni individuali (fenolo, 2-cloro-2-metilfenolo, 2,4-

dimetilfenolo, 4-cloro-2-metilfenolo, 2,4,6-tricloro-2-metilfenolo) e diluendo a 100 mL con metanolo.

Per l'analisi all'HPLC, l'acqua distillata era ulteriormente purificata passandola attraverso un apparecchio Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Acetonitrile e metanolo (Lichrosolv: Gradient Grade) furono acquistati dalla Merck (Darmstadt, Germany). Il cloruro di metilene (Pesticide Grade) fu acquistato dalla Fluka AG (Buchs, Svizzera).

L'acido trifluoroacetico (TFA) fu acquistato dalla Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), il tetrabuttilammoniocloruro (TBACl) dalla Fluka AG e il tiosolfato di sodio pentaidrato dalla Merck.

### 1.2 - Apparecchiatura per la sperimentazione

L'apparato per l'estrazione in fase solida fu preparato nel nostro laboratorio riempiendo con 1 g di Carbograph-1 (area superficiale 100 m<sup>2</sup>/g e dimensioni delle particelle comprese tra 120-400 mesh) una cartuccia (6,5 cm x 1,3 cm id) per uso medico in polipropilene avente sul fondo un setto circolare di polietilene (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Un secondo setto fu posto sul letto dell'adsorbente delicatamente, per evitare una possibile rottura delle particelle con conseguente diminuzione della permeabilità della cartuccia. La cartuccia fu quindi montata su di una beuta da vuoto e i liquidi forzati a passarvi attraverso mediante applicazione del vuoto prodotto all'interno della beuta per mezzo di una pompa ad acqua o di una pompa a motore (Millipore).

Se necessario, i campioni di acqua di fiume e in uscita da un depuratore furono filtrati attraverso dei filtri circolari in fibra di vetro Whatman GF/C aventi pori di 1 micron (Maidstone, UK).

### 1.3 - Procedura di analisi

Prima di processare i campioni acquosi la cartuccia fu lavata con 6 mL di una soluzione di cloruro di metilene/metanolo (80+20, v/v) seguiti da 2 mL di metanolo e 14 mL di acqua acida per HCl (pH=2).

Per gli studi di recupero, i campioni acquosi furono contaminati artificialmente mediante aggiunta di volumi noti della soluzione di lavoro contenente gli 11 fenoli. Nel caso di campioni contenenti ipoclorito, prima di effettuare l'aggiunta, a questi veniva addizionato tiosolfato di sodio (0,5 g/L). I campioni erano agitati per un minuto e, dopo 10 minuti, versati in un recipiente di vetro connesso alla cartuccia di adsorbente (Fig. 1). L'acqua era costretta a passare all'interno della cartuccia a flussi di 60-70 mL/min riducendo opportunamente la pressione all'interno della beuta. Dopo il passaggio del campione la pompa era disconnessa e la cartuccia riempita con circa 7 mL di acqua distillata che era fatta passare per gravità attraverso il letto dell'adsorbente. Veniva quindi nuovamente applicato il vuoto per circa 1 minuto allo scopo di eliminare le eventuali gocce

d'acqua presenti sulla superficie interna della cartuccia la cui presenza può diminuire l'efficienza dei solventi organici usati per il desorbimento degli analiti.

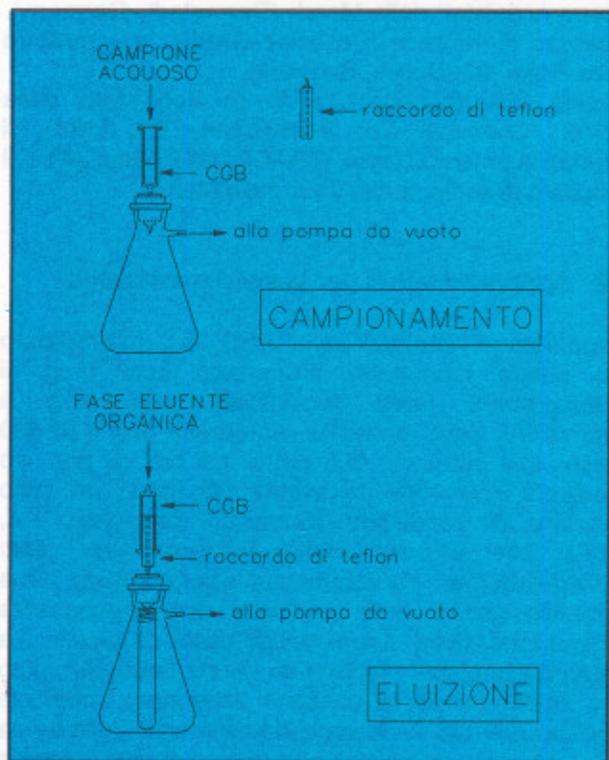


Fig. 1 - Descrizione schematica delle modalità di campionamento e di eluizione dalla cartuccia di Carbograph-1 della miscela di fenoli.

In seguito al passaggio di elevati volumi di acqua all'interno della cartuccia si notava spesso una certa contrazione del letto dell'adsorbente. In tal caso, il setto superiore veniva spinto delicatamente contro la colonna di adsorbente. Anche tale operazione aveva lo scopo di aumentare l'efficienza di estrazione degli analiti dalla cartuccia facilitando la successiva operazione di rimozione dell'acqua al suo interno ed evitando la formazione di percorsi preferenziali.

La pompa da vuoto era quindi disconnessa e la cartuccia lavata con 1,8 mL di metanolo che veniva fatto passare al suo interno lentamente, regolando opportunamente il vuoto all'interno della beuta, per eliminare l'acqua residua. Dopo il passaggio del metanolo la pressione all'interno della beuta era ridotta per un minuto. Subito dopo, un pistone cilindrico di teflon avente base conica e una punta di tipo Luer era introdotto all'interno della cartuccia fino a venire a contatto con il setto superiore di questa. Quindi, la cartuccia era rovesciata e collegata nella parte superiore mediante un raccordo di teflon a un dosatore e nella parte inferiore ad una beuta all'interno della quale era stata posta una provetta a

fondo tondo avente un diametro interno di 1,4 cm (Fig. 1). Venivano fatti passare attraverso la cartuccia 6 mL di una miscela di cloruro di metilene/metanolo (80+20, v/v) contenente 10 mmol/L di TBACl ad un flusso di circa 6 mL/min. Le ultime gocce di questa miscela erano raccolte riducendo al minimo la pressione all'interno dell'apparato.

L'estratto era quindi diviso in due porzioni uguali, le quali erano entrambe portate a secco mediante evaporazione in un bagno ad acqua termostata a 27°C sotto un leggero flusso di azoto. Il residuo di un'aliquota era ripreso con 200 µL di una miscela H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (80+20, v/v) acidificata con TFA (0,025%, v/v). Cinquanta microlitri erano iniettati nell'apparato HPLC. Per una eventuale conferma della presenza di uno o più composti fenolici nel campione, il residuo della seconda aliquota era ripreso con 150 µL di una miscela H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80+20, v/v) basificata con 0,1 mol/L di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e i fenoli erano convertiti in acetil derivati aggiungendo alla miscela 40 µL di anidride acetica e riscaldando la soluzione a 50°C, in bagno termostata, per sei minuti. Cinquanta microlitri di questa soluzione erano iniettati nell'apparato HPLC.

#### 1.4 - Strumentazione HPLC

L'analisi cromatografica HPLC è stata eseguita con una pompa ternaria Varian modello 9012 equipaggiata con un iniettore Rheodyne modello 7125 avente un campionatore da 50 µL e un rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda variabile Varian modello 2550. Per la separazione dei fenoli e dei loro acetil derivati è stata usata una colonna analitica 25 cm X 4,6 mm id "Alltima" riempita con particelle da 5 micron di octadecilsilice per fase inversa (Alltech, Deerfield, IL, USA). La pompa A conteneva acetonitrile acidificato con TFA (0,0125%, v/v) e la pompa B acqua acidificata con TFA (0,025%, v/v). L'eluizione era effettuata, a un flusso costante di 1 mL/min, mediante gradiente lineare aumentando la percentuale di modificante organico dal 22% al 90% in 27 min. La lunghezza d'onda iniziale era 280 nm che era portata a 220 nm dopo 21 min.

Gli acetil derivati erano separati mantenendo le stesse condizioni cromatografiche e rivelati a 220 nm. I cromatogrammi e i tempi di ritenzione degli 11 fenoli e degli acetil derivati sono riportati rispettivamente in Figg. 2 e 3 e Tab. 1.

Le concentrazioni e i recuperi degli analiti in acqua erano calcolate misurando le altezze dei picchi dei fenoli degli estratti e paragonandoli con quelli della soluzione di lavoro.

## 2 - RISULTATI E DISCUSSIONE

La determinazione di composti polari, come i fenoli, presenti in acqua a livello di tracce richiede l'uso di

metodi di estrazione capaci di recuperare gli analiti da elevati volumi di campione.

Tab. 1 - Tempi di ritenzione degli 11 fenoli e dei corrispondenti acetil derivati

Composto	Tempi di ritenzione (min)	
	Fenoli	Acetilfenati
fenolo	8.2	12.8
4-nitrofenolo	10.4	14.3
2-clorofenolo	12.5	16.7
2,4-dinitrofenolo	13.5	15.8
2-nitrofenolo	14.4	13.6
2,4-dimetilfenolo	15.3	18.1
4-cloro-3-metilfenolo	16.6	20.4
2,4-diclorofenolo	18.0	21.1
4,6-dinitro-2-metilfenolo	19.3	18.5
2,4,6-triclorofenolo	22.2	23.9
pentaclorofenolo	26.8	27.9

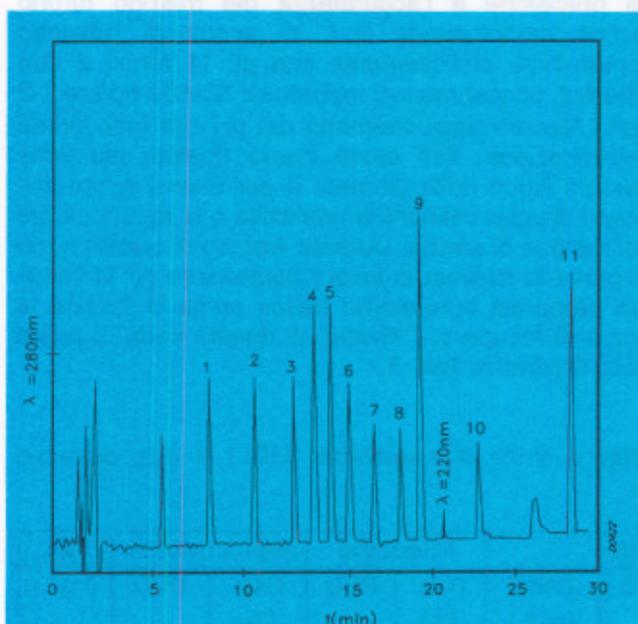


Fig. 2 - Cromatogramma della soluzione di lavoro degli 11 fenoli. Volume iniettato: 20  $\mu$ L; attenuazione 0,04 AUFS a 280 nm e 0,016 AUFS a 220 nm. 1) fenolo; 2) 4-nitrofenolo; 3) 2-clorofenolo; 4) 2,4-dinitrofenolo; 5) 2-nitrofenolo; 6) 2,4-dimetilfenolo; 7) 4-cloro-3-metilfenolo; 8) 2,4-diclorofenolo; 9) 4,6-dinitro-2-metilfenolo; 10) 2,4,6-triclorofenolo; 11) pentaclorofenolo.

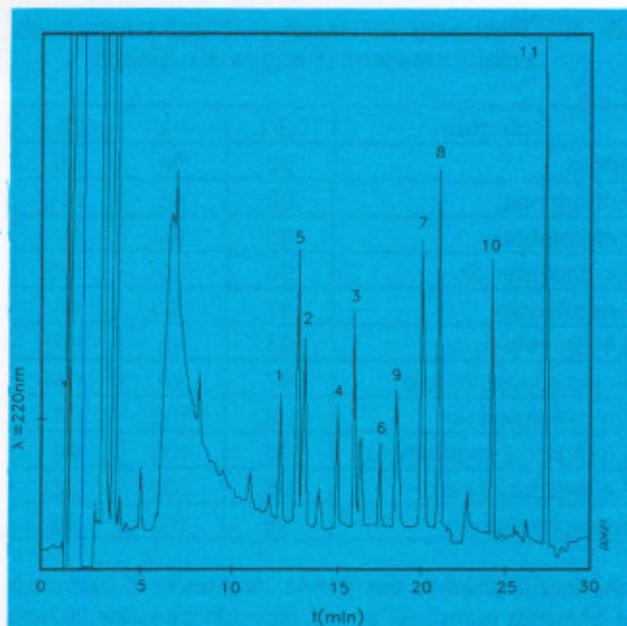


Fig. 3 - Cromatogramma degli acetilderivati degli 11 fenoli. Volume iniettato: 20  $\mu$ L; attenuazione 0,08 AUFS a 220 nm nell'intervallo 0-21 minuti e 0,016 AUFS a 220 nm da 21 minuti a fine cromatogramma. 1) fenolo; 2) 4-nitrofenolo; 3) 2-clorofenolo; 4) 2,4-dinitrofenolo; 5) 2-nitrofenolo; 6) 2,4-dimetilfenolo; 7) 4-cloro-3-metilfenolo; 8) 2,4-diclorofenolo; 9) 4,6-dinitro-2-metilfenolo; 10) 2,4,6-triclorofenolo; 11) pentaclorofenolo.

