



Consiglio Nazionale delle Ricerche
 Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
 Verbania Pallanza
 Laboratorio di idrochimica - metodi analitici ad uso interno
 a cura di Gabriele TARTARI



INTRODUZIONE ALL'ANALISI IN SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO MOLECOLARE

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

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

Le analisi in assorbimento molecolare di seguito descritte sono quelle risultate più adatte all'applicazione in campo limnologico, sulla base dell'esperienza acquisita, e sono attualmente in uso presso il Laboratorio di Idrochimica del C.N.R. Istituto per lo Studio degli Ecosistemi di Verbania Pallanza.

In figura 1 si può vedere lo spettrofotometro a doppio raggio SAFAS UV mc² (range 185-1050 nm) attualmente utilizzato nel laboratorio del CNR-ISE di Verbania Pallanza, le cui specifiche sono descritte nel paragrafo caratteristiche dello spettrofotometro e controlli annuali delle prestazioni per le determinazioni spettrofotometriche. In tabella 1 sono invece elencati gli strumenti utilizzati dall'anno 1939 nello stesso laboratorio.



Fig. 1. Spettrofotometro doppio raggio SAFAS UV mc² (range 185-1050 nm) e pannello di lettura a lunghezza d'onda fissa, in uso dall'anno 2000 nel laboratorio del CNR-ISE di Verbania.

Tab. 1 Strumentazione utilizzata per le analisi colorimetriche e spettrofotometriche nei laboratori del CNR-ISE di Verbania dall'anno 1939.

Periodo di utilizzo	Strumento in uso
1939 - '50	Spettrofotometro Coleman 6A
1950 - '56	Colorimetro Lumetron
1956 - '70	Spettrofotometro UV - Spek (200 - 1000 nm)
1970 - '77	Spettrofotometro Optica CF4 (190 - 1000 nm)
1977 - '87	Spettrofotometro Beckman 25 (190 - 900 nm)
1987 - '92	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 1A (190 - 900 nm)
1992 - '94	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2 (190 - 1100 nm) con software PECSS
1994 - '00	Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2 (190 - 1100 nm) con software UV Win Lab
dal 2000	Spettrofotometro SAFAS UV mc ² (180 - 1050 nm) con software SP 2000 versione 6.7 e Sampling Manager

Nell'esposizione di ogni metodo vi è una breve descrizione sul principio della determinazione, viene poi riportato il passo ottico delle cuvette utilizzate, l'intervallo analitico comunemente utilizzato all'interno del laboratorio in riferimento al passo ottico delle cuvette, il limite di rivelabilità (LOD) ed limite di quantificazione (LOQ) e le informazioni riguardanti la ripetibilità del metodo a diverse concentrazioni, ottenute sulla base delle carte di controllo utilizzate nel laboratorio a partire dagli anni '90. I valori riportati si riferiscono alle condizioni ottimizzate per l'analisi di routine presso il laboratorio dell'Istituto; eventuali adattamenti ad altri intervalli analitici richiedono adeguate ottimizzazioni e verifiche analitiche. Vengono poi descritti i reagenti e la vetreria necessari per la determinazione, il procedimento analitico e gli *standard* utilizzati per la preparazione e la verifica della calibrazione, i calcoli e l'espressione dei risultati; al termine sono riportati i riferimenti bibliografici più significativi a cui fanno riferimento i metodi. Nelle descrizioni verrà fatto riferimento esclusivamente agli aspetti pratici più direttamente collegati all'uso dei metodi; per una trattazione più approfondita dei concetti di base riguardanti i metodi spettrofotometrici e le caratteristiche strumentali si rimanda ai seguenti testi Denney & Sinclair (1987), Douglas & Leary. (1995), UNICHIM Manuale N. 177/6 (1995), Cozzi e al. (2005). Mentre per una approfondita trattazione delle metodologie analitiche utilizzate nel CNR-ISE di Verbania fino al 1996 si veda Tartari & Mosello (1997).