L'efficienza di estrazione delle cartucce di Carboglyph-1 è stata valutata campionando volumi crescenti di acqua di rubinetto contaminata artificialmente con i fenoli alla concentrazione individuale di 1-2  $\mu$ g/L. Ai campioni acquosi prima dell'aggiunta dei fenoli venivano addizionati 0,5 g/L di  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  per evitare che questi potessero venire ossidati dall'ipoclorito eventualmente presente. Da studi precedenti infatti è stata evidenziata la capacità della superficie del Carboglyph-1 di catalizzare le reazioni di ossidazione da parte dell'ipoclorito mediante meccanismi complessi. Dai dati in Tab. 2 si può notare come la cartuccia di Carboglyph-1 risulti estremamente adatta ad estrarre i composti in esame anche campionando volumi di acqua relativamente elevati.

La riestrazione dei fenoli dalla cartuccia di Carboglyph-1 condotta in maniera convenzionale, ossia facendo passare attraverso il letto dell'adsorbente la miscela eluente nella stessa direzione di flusso del campione acquoso, portava a bassi recuperi dei due dinitrofenoli e del pentaclorofenolo. Questi tre composti erano eluiti dalla cartuccia come picchi molto codati; infatti, passando attraverso la cartuccia altre quattro frazioni da 6 mL della miscela eluente si trovavano nell'eluato quantità via via decrescenti dei tre fenoli.

Tab. 2 - Recupero dei fenoli (1-2 µg/L) estratti da volumi crescenti di acqua di rubinetto

Composto	0,5 L	1 L	2 L
fenolo	95	99	98
4-nitrofenolo	96	98	101
2-clorofenolo	98	99	99
2,4-dinitrofenolo	98	95	100
2-nitrofenolo	97	100	94
2,4-dimetilfenolo	94	92	100
4-cloro-3-metilfenolo	97	99	100
2,4-diclorofenolo	100	100	97
4,6-dinitro-2-metilfenolo	95	100	98
2,4,6-triclorofenolo	95	100	100
pentaclorofenolo	95	97	96

Tale inconveniente era risolto rivoltando la cartuccia ed eluendo quindi gli analiti facendo passare la fase mobile nella direzione di flusso opposta a quella di campionamento. Tale espediente era stato suggerito dall'osservazione che questi tre composti, essendo fortemente trattenuti sulla superficie del Carbograph-1, dopo il passaggio del campione acquoso sono praticamente concentrati sulla testa della cartuccia di adsorbente. Quindi, rivoltando la cartuccia la quantità di fase mobile sufficiente ad eluire i fenoli dalla cartuccia sarà minore di quella necessaria con una eluizione convenzionale poichè sarà minore la lunghezza del cammino che i composti dovranno percorrere per uscire dalla cartuccia.

Oltre all'estrazione di elevati volumi di acqua, per ottenere un elevato fattore di arricchimento del campione è necessario minimizzare il volume finale dell'estratto. In alcuni casi, la parziale rimozione del solvente può causare gravi perdite degli analiti. E' quindi necessario scegliere le condizioni ottimali per la concentrazione degli estratti in relazione ai composti da determinare. Il metodo in questione

impiega come fase eluente per recuperare gli analiti alla cartuccia di Carbograph-1 una miscela organica di cloruro di metilene/metanolo (80+20,v/v) 10 mmol/L TBACl. Tale fase eluente oltre ad essersi dimostrata efficace per recuperare gli analiti adsorbiti sulla superficie del Carbograph-1, permette di evaporare gli estratti fino a secchezza senza alcuna perdita dei composti da analizzare.

Apparentemente, il ruolo svolto dal TBACl presente nella miscela organica è quello di rendere gli analiti meno volatili. Tale effetto può essere spiegato ipotizzando che in soluzione si abbia la formazione di coppie ioniche tra ioni tetralchilammonio e i fenoli. Questa ipotesi, comunque, fa supporre che anche i fenoli più debolmente acidi siano presenti in soluzione sotto forma di ioni fenato.

Da un punto di vista pratico, lo stadio di evaporazione del solvente era condotto ponendo le provette contenenti gli estratti in un bagno ad acqua termostata a 27°C sotto un leggero flusso di azoto, avendo cura che le provette non rimanessero nel bagno per più di 1-2 minuti dopo la totale evaporazione del solvente.

### 3 - ACCURATEZZA E PRECISIONE

La precisione e l'accuratezza del metodo furono testate campionando 2 L di acqua di rubinetto contaminata artificialmente con gli 11 fenoli a due differenti concentrazioni individuali: 50-100 ng/L e 1-2 µg/L. Nessun aggiustamento del pH era fatto prima dell'estrazione. Tali prove erano ripetute più volte durante l'arco della giornata e per diversi giorni allo scopo di poter valutare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo di analisi. Durante il corso di questa serie di prove la miscela di lavoro contenente gli 11 fenoli era preparata ogni giorno fresca prima di iniziare le prove di recupero. I risultati di questa serie di prove sono illustrati in Tab. 3.

Tab 3 - Accuratezza e precisione (ripetibilità e riproducibilità) e limite di rivelabilità (MDL) a due differenti concentrazioni di fenoli in due litri di acqua di rubinetto

Composto	Conc. (ng/L)	Ripetibilità		Riproducibilità		Conc. (ng/L)	Ripetibilità		Riproducibilità		MDL (ng/L)
		Rec. (%)	RSD	Rec. (%)	RSD		Rec. (%)	RSD	Rec. (%)	RSD	
fenolo	2000	96	4,2	93	2,1	100	95	3,1	99	5,3	0,8
4-nitrofenolo	1000	98	1,0	97	4,1	50	94	3,1	94	2,6	0,3
2-clorofenolo	2000	99	2,0	98	2,0	100	98	1,9	96	3,9	0,4
2,4-dinitrofenolo	1000	101	2,0	100	4,0	50	98	4,5	96	3,8	0,1
2-nitrofenolo	1000	100	1,0	101	1,9	50	97	2,5	96	2,8	0,1
2,4-dimetilfenolo	2000	91	6,6	90	4,4	100	96	1,7	95	2,2	0,4
4-cloro-3-metilfenolo	2000	100	0,1	100	2,0	100	100	0,9	98	2,7	0,5
2,4-diclorofenolo	1000	98	3,1	96	2,1	50	97	1,5	96	3,1	0,5
4,6-dinitro-2-metilfenolo	1000	99	3,2	97	2,0	50	92	2,2	92	2,6	0,1
2,4,6-triclorofenolo	2000	99	4,0	97	3,1	100	99	2,8	98	4,1	1,5
pentaclorofenolo	1000	97	2,2	96	2,1	50	95	5,6	94	5,1	0,8

Dai valori delle medie delle percentuali di recupero, sempre superiori al 90%, e dai valori della deviazione standard relativa, minore del 10 %, si può affermare che tale metodo è efficace per la determinazione dei fenoli presenti nelle acque a livello di tracce e ultratracce. Al fine di valutare la selettività del metodo furono effettuate delle prove di recupero da acqua di superficie, contaminando artificialmente un campione acquoso, prelevato in prossimità della foce del fiume Po in località Pontelagoscuro (Ferrara), esente da una contaminazione da composti fenolici.

Al campione era aggiunta un' aliquota della soluzione standard degli 11 fenoli tale da avere una concentrazione di 1-2 µg/L per ogni singolo fenolo. Il campione era diviso in diverse aliquote da un litro che erano quindi analizzate. I valori delle medie delle percentuali di recupero sono riportati in Tab. 4.

Tab. 4 - Accuratezza e precisione a 1-2 µg/L di fenoli in 1 litro di acqua di superficie (fiume Po)

Composto	Conc. (ng/L)	Rec. %	RSD
fenolo	2000	96	5,3
4-nitrofenolo	1000	97	2,3
2-clorofenolo	2000	98	5,1
2,4-dinitrofenolo	1000	98	1,3
2-nitrofenolo	1000	95	7,0
2,4-dimetilfenolo	2000	90	5,8
4-cloro-3-metilfenolo	2000	95	4,0
2,4-diclorofenolo	1000	99	1,1
4,6-dinitro-2-metilfenolo	1000	97	2,7
2,4,6-triclorofenolo	2000	97	2,2
pentaclorofenolo	1000	98	1,5

I buoni valori di accuratezza e precisione sono una chiara indicazione della robustezza del metodo, che, in tali condizioni, non è influenzato dalla presenza nella matrice acquosa di acidi umici o di altre specie organiche di natura sconosciuta capaci di saturare la cartuccia determinando bassi valori di recupero per i fenoli più polari.

Dai risultati di alcune prove effettuate nel nostro laboratorio è stato evidenziato che nel caso di campioni fortemente inquinati (100-200 µg/L di fenoli) e/o con un elevato contenuto di sostanze organiche disciolte, durante l'estrazione di volumi relativamente elevati di campione di acqua superficiale (1L) si avevano fenomeni di spostamento dalla superficie del Carbograph-1 da parte dei composti meno polari ai danni di quelli più polari con conseguente perdita di questi ultimi. Quindi, nel caso in cui si abbia il sospetto di dover analizzare campioni molto carichi di materiale organico - un colore rosso-bruno del campione acquoso è un buon indizio - è consigliabile estrarre volumi minori di 1 L. Alla luce di queste ultime considerazioni furono fatte delle prove di recupero su una matrice ambientale alquanto

complessa, quale un'acqua prelevata all'uscita di un depuratore (Fig. 4 e 5). Prima di effettuare le prove di recupero fu appurata l'assenza nel campione di inquinanti fenolici e fu determinata la quantità di carbonio organico disciolto totale (DOC). La misura, effettuata in triplicato con un analizzatore automatico di carbonio (TOC Analyzer 5000, Shimadzu) diede un valore di DOC pari a 61,5 µg/L. Quattro aliquote da 50 mL furono contaminate artificialmente in maniera tale da avere una concentrazione di 30-60 µg/L per ogni singolo fenolo.

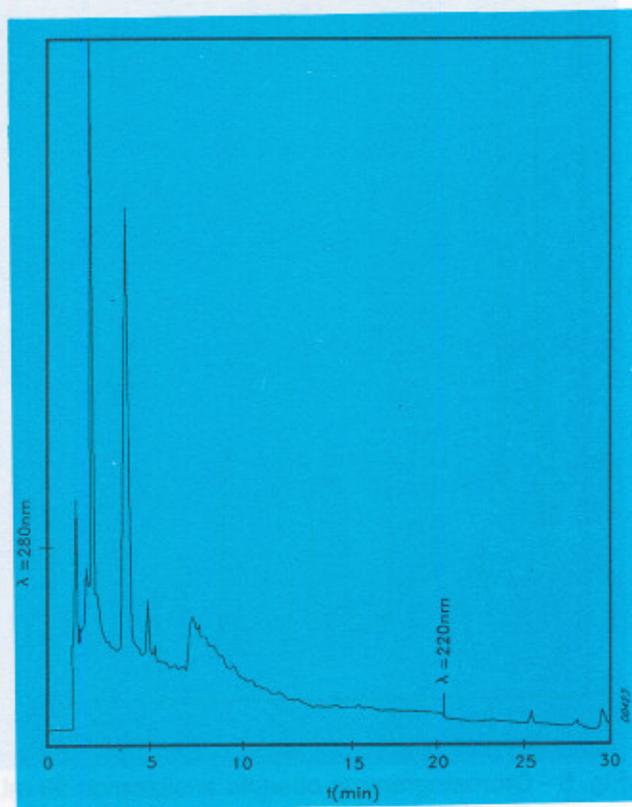


Fig. 4 - Cromatogramma ottenuto analizzando 50 mL di un'acqua di scarico prelevata all'uscita di un impianto di depurazione delle acque. Volume iniettato: 50 µL; attenuazione 0,32 AUFS a 280 nm e 1,28 AUFS a 220 nm.

Dai valori delle medie delle percentuali di recupero e da quelli della deviazione standard relativa (Tab. 5) si evince che questo metodo risulta idoneo per determinare composti fenolici eventualmente scaricati da reflui urbani e industriali nell'ecosistema acquatico.

Quando una procedura cromatografica fa uso di un rivelatore non sufficientemente selettivo, come uno spettrofotometro UV-Vis, per monitorare dei tossici presenti nelle acque naturali a concentrazioni molto basse, è frequente incorrere in falsi positivi o in sovrastime causate dalla presenza nel campione di sostanze organiche che vengono eluite dalla colonna analitica con tempi di ritenzione uguali a quelli di alcuni dei composti da determinare. Per confermare la presenza dei fenoli e per determinare

correttamente la loro concentrazione, questo metodo prevede l'analisi di un'aliquota dell'estratto all'HPLC con la stessa colonna analitica, dopo conversione dei fenoli nei loro corrispondenti acetilderivati con anidride acetica in ambiente moderatamente basico. In tal modo può essere ottenuta la conferma dell'eventuale presenza di fenoli nel campione osservando la scomparsa del picco corrispondente al composto fenolico e la simultanea comparsa del picco corrispondente al suo acetil derivato.

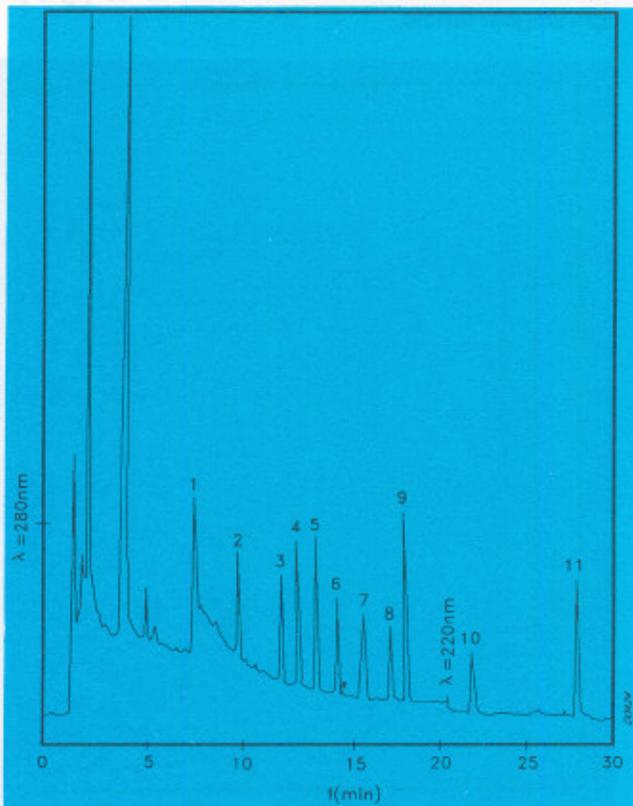


Fig. 5 - Cromatogramma ottenuto analizzando 50 mL di un'acqua di scarico prelevata all'uscita di un impianto di depurazione delle acque con aggiunta esterna della miscela degli 11 fenoli. Volume iniettato: 50 µL; attenuazione 0,32 AUFS a 280 nm e 1,28 AUFS a 220 nm. 1) fenolo; 2) 4-nitrofenolo; 3) 2-clorofenolo; 4) 2,4-dinitrofenolo; 5) 2-nitrofenolo; 6) 2,4-dimetilfenolo; 7) 4-cloro-3-metilfenolo; 8) 2,4-diclorofenolo; 9) 4,6-dinitro-2-metilfenolo; 10) 2,4,6-triclorofenolo; 11) pentaclorofenolo.

Le rese di derivatizzazione erano calcolate misurando l'area dei picchi prodotti dalla quantità residua di fenoli non derivatizzati. I risultati sono riportati in Tab. 6.

Per concludere, come esempio delle potenzialità del metodo in termini di selettività in Fig. 6 è riportato il cromatogramma ottenuto analizzando 1L di un campione campione di acqua del fiume Tevere. Sulla base dei tempi di ritenzione si potrebbe supporre che il campione sia contaminato da 2,4 dinitro-ortocresolo (DNOC) e da 4-nitrofenolo a livello di 0,03 e 0,23 µg/L

rispettivamente. Per ottenere la conferma della presenza dei due fenoli identificati, la seconda aliquota da 3 mL dello stesso estratto era evaporata fino a secchezza e sottoposta alla procedura di derivatizzazione.

La Fig. 7 mostra il cromatogramma ottenuto iniettando all'HPLC la frazione derivatizzata. Dopo interpretazione del cromatogramma la presenza nel Tevere di 230 ng/L di 4-nitrofenolo fu confermata dalla scomparsa del picco avente lo stesso tempo di ritenzione e dalla simultanea comparsa del picco corrispondente al suo acetil derivato.

Tab. 5 Accuratezza e precisione del metodo a 30-60 µg/L di fenoli in 50 mL di effluente di un impianto di depurazione

Composto	Conc. (µg/L)	Rec. %	RDS
fenolo	60	94	3,3
4-nitrofenolo	30	95	3,9
2-clorofenolo	60	94	4,0
2,4-dinitrofenolo	30	94	3,3
2-nitrofenolo	30	97	3,0
2,4-dimetilfenolo	60	95	4,5
4-cloro-3-metilfenolo	60	97	3,8
2,4-diclorofenolo	30	97	2,6
4,6-dinitro-2-metilfenolo	30	96	1,2
2,4,6-triclorofenolo	60	97	2,6
pentaclorofenolo	30	95	3,4

Tab. 6 - Rese della reazione di conversione dei fenoli in acetil derivati

Composto	Rese (%)
fenolo	100
4-nitrofenolo	100
2-clorofenolo	87
2,4-dinitrofenolo	85
2-nitrofenolo	100
2,4-dimetilfenolo	100
4-cloro-3-metilfenolo	90
2,4-diclorofenolo	100
4,6-dinitro-2-metilfenolo	71
2,4,6-triclorofenolo	100
pentaclorofenolo	100

#### 4 - VARIABILI ANALITICHE CRITICHE

Anche se il metodo in questione risulta operativamente molto semplice e robusto, a livello pratico è necessario operare alcuni accorgimenti per ottenere i migliori risultati.

Nella cartuccia dopo il passaggio dell'aliquota da 1,8 mL di metanolo è importante che non rimanga

dell'acqua residua. Questa, oltre ad abbassare l'efficienza di riestrazione della fase organica, crea anche notevoli problemi durante lo stadio di evaporazione dell'estratto. Infatti, la presenza di acqua nell'estratto porta ad un incremento del tempo necessario per rimuovere il solvente con conseguente perdita dei fenoli più volatili. Tale inconveniente può essere facilmente evitato avendo cura di mantenere il vuoto all'interno della beuta dopo il passaggio del metanolo per due minuti.

Anche la forma e le dimensioni della provetta contenente l'estratto possono influenzare la durata dello stadio di rimozione del solvente. Una provetta corta e con un diametro interno relativamente grande (vedi parte sperimentale) minimizzano il tempo necessario al completamento di tale operazione.

Nel caso di campioni con un elevato contenuto di sostanze organiche disciolte possono esservi delle sostanze interferenti che vengono eluite dalla colonna analitica come picchi molto codati che creano talvolta delle difficoltà nella misura dell'area dei picchi dei composti da determinare.

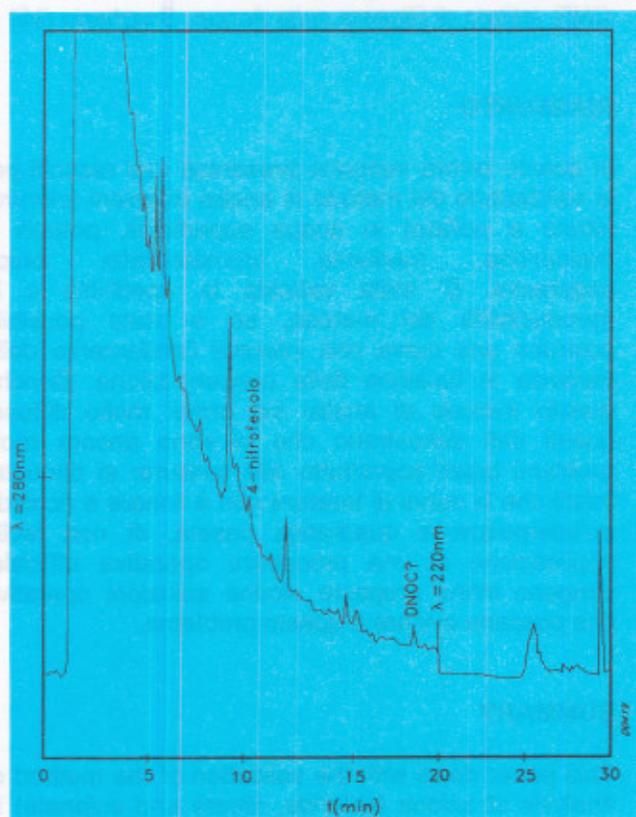


Fig. 6 - Cromatogramma ottenuto analizzando 1 L di acqua superficiale (fiume Tevere). Volume iniettato: 20  $\mu$ L; attenuazione 0,01 AUFS a 280 nm e 0,04 AUFS a 220 nm.

In questi casi si può ovviare a tale inconveniente semplicemente modificando le condizioni cromatografiche di analisi e iniettando nel cromatografo liquido un volume minore di campione (20  $\mu$ L). Un gradiente a due stadi (dal 25% al 65 % di modificante organico in 28 min. e al 100% in 10 min.)

si è dimostrato efficace per ottenere una buona linea di base ed un profilo cromatografico adatti a misurare agevolmente l'area di tutti gli 11 picchi corrispondenti ai composti in esame.

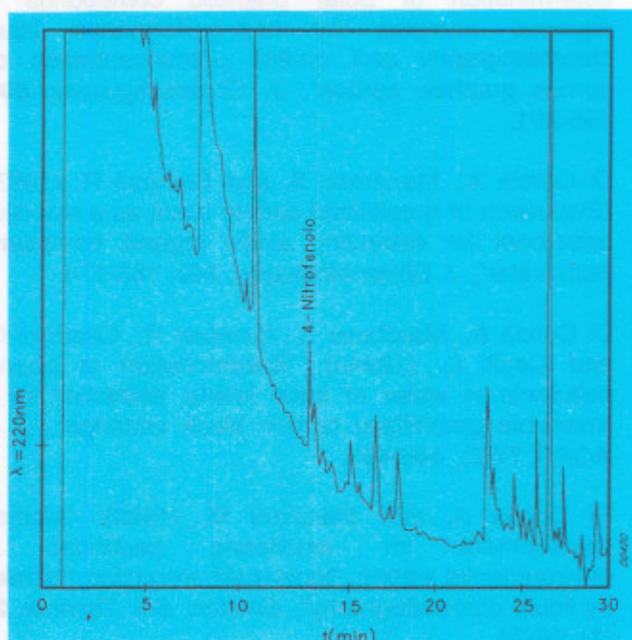


Fig. 7 - Cromatogramma ottenuto analizzando 1 L di acqua superficiale (fiume Tevere) dopo derivatizzazione dell'estratto. Volume iniettato: 20  $\mu$ L; attenuazione 0,01 AUFS a 280 nm e 0,04 AUFS a 220 nm.

## BIBLIOGRAFIA

Brouwer E. R. e Brinkman U. A. Th. (1994): "Determination of phenolic compounds in surface water using on-line liquid chromatographic precolumn-based column-switching techniques", *J. Chromatography Part. A*, **678**, 223-231.

Buchholz K. D. and Pawliszyn J. (1993): "Determination of phenols by solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis", *Environ. Sci. Technol.*, **27**(13), 2844-2848.

Cai Z., Gross M. L. and Spalding R. F. (1995): "Determination of dealkylatrazine in water by graphitized carbon black extraction followed by gas chromatography - high resolution mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **304**, 67-73.

Campanella L., Di Corcia A., Samperi R. and Gambacorta A. (1982): "The nature of surface chemical heterogeneities of graphitized carbon black", *Mater. Chem.*, **7**, 429-438.

Commissione della Comunità Economica Europea (1980): "Direttiva 80/778/EEC sulla qualità delle

acque destinate al consumo umano", GUCE 30.08.1980.

Coquart V. and Hennion M. C. (1992): "Trace-level determination of polar phenolic compounds in aqueous samples by high-performance liquid chromatography and on-line preconcentration on porous graphitic carbon", *J. Chromatography*, **600**, 195-201.

Di Corcia A., Marchese S. and Samperi R. (1993): "Evaluation of graphitized carbon black as a selective adsorbent for extracting acidic organic compound from water", *J. Chromatography*, **642**, 163-174.

Di Corcia A., Marchese S., Samperi R., Cecchini G. and Cerilli L. (1994a): "Determination of phenol pollutants in water at trace levels: extraction by a reversible graphitized carbon black cartridge", *J. of AOAC*, **77**(2), 446-453.

Di Corcia A. and Marchetti M. (1992): "Method development for monitoring pesticides in environmental waters: liquid-solid extraction followed by liquid chromatography", *Environ. Sci. Technol.*, **26** (1), 66-74.

Di Corcia A., Samperi R. and Marcomini A. (1994b): "Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography", *Environ. Sci. Technol.*, **28** (5), 850-858.