CARATTERISTICHE DELLO SPETTROFOTOMETRO E CONTROLLI ANNUALI DELLE PRESTAZIONI

Le principali caratteristiche dello spettrofotometro SAFAS UV mc² in uso dall'anno 2000 nel laboratorio del CNR-ISE di Verbania sono le seguenti:

- intervallo di lunghezze d'onda 185 ÷ 1050 nm;
- doppio raggio effettivo con uguale energia automaticamente ripartita su entrambi i raggi;
- accuratezza fotometrica $\pm 0,2$ nm
- risoluzione 0,1 nm;
- fenditura 2 nm;
- sorgenti luminose lampada al tungsteno e al deuterio ad allineamento automatico;
- rivelatore a fotodiodi;
- fenditura 2 nm;
- deriva molto contenuta ($<0,002$ A/ora) a tutte le lunghezze d'onda;

- vano porta cuvette da 0,5, 1, 2 e 5 cm di passo ottico.

Le prestazioni dello spettrofotometro devono essere controllate almeno con frequenza annuale; per una descrizione approfondita sulle linee guida per la taratura si veda il manuale UNICHIM N. 177/6 (1995). Nel laboratorio del CNR-ISE di Verbania i controlli regolarmente eseguiti con frequenza annuale dagli anni '90 sono riportati qui di seguito.

- Verifica dell'accuratezza e della ripetibilità delle lunghezze d'onda nell'intervallo 235÷350 nm, utilizzando potassio bicromato 60 mg L⁻¹ in acido solforico 0,01 N (Fig. 2). La variabilità accettata secondo la Farmacopea Europea è di $\pm 0,010$ uA per le letture in assorbanza alle lunghezze d'onda: 235 nm = 0,747 A, 257 nm = 0,869 A, 313 nm = 0,293 A, 350 nm = 0,644 A. In figura 3 viene riportato l'andamento delle differenze di assorbanza rispetto i valori attesi, i dati si riferiscono ai due spettrofotometri utilizzati nel periodo, Perkin Elmer Lambda 2 e SAFAS UV mc².
- Misura dell'energia emessa delle lampade (deuterio e tungsteno) e quantificata dal rivelatore; le variazioni sono rappresentative dell'invecchiamento dell'ottica in termini di riflessioni degli specchi e di prestazioni delle lampade (Fig. 4).
- Spettro dello stesso filtro all'ossido di olmio nell'intervallo 250÷700 nm, dove la perfetta sovrapposizione di più spettri eseguiti negli anni è la conferma della ripetibilità strumentale (Fig. 5).
- Stabilità dell'azzeramento alle lunghezze d'onda di 220 e 890 nm (Fig. 6).
- Controllo della linearità fotometrica o zona di validità della legge di Lambert-Beer, effettuata con potassio bicromato nell'intervallo 5÷300 mg L⁻¹ in acido solforico 0,01 N alle lunghezze d'onda di 350 e 257 nm con cuvetta in quarzo da 1 cm di passo ottico. Le letture si eseguono alle concentrazioni di 60, 90, 120, 150, 225 e 300 mg L⁻¹ controllando dapprima la corrispondenza con le assorbanze teoriche del potassio bicromato 60 mg L⁻¹ (257 nm = 0,869 A e 350 nm = 0,644 A), ed in seguito verificando l'andamento lineare della risposta dello spettrofotometro. In figura 7 sono riportati gli esempi delle due lunghezze d'onda, dai quali si vede che la linearità fotometrica dello spettrofotometro arriva a circa 1,5÷1,8 u. A.

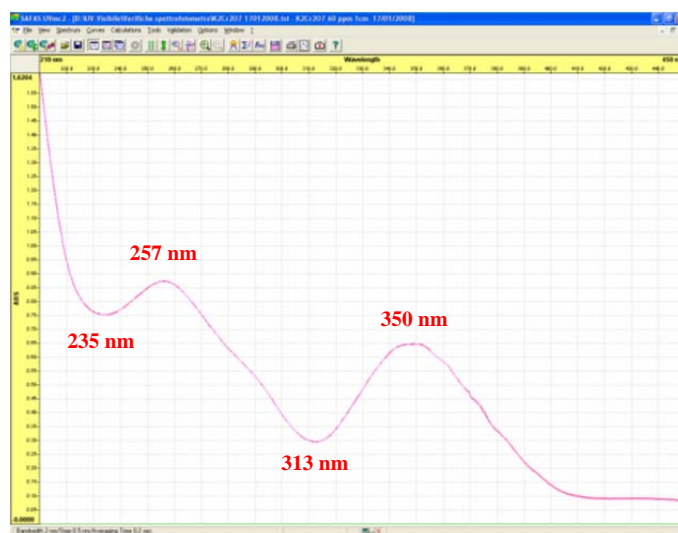


Fig. 2. Spettro di assorbimento del potassio bicromato nell'intervallo 210÷450 nm (cuvetta quarzo 1 cm di passo ottico), sono riportate le lunghezze d'onda di riferimento per i controlli secondo la Farmacopea Europea.