Elchelberger J. W., Kerns E. H., Olynyk P. e Budde W. L. (1983): "Precision and accuracy in the determination of organics in water by fused-silica capillary column gas chromatography/mass spectrometry and packed column gas chromatography/mass spectrometry", *Anal. Chem.*, **55** (9), 1471-1479.

Environmental Protection Agency (1984a): "Methods 604. Phenols in Federal Register", October 26, Part VIII, 40 cfr, Part 136, 58 pp.

Environmental Protection Agency (1984b): "Method 625. Base/Neutrals and Acids in Federal Register", October 26, Part VIII, 40 cfr Part 136, 153 pp.

EUREAU (1993): "Updated comments by EUREAU on revision of drinking water directive 80/778/EEC".

Fontaine J. E., Joshipura P.B., Keliher P.N. and Johnson J.D. (1974): "New ultraviolet ratio spectrophotometric system for the determination of trace amounts of phenolic compounds", *Anal. Chem.*, **1974**, **46**, 62-66.

James S. Fritz (1993) "Solid-phase extraction of the phenols using membranes loaded with modified

polymeric resins", *J. Chromatography Part. A*, **1993**, **641**, 57-61.

Lacorte S. and Barcelo D. (1994): "Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters", *Environ. Sci. Technol.*, **28** (6), 1159-1163.

Puig D. and Barcelo D. (1995): "Off-line and on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography for the determination of priority pollutants phenols in natural waters", *Chromatographia*, **40** (7/8), 435-444.

World Health Organization (1993): "Guidelines for Drinking Water Quality", 2<sup>nd</sup> Ed., Geneve.

## PROBLEMI DI TARATURA NELL'ANALISI DI ANIONI MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA SOPPRESSA

S. Valsecchi e S. Polesello  
CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Brugherio (MI)

### RIASSUNTO

In questo lavoro vengono presentati dati raccolti per la validazione del metodo di analisi di anioni (cloruro, nitrato e solfato) in acque superficiali, potabili e meteoriche, mediante cromatografia ionica soppressa. E' stata valutata la ripetibilità e la riproducibilità del metodo, ed è stato possibile costruire una curva che interpoli l'andamento della varianza in funzione della concentrazione. Benché questo metodo di analisi sia ormai molto diffuso, questi dati dimostrano che vi sono ancora molti problemi legati soprattutto alla taratura: si dimostra infatti che la curva di taratura non è lineare e richiede un'interpolazione quadratica pesata, di non facile applicazione in una procedura operativa ufficiale: vengono infine proposte alcune soluzioni operative che possano avviare a questo problema.

### SUMMARY

This paper deals with the validation of the method of analysis of anions (chloride, nitrate and sulphate) in drinking, fresh, and atmospheric water by suppressed ion chromatography. Repeatability and reproducibility are evaluated and an interpolating curve is obtained to correlate standard error and concentration for each analyte. Though this analytical method is very widely used in the world, these data show that there are still a lot of problems related to the calibration procedure: it is shown that the calibration curve is not linear, but it needs a weighted quadratic regression curve, which cannot be easily implemented in an official method. To avoid these problems, some practical procedures are suggested.

## 1 - INTRODUZIONE

### 1.1 - La validazione di un metodo

Benché vi sia ormai un'ampia letteratura scientifica sul problema della validazione di un metodo analitico (Youden and Steiner, 1975; Food and Drug Administration, 1987; Green, 1996; Polesello, 1996), e, in particolare, cromatografico (Inman *et al.*, 1987; Jenke, 1996a, b, c), l'operatore che esegue le analisi, sia per controllo che per ricerca, ritiene ancora che questo sia un aspetto secondario, o al massimo un utile ornamento complementare per una pubblicazione. I metodi ufficiali pubblicati sono spesso assai esaustivi sugli aspetti dell'esecuzione manuale dell'analisi, ma danno pochissimi dati sul grado di affidabilità del metodo stesso. Gli Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA *et al.*, 1992) riportano questa frase: "I dati di accuratezza e precisione non sono ancora disponibili". Non sembra perciò troppo scontato ripetere che lo scopo di un metodo analitico è determinare il contenuto di una specie in una miscela o una matrice con un certo grado (noto) di affidabilità: nella descrizione di un metodo è perciò essenziale una valutazione della precisione e dell'accuratezza, cioè è necessario "validare" il metodo. La validazione è "il processo che serve a dimostrare che un metodo è utilizzabile per un dato scopo" (Green, 1996), cioè che il dato ottenuto ha un livello di confidenza accettabile rispetto alla minima variazione significativa del fenomeno in esame. La validazione non è perciò un ornamento, ma una parte integrante del consueto sviluppo di un metodo.

In questo lavoro vogliamo presentare un modello di validazione applicato al metodo di analisi dei principali anioni in acque meteoriche, potabili e superficiali mediante cromatografia ionica, da noi adottato nei laboratori dell'IRSA di Brugherio.

### 1.2 - L'analisi di anioni in cromatografia ionica

L'analisi in cromatografia ionica, sviluppata dal 1975 (Haddad and Jackson, 1990) con l'introduzione della soppressione dell'eluente, è stata ormai accettata come la tecnica di routine più diffusa ed affidabile per l'analisi di ioni in differenti matrici. In meno di dieci anni questa tecnica è stata accolta in un metodo EPA per l'analisi degli anioni nelle acque potabili (EPA, 1991), e subito dopo 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 (UNICHIM, 1991) e l'IRSA per la determinazione dei solfiti nelle acque di scarico (IRSA, 1994). Nei nostri laboratori questa tecnica è adottata da anni per l'analisi delle acque superficiali e meteoriche ed è stata oggetto di alcuni lavori dedicati alla validazione di questi metodi (Tartari *et al.*, 1993; Valsecchi e

Tartari, 1992). Il lavoro oggetto della presente pubblicazione si differenzia però da quelli precedenti in quanto nasce da due esigenze: da una parte la necessità di dare una forma organica e completa ai dati, nell'ottica di una sua prossima presentazione in qualità di metodo ufficiale, dall'altra di approfondire alcuni aspetti controversi della letteratura riguardante la calibrazione in cromatografia ionica soppressa.

E' necessario perciò ripercorrere la letteratura scientifica dedicata al tema della taratura in cromatografia ionica e confrontarlo con le indicazioni fornite dai diversi metodi ufficiali.

La cromatografia ionica soppressa si basa sul principio della soppressione chimica della conducibilità di fondo dell'eluente. Nell'analisi degli anioni, per la quale si usa come eluente l'anione di un acido debole, si ottiene la soppressione della ionizzazione, e quindi della conducibilità di fondo, per scambio tra i controioni positivi dell'eluente e gli ioni  $H^+$  forniti da una resina scambiatrice. Essendo la conducibilità di fondo dovuta alla ionizzazione residua dell'eluente, essa è strettamente correlata ai valori di pH nella cella conduttimetrica, che sono notevolmente influenzati dalla presenza o meno dell'analita (cloruro, nitrato e solfato). Infatti l'analita, essendo l'anione di un acido forte, a sua volta scambia il proprio controione con l' $H^+$  della resina con la conseguente esaltazione del segnale di risposta del composto; questo porta però ad una diminuzione locale di pH che reprime ulteriormente la dissociazione residua dell'eluente. Poiché all'inizio dell'analisi si azzerava sul livello della conducibilità di fondo, che è dovuta unicamente alla ionizzazione residua dell'eluente, quando eluisce l'analita, la conseguente diminuzione di pH porta ad avere una linea di base reale più bassa in corrispondenza del picco dell'analita, e quindi l'area integrata del picco risulta inferiore a quella reale (Fig. 1).

Questo fenomeno, proprio della cromatografia ionica soppressa, porta ad una non linearità pronunciata delle curve di taratura (risposta strumentale in funzione della concentrazione), in quanto il pH, e quindi la dissociazione dell'eluente, risulta funzione non lineare della concentrazione dell'analita. Questa evidenza sperimentale, pur in presenza di modelli chimico-fisici in grado di riprodurla con una elevata confidenza (Doury-Berthod *et al.*, 1985; Midgley and Parker, 1989), ha ricevuto scarsa attenzione da parte degli operatori del settore analitico, e, cosa più grave, nessuna attenzione da parte delle commissioni che estendono i metodi ufficiali. Nei metodi ufficiali o proposti per la ratifica dai vari enti nazionali e internazionali, il problema centrale della taratura viene liquidato con brevi frasi. Il metodo EPA 300.0 (EPA, 1991) prevede esplicitamente la non linearità solo nel caso di saturazione della capacità di scambio della colonna cromatografica; il metodo EPA 300.6 (1986), utilizzato come base per il successivo metodo IUPAC (IUPAC, 1991) affronta, in due paragrafi distinti, il caso in cui la curva sia lineare e quello in cui non sia lineare: come criterio per discriminare tra le due possibilità si utilizza il coefficiente di correlazione

(che deve essere superiore a 0.9990): nel caso di non linearità è consigliata un'interpolazione polinomiale quadratica.

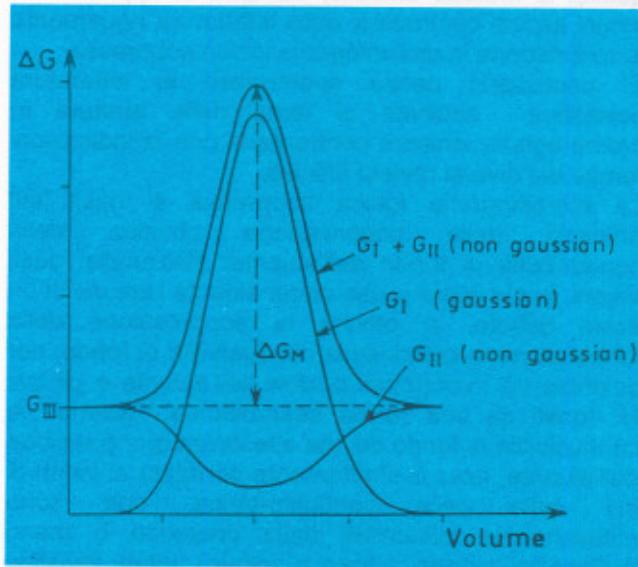


Fig. 1 - I tre contributi alla forma del picco in cromatografia ionica soppressa:  $G_{III}$  rappresenta la conducibilità di fondo dell'eluente in assenza di analita,  $G_I$  rappresenta la forma reale del picco dovuto al solo analita,  $G_{II}$  è la variazione nella conducibilità di fondo dell'eluente in presenza dell'analita. Il picco risultante osservato è dato perciò da  $G_I + G_{II}$ .  $\Delta G = G_I + G_{II} + G_{III}$ . (Doury-Berthod *et al.*, 1985)

La NORMA UNI 9813 (UNICHIM, 1991) specifica di calcolare il fattore di risposta "limitatamente alla parte di curva rettilinea ( $r^2 > 0,999$ )". Gli Standard Methods (A.P.H.A *et al.*, 1992) liquidano questo problema con la seguente sibillina affermazione "Calculate concentration of each anion by referring to the appropriate curve", senza dare alcun tipo di indicazione pratica all'operatore, che di conseguenza troverà più comodo applicare un'interpolazione lineare. Simile procedura è consigliata dal Manuale EMEP (EMEP, 1996), che consiglia l'uso di cinque concentrazioni di standard più un bianco per generare "a suitable calibration curve".

Negli anni '90 operatori dei laboratori di analisi hanno pubblicato lavori che mettono in guardia sui rischi dell'utilizzo di una curva di taratura lineare per la cromatografia ionica soppressa. Costa Pessoa *et al.* (1992) hanno verificato che l'errore dovuto alla deviazione dalla linearità è trascurabile solo per intervalli di un ordine di grandezza; per intervalli più ampi di taratura gli errori possono raggiungere il 50-100%. Gli Autori suggeriscono inoltre di limitare l'errore utilizzando una opportuna "pesatura" statistica

dei punti di taratura, in modo da dare meno peso ai valori alti. Una soluzione alternativa a questo problema sarebbe, come già dimostrato da Midgley e Parker (1989), l'uso di un eluente formato da anioni di basicità superiore, come lo ione idrossido, soluzione che presenta però limitazioni pratiche nella preparazione e conservazione della soluzione eluente. Tartari *et al.* (1995) dedicano un ampio lavoro alla precisione e linearità della cromatografia ionica soppressa: il lavoro dimostra chiaramente come per gli anioni una interpolazione polinomiale (quadratica o cubica) su 2 ordini di grandezza (6-8 valori di concentrazione), porta ad accuratezze molto superiori di una regressione lineare. Achilli e Romele (1996) invece, mediante un metodo di *experimental design* fattoriale, identificano la basicità dell'eluente, e in misura minore l'uso di soluzioni standard multiple, come i fattori che più influenzano la linearità della curva di taratura del solfato in cromatografia ionica soppressa: gli Autori concludono affermando che non si è solo in presenza di una deviazione dalla linearità, ma che la curva di taratura è proprio del secondo ordine, per cui la riduzione dell'intervallo di taratura non porta ad un effettivo recupero di linearità.

La rassegna della letteratura scientifica sul problema della taratura in cromatografia ionica soppressa ci dimostra quanto distacco vi sia ancora tra quel settore della chimica analitica che si occupa di costruire modelli che interpretino l'influenza delle variabili in un dato metodo analitico, e chi questi metodi deve quotidianamente applicare nei suoi settori di interesse. Gli articoli teorici sono avari di informazioni e suggerimenti di tipo pratico per l'analista di routine - a parte alcune indicazioni nel lavoro fondamentale di Midgley e Parker (1989)- il quale nella prassi operativa non può certo costruire curve di interpolazione particolarmente raffinate: a loro volta gli articoli degli operatori in particolare il lavoro molto completo di Tartari *et al.* (1995) tengono in scarsissima considerazione i presupposti teorici del problema. A questa evidenza si deve aggiungere il fatto che in letteratura (Valsecchi e Tartari, 1992; Tartari *et al.*, 1993; Tartari *et al.*, 1995; APHA *et al.*, 1992) sono disponibili dati di ripetibilità, riproducibilità ed accuratezza spesso non omogenei o non direttamente fruibili. A partire da queste considerazioni ci siamo riproposti di validare il metodo dell'analisi degli anioni in cromatografia ionica applicando una schema di validazione rigoroso e ordinato, in modo poi da essere in grado di fornire anche quei suggerimenti operativi corretti che sono necessari all'operatore di routine delle analisi delle acque.

## 2 - CONDIZIONI SPERIMENTALI

In Tab. 1 sono riportate le condizioni sperimentali utilizzate per le analisi. La preparazione degli standard è stata effettuata secondo la procedura riportata in Valsecchi e Tartari (1992).

Le elaborazioni statistiche e le interpolazioni sono state effettuate col programma Statistica (StatSoft™) per Windows.

### 3 - VALIDAZIONE DEL METODO

#### 3.1 - Introduzione

Lo scopo di una misura analitica è conoscere con una certa confidenza, cioè con il minimo errore accettabile, il contenuto di un certo componente in una matrice o miscela.

Tab 1: Condizioni analitiche utilizzate in questo lavoro

Cromatografo ionico	Dionex 2000i
Pre-colonna	Dionex IonPac AG4A
Colonna analitica	Dionex IonPac AS4A
Eluente	3.6 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 3.4 mM NaHCO <sub>3</sub>
Flusso dell'eluente	1.4 mL min <sup>-1</sup>
Rivelatore	Dionex CDM-II
Soppressore	Dionex AMMS-II
Rigenerante	12.5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flusso del rigenerante	4 - 5 mL min <sup>-1</sup>
Volume di iniezione	50 µL

La confidenza con cui giungiamo a determinare il contenuto della specie deve essere commisurato al problema scientifico in esame e quindi deve essere conosciuto o misurato prima di predisporre il piano di analisi. Per conoscere la precisione di un metodo, cioè la confidenza che possiamo dare ad una misura, è necessario misurare i contributi distinti alla varianza totale:

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = \sigma_i^2 + \sigma_s^2 + \sigma_{\text{std}}^2 + \sigma_{\text{matrix}}^2 \quad (3.1)$$

ove

$\sigma_i^2$  è la variazione della risposta strumentale nell'arco della stessa serie di prove (*intra dies*), composta da iniezione, stabilità della risposta, integrazione

$\sigma_s^2$  è la variazione della risposta strumentale in giorni diversi, dovuta alla variazione nelle condizioni ambientali, dell'efficienza del rivelatore, della concentrazione di eluente e soppressore, ecc.

$\sigma_{\text{std}}^2$  è la varianza dovuta ad errori alle procedure di calibrazione (preparazione degli standard, regressione)

$\sigma_{\text{matrix}}^2$  è la varianza dovuta alle interferenze di matrice

Conoscendo così il contributo relativo di ciascun termine, si individua anche qual è il fattore su cui si deve maggiormente lavorare nella messa a punto del metodo analitico per migliorare la riproducibilità globale. Prima di misurare ciascun contributo singolarmente si deve però verificare che gli errori delle misure analitiche siano distribuiti normalmente, cioè che si possa assumere che la varianza sia pari al quadrato della deviazione standard delle serie di misure.

#### 3.2 - Distribuzione normale degli errori

Per verificare che gli errori delle misure analitiche siano distribuiti normalmente, abbiamo eseguito una serie di misure (n=115) della stessa soluzione (contenente 10 µM di solfato, nitrato e cloruro) nell'arco di tre giorni consecutivi durante i quali lo strumento è stato mantenuto in flusso di eluente. Abbiamo verificato con alcuni test statistici (test di Kolmogorov-Smirnov, e test di Shapiro-Wilks) la validità di questa asserzione: essa è risultata statisticamente significativa (Fig. 2).

#### 3.3 - Ripetibilità

Per valutare la ripetibilità dell'analisi all'interno dello stesso giorno (*intra dies*) e in giorni successivi (*inter dies*) abbiamo analizzato in quattro giorni successivi le stesse sette soluzioni di standard alle seguenti concentrazioni (1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µM), ripetendo le analisi cinque volte al giorno. La soluzione alla concentrazione di 1 µM è stata preparata ogni mattina in quanto troppo soggetta ad inquinamento casuale.

La Tab. 2 riporta i risultati analitici, espressi in risposta assoluta (area integrata del picco) e coefficiente di variazione (deviazione standard relativa percentuale). In questo modo abbiamo valutato due tipi di ripetibilità: sulla prima, da noi definita *intra dies* (media dei CV calcolati ogni giorno), pesa soprattutto la ripetibilità del sistema di iniezione e la variazione istantanea della stabilità del rivelatore; alla ripetibilità *inter dies* (calcolata come CV di tutti i dati ottenuti nei quattro giorni presi come un pool unico dei dati) contribuisce anche la variazione di risposta del rivelatore che veniva spento ogni sera, riaccessa la mattina e fatto condizionare per almeno un'ora.

La varianza *intra dies*, nel caso di nitrato e solfato, è solo di poco inferiore di quella *inter dies*. Per quanto riguarda il cloruro a basse concentrazioni, si nota molto bene che la ripetibilità *inter dies* assume valori molto più elevati (20-10%) a causa probabilmente della difficoltà di integrazione dovuta alla vicinanza del picco negativo di sistema (*water dip*) che presenta nei diversi giorni una riproducibilità assai bassa.

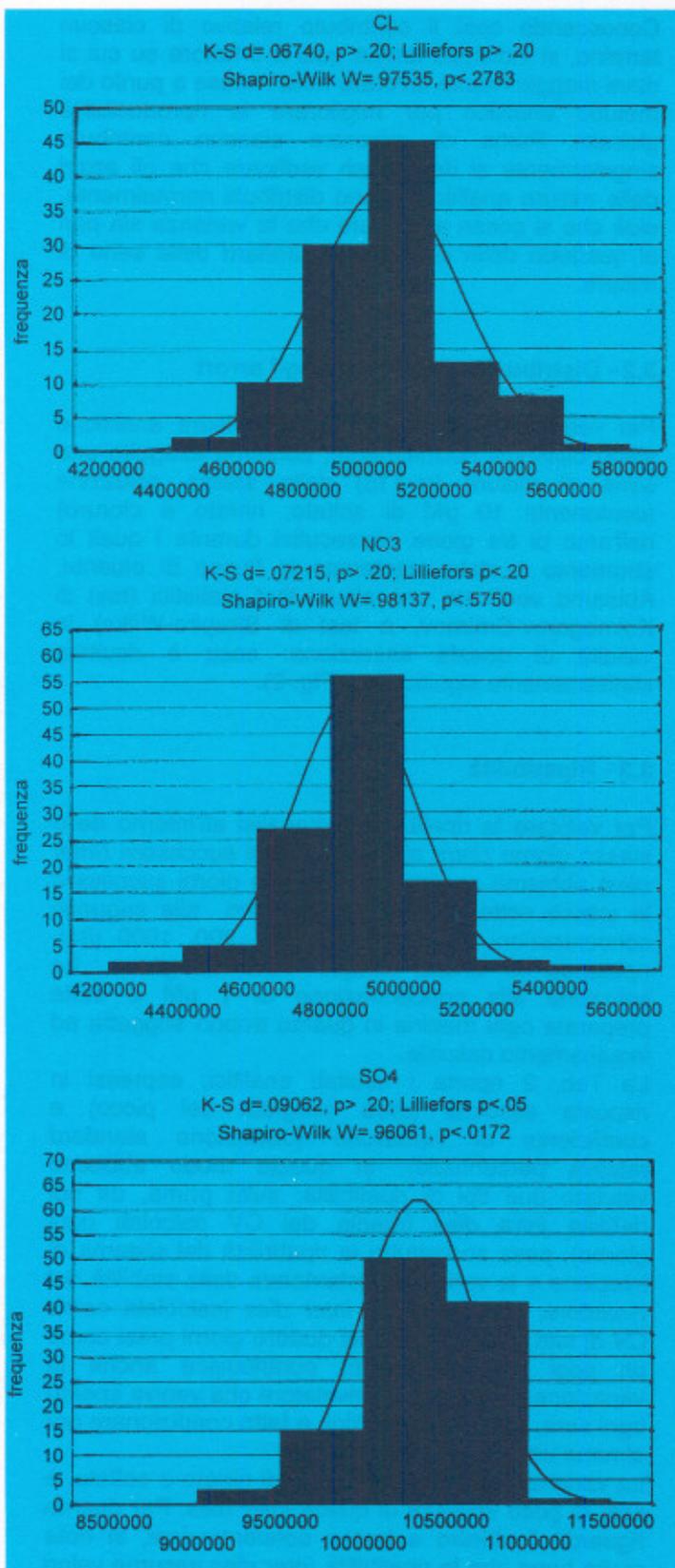


Fig. 2 - Distribuzione di frequenza delle misure (la curva sovrapposta rappresenta la distribuzione normale attesa) e risultato dei test statistici per cloruro, nitrato e solfato

E' evidente, inoltre, che il C.V. diminuisce all'aumentare della concentrazione ed è asintotico ad un valore limite pari a circa 1% per la ripetibilità *intra dies*, e circa 2% per quella *inter dies*. Se poniamo in un grafico deviazione standard in funzione della concentrazione si nota che vi è una certa correlazione lineare a valori superiori a 100 µM (corrispondente alla parte asintotica della variazione del C.V.), mentre al di sotto di questa concentrazione vi è un forte discostamento, in quanto si ottengono valori inferiori (e quindi più precisi) di quelli ricavabili per estrapolazione. Questo effetto è meno sensibile nel caso del nitrato, che presenta un picco più simmetrico e gaussiano: questo dimostrerebbe che i fattori limitanti della ripetibilità a basse concentrazioni (legati alla stabilità della linea di base) sono diversi da quelli limitanti ad alte concentrazioni, che risultano invece proporzionali alla concentrazione dell'analita.

### 3.4 - Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità è necessario conoscere qual è il contributo alla varianza totale da parte di tutti i parametri e le operazioni che costituiscono un metodo analitico: per far ciò abbiamo analizzato in doppio in quattro giorni diversi a distanza di una settimana uno dall'altro, una serie di 16 standard multipli a concentrazioni crescenti che sono stati preparati di fresco ogni volta. In questo modo alla varianza indotta dal sistema di iniezione e dalle fluttuazioni di risposta strumentali in tempi ravvicinati, si aggiunge la varianza indotta dalla preparazione degli standard e dalle variazioni di risposta strumentali in tempi più lunghi. I risultati sono presentati nella Tab. 3 come media della serie di 8 misure per ciascun campione.

Confrontando questi dati con i valori di ripetibilità *inter dies* (Tab. 2), si nota che non vi è una sostanziale differenza: si può quindi dedurre che gli errori dovuti alla preparazione degli standard influiscono in maniera trascurabile sulla varianza totale, e quindi dominano gli effetti puramente strumentali.

Mettendo in grafico il coefficiente di variazione in funzione della concentrazione è possibile, (Fig. 3) interpolando l'equazione di un'iperbole, definire con una certa confidenza come si distribuisce l'errore nell'intero campo di concentrazione. Questa equazione interpolante può essere applicata per avere una valutazione *a priori* dell'errore associato ad uno standard in una taratura. Dall'equazione della curva interpolante degli errori si può anche ricavare, per estrapolazione, il valore minimo di concentrazione che può essere ottenuto con una data precisione: ad esempio se fissiamo al 20% l'errore minimo accettabile possiamo ricavare per estrapolazione un dato che può essere ricondotto al concetto di minima concentrazione quantificabile, ovvero LOQ (Limit of Quantification). Per cloruro, nitrato e solfato si ottengono rispettivamente i seguenti valori di LOQ: 0,59, 0,35 e 0,32 µM.