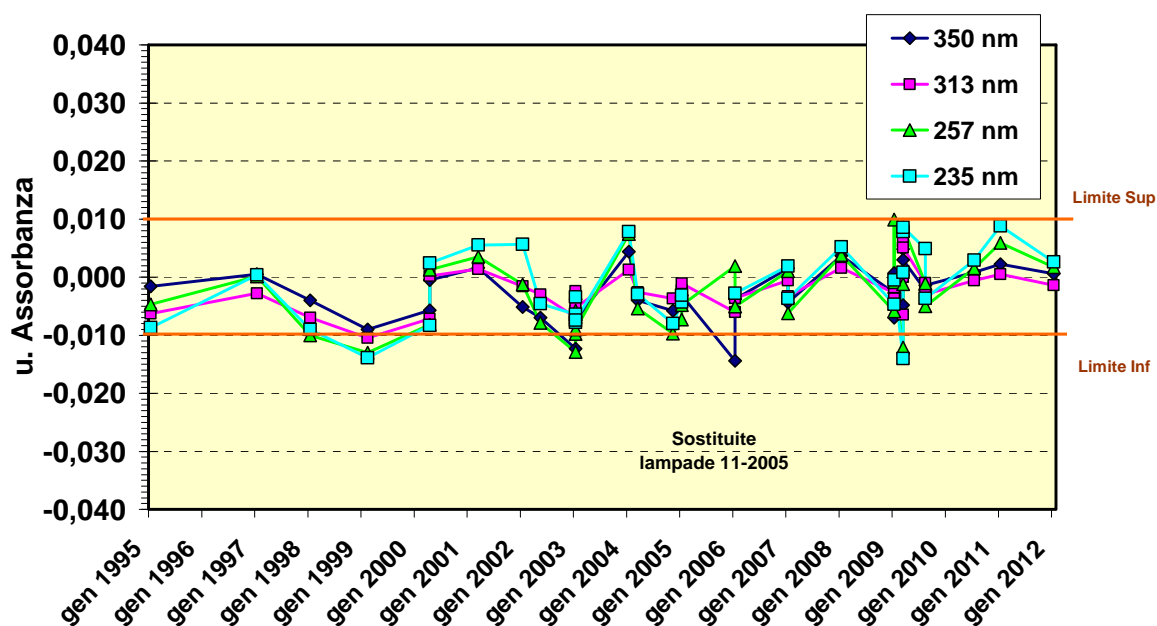


Fig. 3. Verifica dell'accuratezza fotometrica alle lunghezze d'onda di 235, 257, 313 e 350 nm; la differenza in u.A tra valore misurato ed atteso deve essere compreso entro i limiti della Farmacopea Europea di $\pm 0,010$ A del valore atteso.