Tab. 2 - Prove di ripetibilità

	Cloruro ( $\mu\text{M}$ )	1	2	10	20	100	200	1000
1° giorno	media	596333	735462	5163170	10985455	61994867	132919701	788613305
	CV	5,6	7,2	3,2	3,0	2,9	2,4	0,9
2° giorno	media	433552	641904	5157321	10519057	60124738	132707689	788714355
	CV	3,6	4,2	5,0	3,0	1,1	1,0	0,8
3° giorno	media	381968	718810	5137312	10963220	62980170	137624011	814752281
	CV	5,3	2,3	1,6	3,8	2,6	0,9	0,9
4° giorno	media	366852	823543	5301960	10533555	61794940	131986836	790698486
	CV	2,9	3,2	3,3	1,5	1,8	0,7	1,9
	media	444676	729930	5189941	10750322	61723679	133809559	795694607
<i>intra dies</i>	CV	4,3	4,2	3,3	2,8	2,1	1,2	1,1
<i>inter dies</i>	CV	20,0	10,0	3,4	3,5	2,7	2,1	1,8

	Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	1	2	10	20	100	200	1000
1° giorno	media	471179	705522	5141896	10283361	57676664	122350679	720136780
	CV	14,1	2,5	2,1	2,3	0,8	1,3	1,0
2° giorno	media	433580	692710	5042898	10368509	56462503	122259433	714798573
	CV	4,9	4,3	3,8	2,7	1,9	1,3	0,9
3° giorno	media	450231	727287	5238944	10467354	59298696	126011898	740599055
	CV	5,9	5,7	3,7	1,2	1,2	0,8	0,3
4° giorno	media	450476	709531	5188519	10312606	57286078	123228419	715854682
	CV	5,5	4,5	1,5	0,9	0,7	1,2	1,6
	media	451367	708763	5153065	10357958	57680985	123462607	722847272
<i>intra dies</i>	CV	7,6	4,3	2,8	1,8	1,2	1,2	1,0
<i>inter dies</i>	CV	8,1	4,5	3,1	1,9	2,2	1,7	1,8

	Solfato ( $\mu\text{M}$ )	1	2	10	20	100	200	1000
1° giorno	media	1007061	1599030	10919841	22031110	122096514	263320050	1558236284
	CV	3,2	6,4	2,0	1,8	1,6	1,9	0,5
2° giorno	media	978893	1507497	10593810	21805574	119533827	261820100	1548762440
	CV	2,5	3,2	2,9	1,7	3,1	0,4	0,4
3° giorno	media	1044001	1616008	10792114	22167534	125636978	270214777	1592795640
	CV	7,4	6,2	1,6	2,0	1,0	0,3	0,3
4° giorno	media	1019693	1662960	11112292	21731485	122715266	262997034	1546747871
	CV	2,4	1,8	1,4	0,9	0,6	0,6	1,9
	media	1012412	1596374	10854514	21933926	122495647	264587990	1561635559
<i>intra dies</i>	CV	3,9	4,4	2,0	1,6	1,6	0,8	0,8
<i>inter dies</i>	CV	5,6	5,7	2,6	1,7	2,5	1,6	1,5

Tab. 3 - Prove di riproducibilità

µM	Cloruro		Nitrato		Solfato	
	media	CV	media	CV	media	CV
1	365919	11,6	433053	8,0	997193	8,3
2	919963	8,6	927243	4,8	2077930	2,8
3	1521833	6,7	1524363	5,3	3204434	3,8
5	2478501	4,5	2546032	5,0	5349109	4,5
6	2930091	8,0	2942624	5,7	6425829	6,3
10	5193367	3,3	5032194	3,7	10873072	3,4
20	10756526	2,5	10666765	2,5	22376567	2,4
30	16756991	2,3	16435202	2,1	34128697	1,3
50	29231349	2,0	28057208	2,3	58790632	1,8
60	35692599	3,1	34198601	2,5	71641307	1,8
100	61792078	2,5	58678039	2,1	123110851	2,3
200	132541984	2,8	122455990	2,1	263436591	2,5
300	210400638	2,0	191834167	1,3	412879849	2,2
500	371637606	2,2	334359625	2,0	728570727	2,1
600	458293450	1,3	415180316	1,2	904111851	1,0
1000	790513026	1,6	715419808	1,6	1549099316	1,8

Questo modo di valutare il limite di quantificazione sembra essere più significativo e realistico che moltiplicare per un numero prefissato (3 o 10) la deviazione standard della linea di base, come riportato nelle gran parte dei lavori (Analytical Methods Committee, 1987).

#### 4 - LA PROCEDURA DI TARATURA

Fino ad ora abbiamo valutato l'errore associato alla determinazione di standard in soluzioni acquose: per avere perciò una stima della riproducibilità totale di una misura con questo metodo analitico, bisogna valutare due altre componenti: l'errore associato alla taratura e l'effetto della matrice (interferenze,

accumulo di specie non eluite, ed altri fattori che possano perturbare la linea di base in maniera casuale o come deriva).

Perciò esamineremo in dettaglio gli aspetti legati alla taratura che, come descritto nell'introduzione, rappresenta il problema più delicato della cromatografia ionica soppressa di anioni e che può rappresentare una fonte notevole di errori sistematici. Da un esame della letteratura si evidenziano due problemi: l'uso di dati non pesati nell'interpolazione delle curve di taratura (Analytical Methods Committee, 1994), e la non linearità delle curve in cromatografia ionica soppressa (Haddad and Jackson, 1990).

E' noto che gli algoritmi di regressione dei minimi quadrati hanno come criterio di iterazione la

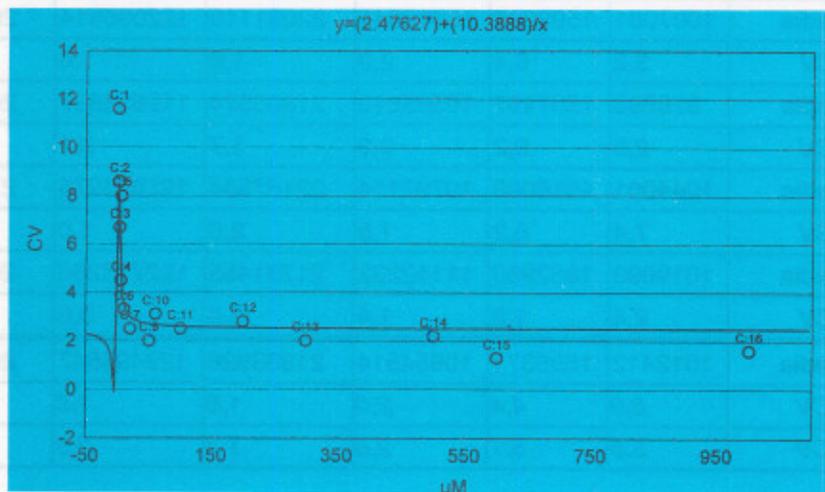


Fig. 3 - Coefficiente di variazione (CV) in funzione della concentrazione (µM) e curva di interpolazione per il cloruro.

minimizzazione della sommatoria S (Bevington and Robinson, 1992):

$$S = \sum_i \left( \frac{y_i^{obs} - y_i^{calc}}{\sigma_i^2} \right)^2 \quad (4.1)$$

dove  $\sigma$  è l'incertezza sulla coordinata y di ciascun punto. Quando si utilizza il metodo dei minimi quadrati bisogna fare certe assunzioni a priori: a) bisogna assumere che per qualunque concentrazione i valori osservati di y seguono una distribuzione normale; b) ciascun valore di y deve essere indipendente da qualunque altro valore di y; c) non vi è errore sulla variabile x, ovvero che le concentrazioni usate sono note con errore trascurabile. Bisogna inoltre distinguere due casi diversi; il caso omoscedastico, nel quale la dispersione delle misure è la stessa per ciascun standard, cioè l'errore è indipendente dalla concentrazione; ed il caso eteroscedastico per il quale vi è un errore diverso associato ad ogni valore della variabile dipendente, che può essere funzione o no della concentrazione. Nel primo caso l'espressione (4.1) si semplifica in quanto l'errore  $\sigma$  è una costante. In generale nella taratura di metodi strumentali siamo sempre in presenza di un caso eteroscedastico, come dimostrato nel paragrafo precedente anche per il nostro caso. Questo comporta la necessità assoluta di considerare l'errore associato ai singoli standard nelle procedure pesando la calibrazione. I normali algoritmi presenti nei software cromatografici non prevedono l'uso di regressioni pesate: in questo modo si considera che il valore assoluto dell'errore sia uguale in tutto il campo di concentrazione degli standard, cosicché ne risulta una importanza maggiore ai punti a concentrazioni alte rispetto a quelli di bassa concentrazione (Miller, 1993).

A questo errore di fondo si aggiunge l'usanza di valutare la bontà della regressione mediante il coefficiente di correlazione  $r$  che fa apparire lineari regressioni su molti ordini di grandezza che lineari non possono essere per motivi intrinseci alla tecnica: questo è il caso della cromatografia ionica soppressa (Tartari *et al.*, 1993). I lavori dedicati in letteratura alla non linearità (Tartari *et al.*, 1995; Costa Pessoa *et al.*, 1992; Midgley and Parker, 1989) suggeriscono di ovviare a questo problema con una calibrazione di tipo polinomiale del secondo ordine, opzione peraltro disponibile nella maggior parte dei software di elaborazione dati per cromatografia.

#### 4.1 - Valutazione delle curve di regressione

Per rispondere ad entrambe le problematiche abbiamo voluto perciò confrontare l'applicazione di regressioni lineari e quadratiche, pesate e non pesate per l'errore connesso al punto, partendo dallo stesso set di dati ottenuti per la valutazione della riproducibilità (16 standard a concentrazioni crescenti

che coprono un intervallo di 3 ordini di grandezza da 1 a 1000  $\mu\text{M}$ ). In Tab. 4 abbiamo riportato per ciascuna concentrazione i valori percentuali del residuo definito come:

$$\text{Residuo} = [(Osservato - predetto) / osservato * 100] \quad (4.2)$$

Dall'esame dei dati delle Tab. 4 e 5 si possono fare le seguenti osservazioni:

- E' evidente l'effetto dell'uso di una regressione pesata rispetto ad una non pesata: l'errore sui punti viene distribuito in maniera omogenea su tutto l'intervallo preso in esame: non pesando i punti si ottengono a basse concentrazioni errori assolutamente non accettabili che superano di dieci volte il valore stesso (2000-1000% per la regressione lineare, 800-500% per quella quadratica)
- Mettendo in grafico i valori residui percentuali in funzione della concentrazione, si può valutare in modo immediato se l'equazione scelta per l'interpolazione può essere considerata una reale relazione tra le variabili o solo una buona equazione semplice per descrivere quantitativamente l'andamento sperimentale. Nel caso in cui l'equazione scelta rappresenti la relazione reale intercorrente tra le due variabili l'errore relativo si distribuirà in maniera casuale attorno allo zero. Se si evidenzia, come in Fig. 4, riferita alla regressione quadratica pesata per il cloruro, un andamento monotono o periodico, si può asserire che si è introdotto un errore sistematico indotto dall'errata scelta della curva interpolante.
- Come noto in letteratura (Analytical Methods Committee, 1988 e 1994), valutare la bontà di una interpolazione mediante il coefficiente di correlazione di Pearson può portare a valutazioni del tutto errate. Per la calibrazione lineare non pesata dei tre anioni (cloruro, nitrato e solfato) si ottengono rispettivamente i seguenti valori del coefficiente di correlazione  $r$ : 0,9991, 0,9992 e 0,9992, valori che sembrano indicare una accettabile linearità su tutto l'intervallo in esame (Tartari *et al.*, 1993). Vi sono metodi statistici più raffinati per valutare la bontà di una interpolazione (ad esempio l'uso della distribuzione del chisquare), e l'argomento è trattato nei libri di statistica (Bevington and Robinson, 1992). Si possono però suggerire due semplici metodi grafici, il primo di mettere in grafico i fattori di risposta, definiti come [(area del picco - intercetta)/concentrazione], in funzione della concentrazione (Green, 1996), l'altro di mettere in grafico i valori residui percentuali in funzione della concentrazione (Fig. 4).

Si può concludere che nel nostro caso la relazione che lega la risposta strumentale alla concentrazione è assai più complessa di una relazione lineare o polinomiale: ovviamente più è alto il grado del polinomio interpolante, minore sarà il residuo sui punti usati per la calibrazione, ma aumenterà

l'incertezza per i punti intermedi. Non è perciò consigliabile utilizzare un polinomio con grado >2, come suggerito da alcuni autori (Tartari *et al.*, 1995), in quanto aumentando il numero di flessi, la curva interpolante tende troppo ad adeguarsi ai singoli punti.

Al contrario di quanto dicono Costa Pessoa *et al.* (1992) è evidente, sia graficamente che dall'analisi dei residui dell'interpolazione lineare, che il discostamento dalla linearità riguarda soprattutto la prima parte della curva, e ciò è facilmente spiegabile con la teoria stessa della soppressione chimica: a valori bassi di concentrazione l'effetto delle variazioni nella conducibilità di fondo è più sensibile.

Per cercare di rendere conto di questa situazione abbiamo provato due approcci:

a) un approccio empirico e fenomenologico:

abbiamo costruito una equazione sufficientemente semplice che rendesse conto di due contributi distinti a basse ed alte concentrazioni: ad alte concentrazioni di analita l'effetto della dissociazione dell'eluente è trascurabile e, quindi, la risposta è funzione lineare della concentrazione.

Alla parte lineare è stato poi aggiunto un termine iperbolico per rendere conto che, a basse concentrazioni, la risposta dovuta alla linea di base (cioè quella dovuta all'eluente) è inversamente legata

alla concentrazione dell'analita (acido forte): infatti quest'ultima è direttamente correlata con la concentrazione di ioni idrogeno liberi che è a sua volta inversamente proporzionale alla concentrazione di anione dissociato dell'eluente secondo l'equazione che regola la costante di dissociazione dell'acido dell'eluente (acido carbonico):

$$[HCO_3^-] = K_{diss} * \frac{[H_2CO_3]}{[H^+]} \quad (4.3)$$

I coefficienti di questa equazione interpolante sono poi stati scelti in modo che la curva passasse dall'origine, che cioè a concentrazioni nulle di analita la risposta fosse nulla. E' stata perciò scritta la seguente equazione:

$$y = a + bx + a^*c/(x-c) \quad (4.4)$$

che è stata poi applicata alla serie di valori riportati in Tab. 3.

In Fig. 5 si può immediatamente vedere come questa equazione sia molto efficace nell'interpolare i nostri valori su tutto l'intervallo dinamico; in Tab. 6 si riportano i valori dei parametri ottenuti per i tre analiti

Tab. 4 - Valori dei residui (percento) calcolati con le diverse curve di interpolazione

µM	Cloruro				Nitrato				Solfato			
	lineare		quadratico		lineare		quadratico		lineare		quadratico	
	non pesato	pesato										
1	2046,7	53,9	802,9	15,4	1365	30,4	429,7	11,7	1387	30,4	536,3	9,1
2	789,3	9,6	304,2	3,3	614,7	0,1	186,3	-1,9	643,9	4,0	243,5	0,5
3	465,3	1,8	177,8	3,4	366,7	-1,8	111,3	1,1	404,8	-2,8	150,3	-0,8
5	261,2	-13,7	91,8	-6,2	204,2	-10,1	57,4	-3,5	225,3	-10,2	79,0	-3,8
6	209,7	-18,8	69,4	-9,7	166,2	-16,5	41,8	-8,7	180,4	-12,0	61,2	-4,6
10	101,6	-18,1	29,2	-6,9	82,5	-17,8	16,0	-8,5	91,1	-14,0	26,6	-4,7
20	28,1	-18,6	1,1	-6,2	25,5	-14,2	1,3	-4,4	27,2	-13,5	2,9	-3,4
30	7,2	-15,7	-5,2	-3,5	8,7	-12,1	-2,5	-2,6	7,3	-12,5	-4,0	-2,5
50	-6,7	-11,6	-8,3	-0,4	-3,9	-10,2	-5,3	-1,3	-6,0	-9,5	-7,4	-0,3
60	-9,3	-10,0	-8,4	0,7	-5,9	-8,7	-5,1	-0,1	-8,4	-8,0	-7,6	0,7
100	-13,8	-6,4	-8,6	2,5	-9,9	-6,0	-5,0	1,2	-12,9	-5,1	-8,0	1,9
200	-12,0	0,4	-5,3	4,9	-10,3	-1,8	-3,8	2,1	-11,0	1,5	-4,6	4,3
300	-7,7	5,8	-1,7	6,4	-7,3	2,4	-1,4	3,2	-7,9	5,7	-2,2	4,7
500	-3,1	11,0	0,6	4,6	-3,8	6,6	-0,1	1,7	-3,3	10,9	0,3	3,0
600	-0,6	13,4	1,8	3,7	-0,6	9,7	1,8	2,2	-0,2	13,8	2,2	2,8
1000	2,1	16,2	-0,4	-6,2	2,1	12,7	-0,3	-5,3	1,9	16,1	-0,4	-7,8

Tab. 5 - Equazioni delle curve interpolanti nell'intervallo dinamico 1-1000 µM

		Equazione	R
<b>Cloruro</b>			
lineare	non pesato	$y = - 7,9E6 (\pm 2,8E6) + 781957 (\pm 8645)*x$	0,9991
	pesato	$y = - 4,9E5 (\pm 2,0E5) + 662607 (\pm 24715)*x$	0,9904
quadratico	non pesato	$y = - 3,2E6 (\pm 1,4E6) + 693262 (\pm 11901)*x + 103 (\pm 13)*x^2$	0,9998
	pesato	$y = - 2,7E5 (\pm 7,8E4) + 579355 (\pm 12911)*x + 260 (\pm 28)*x^2$	0,9978
<b>Nitrato</b>			
lineare	non pesato	$y = - 6,2E6 (\pm 2,5E6) + 706498 (\pm 7467)*x$	0,9992
	pesato	$y = - 3,2E5 (\pm 1,2E5) + 625100(\pm 16328)*x$	0,9915
quadratico	non pesato	$y = - 2,0E6 (\pm 9,9E5) + 627549 (\pm 8633)*x + 92 (\pm 9)*x^2$	0,9999
	pesato	$y = - 1,8E5 (\pm 4,7E4) + 562202 (\pm 8995)*x + 191 (\pm 20)*x^2$	0,9987
<b>Solfato</b>			
lineare	non pesato	$y = - 1,4E7 (\pm 5,4E6) + 1533417 (\pm 16368)*x$	0,9992
	pesato	$y = - 6,0E5 (\pm 2,8E5) + 1300210 (\pm 43406)*x$	0,9923
quadratico	non pesato	$y = - 5,7E6 (\pm 2,7E6) + 1368070 (\pm 24104)*x + 193 (\pm 27)*x^2$	0,9998
	pesato	$y = - 2,5E5 (\pm 9,3E4) + 1159030 (\pm 18424)*x + 510 (\pm 45)*x^2$	0,9992

Se si osservano i valori dei residui ottenuti con questa equazione, si osserva che si mantengono in un intervallo di  $\pm 2\%$  su quasi tutto l'intervallo dinamico esaminato (a parte i primi due punti che hanno un residuo intorno al 10%, comunque inferiore alla precisione della misura a quella concentrazione), anche se la distribuzione dei residui evidenzia come anche questa equazione non sia la curva fisica che rappresenta i nostri punti, ma solo una ottima curva interpolante. Questa equazione empirica non è però pratica da implementare in un comune programma commerciale, in quanto richiede un'adeguata scelta dei parametri iniziali ed un certo numero di iterazioni per convergere.

b) la semplificazione di equazioni teoriche:

se prendiamo l'equazione sviluppata da Midgley e Parker (1989), basata sul lavoro di Doury-Berthod *et al.* (1985) e ripresa da Costa Pessoa *et al.* (1992), essa può essere scomposta in diverse zone: una zona iniziale lineare, che riguarda però concentrazioni inferiori al nostro limite di quantificazione (Doury-Berthod *et al.*, 1985), a cui segue una parte in cui domina un termine  $\sqrt{(1+x^2)}$ , che, per valori di  $x^2$  sufficientemente piccoli può essere sviluppato in serie dando luogo ad una relazione polinomiale quadratica, ed una zona decisamente lineare a concentrazioni più elevate. La difficoltà di questo approccio sta nel suddividere adeguatamente in zone l'intervallo dinamico d'interesse, il che è possibile tenendo conto di un numero rilevante di variabili, come descritto in Doury-Berthod *et al.* (1985).

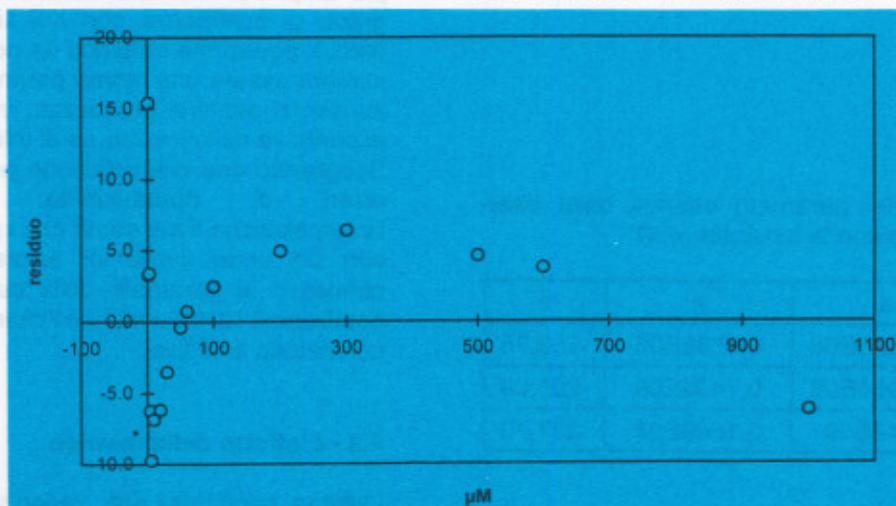


Fig. 4 - Residui percentuali in funzione della concentrazione relativi alla regressione quadratica pesata per il cloruro

## 4.2 - Approccio pratico

Dai risultati fin qui ottenuti si evidenzia il rischio e l'inutilità di una taratura quotidiana dello strumento con un numero limitato di standard non ripetuti. E' inoltre evidente che, per avere delle interpolazioni affidabili anche per valori al limite inferiore dell'intervallo dinamico scelto, è indispensabile poter disporre di punti pesati: non potendo ogni giorno ripetere le iniezioni degli standard per evidenti motivi di tempo, è necessario operare in modo da minimizzare tempi e costi senza perdere in confidenza sui risultati analitici. Vi sono a nostro parere due modalità operative:

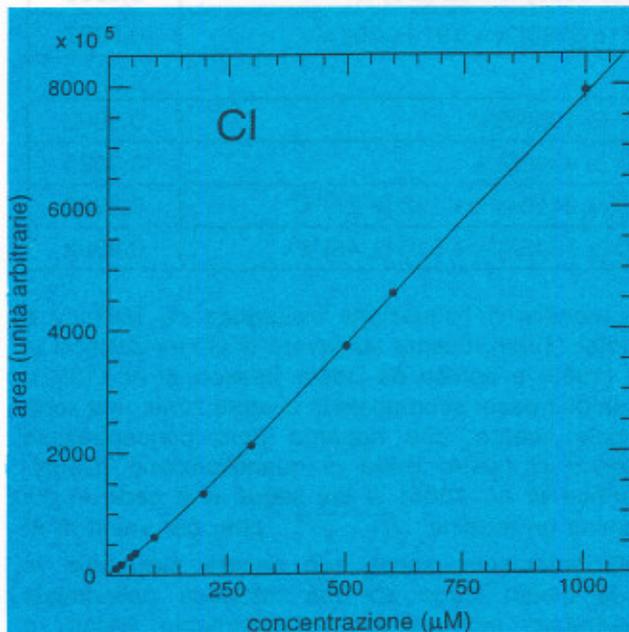


Fig. 5 - Curva di calibrazione per il cloruro ottenuta per interpolazione con la funzione (4.4)

Tab. 6 - Valori dei parametri ottenuti dalla interpolazione con la funzione (4.4)

	a	b	c
cloruro	-0,51525E08	0,8282E06	-153,75
nitrato	-0,50964E08	0,7499E06	-205,09
solfato	-0,144E09	0,1669E07	-237,73

a) calibrare frequentemente utilizzando, per la procedura di interpolazione, gli errori calcolati dalla curva di interpolazione ricavata dalle prove di

riproducibilità (vedi § 3.4). Alla misura singola dello standard viene perciò assegnato un errore prefissato per quell'intervallo di concentrazione: è perciò consigliabile sempre una seconda misura per ovviare ad errori casuali grossolani, quali un prelievo o una iniezione non corretta, sbalzi improvvisi del rivelatore, ecc..

b) ricalibrare periodicamente in maniera completa. Dal confronto tra le prove di ripetibilità *inter dies* (effettuate in quattro giorni consecutivi) con le prove di riproducibilità (eseguite in quattro giorni distanziati ciascuno da una settimana) si può notare come l'errore, stimato come coefficiente di variazione, sia del tutto confrontabile. Questo ci porta a dire che una cadenza mensile di ricalibrazione può essere adeguata a fornire una curva di taratura affidabile. E' necessario però che all'inizio di ciascuna serie di analisi, e ad intervalli regolari, si inietti un campione noto di riferimento (del quale si conosca la stabilità nel tempo), che dia una risposta il cui valore deve rientrare all'interno di una fascia di confidenza prestabilita. La raccolta di questi dati nel tempo permette di evidenziare anche trend temporali di deriva dovuti ad esempio all'usura, e quindi alla perdita di efficienza, della colonna analitica o del sistema di rivelazione. L'individuazione della pendenza di questa eventuale deriva può essere un dato su cui basare la scelta della frequenza di calibrazione oppure il motivo per optare per la procedura indicata al punto a).