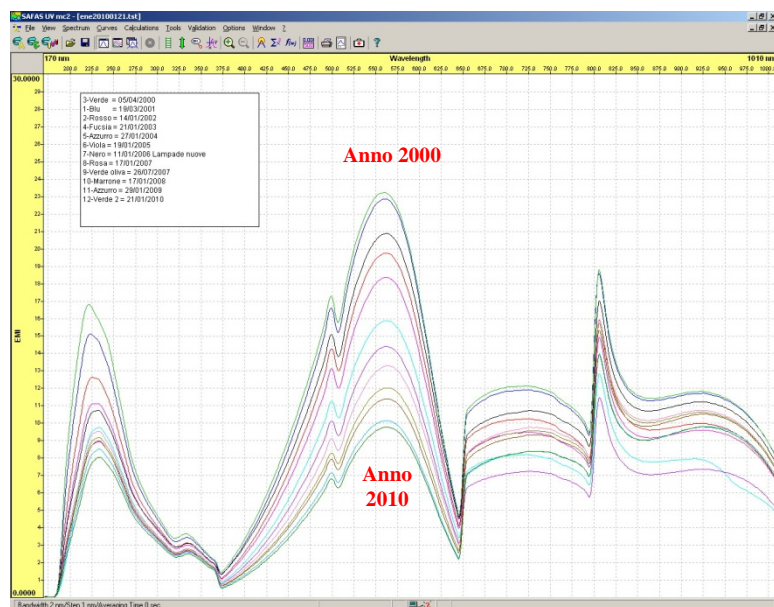


Fig. 4. Andamenti dell'emissione di energia dello spettrofotometro SAFAS UV mc² nell'intervallo di lunghezze d'onda 170÷1010 nm; si noti l'invecchiamento evidenziato dalla diminuzione di energia sul massimo a circa 550 nm tra l'anno 2000 (linea verde) ed il 2010 (linea verde).

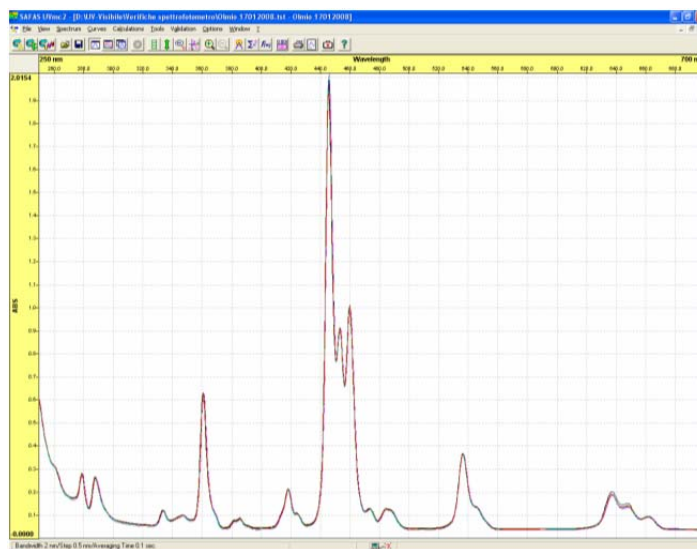


Fig. 5. Ripetibilità nella lettura dello stesso filtro all'ossido di olmio nell'intervallo 250÷700 nm.; la perfetta sovrapposizione degli spettri di assorbimento negli anni 2000÷2010 conferma la ripetibilità strumentale.

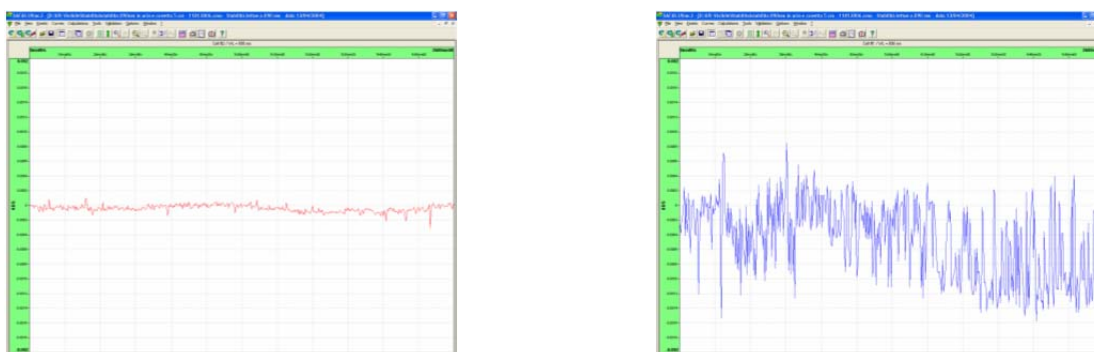


Fig. 6. Esempi per lo spettrofotometro SAFAS UV mc², di due ore di stabilità dell'azzeramento a 890 nm in aria (linea rossa entro ±0,0002 A) e con cuvetta 5 cm con acqua ultrapura (linea blu entro ±0,0013 A). Come si vede dalle oscillazioni nell'intervallo della scala in assorbanza (±0,002 A), l'azzeramento sul raggio in aria è molto più stabile, per questo motivo si consiglia di non utilizzare la cuvetta con acqua ultrapura sul raggio di riferimento.