Riguardo alla scelta del tipo di curva interpolante, bisogna individuare con attenzione gli intervalli di interesse (che sono funzione della tipologia del campione e della sua provenienza) e quindi devono essere scelti in base alla specifica esperienza dell'operatore). Si può verificare che per valori al di sopra di 300 µM la calibrazione lineare è altamente rappresentativa dei dati, mentre per valori inferiori è indispensabile una calibrazione quadratica. Per valori più ampi dell'intervallo dinamico bisogna valutare il grado di confidenza con cui si vuole conoscere il dato. L'equazione empirica da noi presentata al § 4.1 sembra essere una ottima parametrizzazione dei dati su diversi ordini di grandezza, ma richiede una certa esperienza nelle procedure di interpolazione.

Scegliendo una interpolazione pesata si utilizzano gli errori di riproducibilità: di conseguenza l'interpolazione tiene conto che i punti sono conosciuti con un certo livello di errore, e quindi l'errore connesso ai parametri della curva (termine noto e coefficienti) rende conto dell'intera varianza connessa col metodo analitico.

## 4.3 - L'effetto della matrice

L'ultimo contributo alla varianza totale può essere individuato nella matrice: da lavori eseguiti in precedenza nei nostri laboratori risulta però evidente

che lavorando su acque pulite, meteoriche, otobili o superficiali, la matrice naturale non si differenzia al punto di vista cromatografico, da acqua ultrapura da laboratorio. L'effetto della matrice, in questi casi trascurabile, dovrà essere preso in esame nel caso di applicazione di questa tecnica ad acque marine o di scarico.

## 5 - CONCLUSIONI

Un'esigenza fondamentale della chimica analitica strumentale è poter dare una valutazione corretta dell'errore associato alla misura ottenuta con un dato metodo: spesso i dati di riproducibilità presenti in letteratura vengono forniti dalle case costruttrici come riproducibilità della risposta strumentale. Si trascura in questo modo la fonte più elevata di errore rappresentata dalla procedura di taratura. Nel caso della cromatografia ionica soppressa era noto da tempo che le curve di calibrazione presentavano, per motivi intrinseci alla tecnica, un effetto marcato di non linearità, che ha dato luogo a molte perplessità da parte degli operatori analitici. Con questo lavoro abbiamo cercato, partendo dall'esperienza acquisita nei nostri laboratori, di determinare l'entità delle varie fonti di errore, e valutare qual è l'influenza della procedura di calibrazione rispetto ad altri parametri. Si evidenzia che l'uso di una curva di taratura lineare porta ad errori evidenti soprattutto nella parte a concentrazioni basse, in particolare se non si applica una corretta procedura di pesatura della interpolazione. La necessità di pesare i punti porta a dover diradare il tempo intercorrente tra calibrazioni successive. La scelta della frequenza di una nuova taratura può essere dedotta da un test di riproducibilità, anche se il sistema deve essere tenuto sotto costante controllo mediante campioni di riferimento.

## BIBLIOGRAFIA

A.P.H.A, A.W.W.A. and W.E.F. (1992): "Method 4110: Determination of anions by ion chromatography", in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, XVIIIth ed., Washington., USA., 4.1 - 4.8.

Achilli M. and Romele L. (1996): "Influence of non linearity of calibration curve on analytical accuracy in suppressed anion chromatography", proposto per la pubblicazione a *J. Chromatogr.*

Analytical Methods Committee (1987): "Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit", *Analyst*, **112**, 199-204.

Analytical Methods Committee (1988): "Uses (Proper and Improper) of Correlation Coefficients", *Analyst*, **113**, 1469-1471.

Analytical Methods Committee (1994): "Is my calibration linear?", *Analyst*, **119**, 2363-2366.

Bevington P. R. and Robinson D. K. (1992): "*Data reduction and error analysis for the physical sciences*", 2nd ed., McGraw-Hill, Inc.

Costa Pessoa J., Gameiro A, Goncalves M. C. and Fermio A. S. (1992): "Non-linearity of calibrations in the analysis of anions by Ion-Chromatography with suppressed conductivity detection", *Portugaliae Electrochim. Acta*, **10**, 49-61.

Doury-Berthod M., Giampaoli P., Pitsch H., Sella C. and Poitrenaud C. (1985): "Theoretical approach of dual-column Ion Chromatography", *Anal. Chem.*, **57**, 2257-2263.

EMEP (1996): "*EMEP manual for sampling and chemical analysis*", Norwegian Institute for Air Research, Kjeller, Norway, 4.1 - 4.7.

Food and Drug Administration (1987): "*Guideline for Submitting Sample and Analytical Data for Method Validation*".

Green J. M. (1996): "A practical guide to analytical method validation", *Anal. Chem.*, **68**, 305A-309A.

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

Inman E. L., Frischmann J. K., Jimenez P. J., Winkel, G. D., Persinger M. L. and Rutherford B. S. (1987): "General method validation guidelines for pharmaceutical samples", *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 252-256.

IRSA, (1994): "Metodi Analitici per le Acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**, ed. Ist Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, pp. 342

Jenke D. R. (1996a): "Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19**, 719-736.

Jenke D. R. (1996b): "Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19**, 737-757.

Jenke D. R. (1996c): "Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. III. Ruggedness, revalidation and system suitability", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19**, 1873-1891.

Midgley D. and Parker R. L. (1989): "Non-linearity of calibration in the determination of anions by ion chromatography with suppressed conductivity detection", *Talanta*, **36**, 1277-1283.

Miller J. N. (1993): "Calibration methods. VII: Weighted regression", *Spectrosc. Europe*, **5**, 22-24.

Polesello S. (1996): "How to present an analytical method", *Food Chem.*, in corso di stampa.

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

Tartari G., Valsecchi S. e Cavalli S. (1993): "Limiti di rivelabilità, linearità e ripetibilità nella determinazione mediante cromatografia ionica di anioni nelle acque", *Acqua & Aria*, **8**, 873-882.

UNICHIM (1991): "Norma UNI 9813: Analisi degli anioni mediante cromatografia ionica e mediante cromatografia liquida ad alta pressione", 1-27.

IUPAC (1991): "Analysis of wet deposition (acid rain): determination of the major anionic constituents by ion chromatography", *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 907-915.

US EPA (1986a): "Method 300.6: Chloride, Orthophosphate, Nitrate and Sulfate in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography", USEPA, Washington, DC "

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

US EPA (1991): " Test Method: the determination of Inorganic Anions in Water by ion Chromatography-Method 300.0", USEPA, Washington, DC.

Valsecchi S. e Tartari G. (1992): "Determinazione di alcune specie anioniche in cromatografia ionica", *Notiziario dei metodi analitici per le acque*, **12**, 1-9.

Youden W. J. and Steiner E. H. ( 1975): "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", Arlington, VA.

## NOTA

La validazione completa di un metodo analitico può essere operazione lunga e noiosa, ma le conseguenze di una mancata validazione corretta sono rappresentate da sprechi di tempo, denaro, risorse. Al contrario se tale operazione viene considerata, come giusto che sia, un investimento per aumentare il capitale dei propri dati sperimentali, i risultati saranno positivi per lo sperimentatore e per la comunità.

Lo sviluppo e la validazione di un nuovo metodo possono innescare un processo iterativo se i risultati ottenuti nel corso della procedura di validazione rendono necessaria l'introduzione di modifiche nella metodica analitica testata. Al fine di evitare ripetizioni ed assicurare che i dati di validazione vengano generati nelle stesse condizioni previste dalla procedura analitica, l'articolo che

segnaliamo suggerisce i criteri e la corretta sequenza con cui impostare i suddetti studi di validazione.

La specificità di un metodo, vale a dire la capacità di misurare accuratamente la risposta dell'analita in presenza di tutti i potenziali componenti del campione, è il primo elemento da prendere in considerazione. Le condizioni sperimentali che assicurano un'accettabile risoluzione dell'analita di interesse (ad esempio, per un metodo che impiega la cromatografia liquida, la composizione della fase mobile, la velocità di flusso, il tipo di colonna e di rivelatore) vengono fissate e mantenute nel corso di tutte le prove di verifica successive.

Poi si passa a valutare la linearità del metodo attraverso la costruzione della retta di calibrazione e la definizione dei valori del coefficiente di correlazione e dell'intercetta della retta, quindi l'accuratezza mediante prove di recupero dell'analita a diverse concentrazioni significative. A questo punto è possibile definire un intervallo di concentrazioni in cui il metodo offre valori di accuratezza, linearità e precisione accettabili.

La precisione del metodo viene ulteriormente verificata attraverso prove effettuate da uno stesso operatore in uno stesso laboratorio (ripetibilità). Viene definito quindi il limite di rilevabilità del metodo, cioè la concentrazione più bassa di analita in grado di assicurare una risposta discriminabile dal rumore di fondo (es. segnale/rumore=3) e il limite di quantificazione cioè la più bassa concentrazione a cui un'analita può essere determinato in modo accurato e preciso (es. rapporto segnale/rumore=10). La stabilità del metodo intesa come stabilità delle soluzioni standard, dei campioni e dei reattivi utilizzati per l'analisi deve essere valutata in un'intervallo di almeno 48 ore. Vanno definite, ove necessario, le condizioni di conservazione che assicurano tale stabilità.

A questo punto il metodo è definito in tutti i suoi aspetti ed è pronto ad essere sottoposto a verifica da parte di operatori differenti in laboratori diversi. I dati di precisione ottenuti in questi test danno una misura della riproducibilità del metodo.

Va definita, infine, la robustezza di un metodo, vale a dire la capacità di mantenere inalterate le proprie prestazioni in presenza di piccole fluttuazioni di alcuni parametri (es. pH, composizione della fase mobile, volume iniettato ecc.).

Il lavoro di Valsecchi e Polesello "Problemi di taratura nell'analisi di anioni mediante cromatografia ionica soppressa", presentato in precedenza, costituisce un esempio di applicazione di un modello di validazione a un metodo di analisi dei principali anioni basato sulla cromatografia ionica.

a cura di Luigi Campanella\* e Silvio Capri\*\*

\*Università "La Sapienza" - Roma;

\*\*CNR, Istituto di Ricerca Sulle Acque, Roma.

## QUESTIONARIO

Si invitano gli operatori a compilare il presente questionario apponendo una crocetta in corrispondenza della metodologia più comunemente seguita per la determinazione dei vari inquinanti, tenendo presente non soltanto le attività inerenti il controllo degli effluenti, per le quali i metodi IRSA costituiscono un vincolo normativo, ma anche tutte le altre attività di controllo (piani di monitoraggio regionale, controllo di qualità delle acque di balneazione etc.) attinenti le proprie responsabilità istituzionali. Nella casella indicata dalla voce altro inserire eventuali tecniche non elencate nel questionario accompagnandole da una breve descrizione del protocollo operativo seguito. Si ringrazia vivamente per la collaborazione.

### METALLI E SPECIE METALLICHE

Metallo \ Metodo	As	Ba	Be	B	Cd	Ca	Cr	Fe	Li	Mg	Mn	Hg	Ni	Pb	K	Se	Na	Tl	Te	Zn	
Colorimetria																					
AAS																					
GFAAS																					
Idruri																					
ICP-AES																					
IC																					
Metodi Elettrochimici																					
Altro																					

IC = cromatografia ionica

AAS = assorbimento atomico in fiamma

GFAAS = assorbimento atomico al fornetto di grafite

ICP-AES = spettrometria di emissione chimica con sorgente a plasma

### COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

Costituente \ Metodo	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub>	CN <sup>-</sup>	Cl <sub>2</sub>	Cl <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	O <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> S
Colorimetria														
IC														
Titrimetria														
Potenziometria														
Gravimetria														
Turbidimetria														
Altro														

IC = cromatografia ionica

## COSTITUENTI ORGANICI

Costituente \ Metodo	R-CHO	R-NH <sub>2</sub>	N-org	C-org	Erb. azot.	PhOH	Pest. clor.	Pest. fosf.	PCB PCT	BOD	COD	Solv. arom.	Solv. clor.	Sost. oleose	Tens. anion.	Tens. non ionici
Colorimetria																
Potenziometria																
Gravimetria																
Titrimetria																
GC																
HPLC																
GC-MS																
HPLC-MS																
Altro																

GC = gas-cromatografia  
HPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione  
MS = spettrometria di massa  
PhOH = fenoli  
R-CHO = aldeidi alifatiche  
R-NH<sub>2</sub> = ammine alifatiche

*Istituto di ricerca sulle acque - cnr*

### NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Costituente \ Metodo	R-CHO	R-NH <sub>2</sub>	N-org	C-org	Erb. azot.	PhOH	Pest. clor.	Pest. fosf.	PCB PCT	BOD	COD	Solv. arom.	Solv. clor.	Sost. oleose	Tens. anion.	Tens. non ionici
Colorimetria																
IC																
Titrimetria																
Potenziometria																

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  
 Grafica ed elaborazione su computer: P. Fusco  
 Allestimento e stampa: C. Pastore