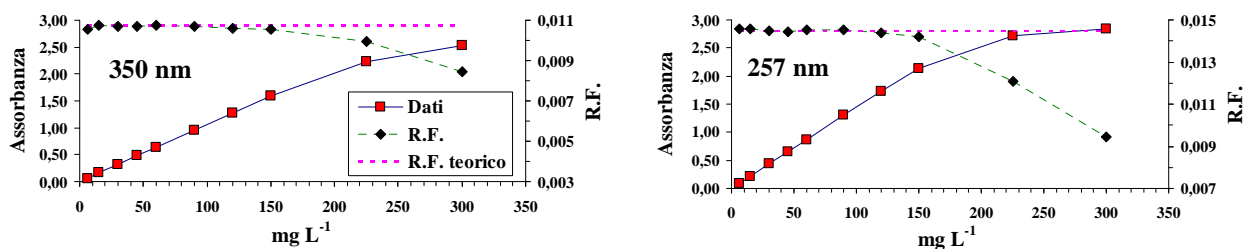


Fig. 7. Linearità fotometrica eseguita con potassio bicromato tra le concentrazioni 6÷300 mg L⁻¹ alle lunghezze d'onda di 350 e 257 nm. L'evidente scostamento dei valori di R.F. dai valori teorici (R.F. 0,01073 e 0,01448 rispettivamente per 350 e 257 nm) alle concentrazioni di 225 e 300 mg L⁻¹ di K₂Cr₂O₇, indica la non linearità fotometrica dello spettrofotometro SAFAS UV mc²

CUVETTE ED AZZERAMENTO STRUMENTALE CON I BIANCHI

Le cuvette o celle per la lettura spettrofotometrica possono essere di vario tipo con forme e dimensioni diverse. Per queste applicazioni si utilizzano cuvette forma parallelepipedica con passi ottici compresi tra 5 e 100 mm, di cui i più utilizzati sono 5, 10, 20 e 50 mm contenenti rispettivamente volumi di circa 1,5, 3, 6 e 14 mL di campione. Per l'utilizzo con i metodi descritti in questo capitolo si consiglia l'uso di cuvette rettangolari possibilmente otticamente appaiate, ricordando che per le analisi nel visibile devono essere in vetro e per l'analisi nell'ultravioletto (al di sotto di 350 nm) devono essere in quarzo ad elevata trasparenza fino a 200 nm. E' sconsigliato l'uso di cuvette monouso in materiale plastico che possono dare risultati poco attendibili a causa della elevata variabilità costruttiva. Le cuvette vanno sempre maneggiate con cura senza toccare le dita la parte ottica che deve essere attraversata dal raggio di lettura; per la loro pulizia si consiglia il lavaggio con acqua deionizzata, dopo ogni serie di letture, ed un periodico lavaggio per immersione in acido solforico diluito 1:1 o in detergenti per il lavaggio della vetreria, seguito da un risciacquo in acqua deionizzata. L'asciugatura prima dell'uso in lettura si esegue con morbida carta assorbente e senza eccessivi sfregamenti, evitando assolutamente di lasciare impronte digitali sui lati ottici. Per la conservazione, tra una lettura e l'altra, si consiglia l'immersione in acqua deionizzata. Altra particolare attenzione durante l'uso delle cuvette per spettrofotometria riguarda l'utilizzo di soluzioni fredde che possono provocare condensa sulle superfici ottiche esterne; anche la formazione di bollicine sulle pareti interne della cuvette può alterare la misura. L'inserimento delle cuvette nello spettrofotometro deve avvenire sempre nella stessa posizione ed orientamento e posizionate il più vicino possibile al rivelatore (fotodiodi o fotomoltiplicatore); questo accorgimento permette di limitare le interferenze di *scattering* causate dall'eventuale particolato presente nel campione.

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

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

Prima di passare alle modalità di azzeramento chiariamo il concetto di bianco: esso è generalmente costituito da un volume di acqua ultrapura uguale al volume prelevato da ogni campione per l'analisi. Il bianco segue tutta la procedura prevista dal metodo analitico (pretrattamento, aggiunta di reattivi, attese per la formazione del colorante, ecc.). Assumendo che l'analita non sia presente nell'acqua ultrapura, ne deriva che il valore di assorbanza del bianco rappresenta la somma di tutti i possibili inquinamenti o disturbi introdotti durante la manipolazione e delle eventuali tracce dell'analita contenuto nei prodotti chimici costituenti i reattivi. Per questa ragione il valore di assorbanza del bianco deve essere sottratto dal valore in assorbanza di ogni campione. Normalmente per ogni serie di campioni analizzata vengono determinati tre bianchi ed il loro valore medio oppure il bianco ritenuto più rappresentativo viene sottratto a tutti i campioni con la procedura di azzeramento dello spettrofotometro.

Tutte le operazioni qui descritte fanno riferimento a letture spettrofotometriche eseguite con spettrofotometri a doppio raggio (riferimento e misura). Con questi strumenti si consiglia di lasciare il raggio di riferimento in aria, senza cuvetta. Questa procedura permette di ottenere una migliore stabilità strumentale della linea di base; tale accorgimento è valido per letture di bianchi (cuvetta + acqua) con valori in assorbanza inferiori a 0,5 u.A.

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

1. **azzeramento con aria** in assenza delle cuvette: permette di controllare la stabilità dello spettrofotometro verificandone l'eventuale deriva fino alla miglior stabilizzazione raggiungibile prima dell'inizio delle letture sui campioni;
2. **azzeramento con acqua deionizzata** nella cuvetta posta sul raggio di misura: permette di controllare la qualità ottica delle cuvette (appaioamento, superfici difettose o altro); normalmente l'assorbimento di una singola cuvetta rispetto all'azzeramento con aria oscilla tra 0,000 e 0,150 u.A a seconda del passo ottico (da 10 a 100 mm) e della lunghezza d'onda;
3. **lettura dei tre bianchi** in assorbanza: permette di verificare la qualità della procedura analitica (reattivi e manipolazioni varie), i valori possono variare a seconda delle determinazioni e dei passi ottici delle cuvette, normalmente oscillano tra 0,001 e 0,050 u.A;
4. **azzeramento con il bianco più rappresentativo** o vicino al valore medio; permette di sottrarre dai campioni le varie fonti di inquinamento derivanti dai reattivi o dalle manipolazioni inerenti alla determinazione.

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

MODALITÀ DI CALIBRAZIONE

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

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

Tutte le determinazioni spettrofotometriche descritte hanno andamento lineare nell'intervallo di concentrazioni utilizzato. La condizione ottimale per eseguire con buona precisione la regressione lineare è l'utilizzo di almeno sei soluzioni *standard* distribuite con maggior dettaglio sulle basse concentrazioni (Fig. 8). Lo *standard* a concentrazione più elevata non deve superare i valori di 1,2 - 1,5 unità di assorbanza corrispondenti al 6 - 3 % di trasmittanza; oltre questi valori si superano le condizioni di linearità di molti spettrofotometri e della Legge di Lambert e Beer (Denney & Sinclair 1987).

Come esempio di regressione si riporta la retta di calibrazione del fosforo totale eseguita con cuvetta a passo ottico di 5 cm alla lunghezza d'onda di 890 nm utilizzando gli *standard* descritti nel metodo. Dai valori in assorbanza ottenuti dall'analisi di ogni *standard* riportato in tabella e figura 2, si ottiene la seguente retta di regressione (concentrazione = $a + b$ u.A):

$$\begin{array}{ll} \text{regressione } 4\text{-}400 \mu\text{g P L}^{-1} \text{ cuvetta } 5 \text{ cm} & \mu\text{g P L}^{-1} = 0,415 + 317,46 \text{ u.A} \\ \text{coefficiente di correlazione lineare:} & r = 0,999984 \end{array}$$

La qualità della retta viene evidenziata dal coefficiente di correlazione lineare (r) che deve essere superiore a 0,9990, ed il cui valore corrisponde all'unità quando si ha una perfetta correlazione. Un'ulteriore verifica della qualità della regressione può essere eseguita con l'analisi

dei residui ricalcolati dalla retta partendo dalle assorbanze misurate; come si può vedere in tabella 2 le variazioni sono molto contenute e nel caso considerato le differenze (residui) fra la concentrazione calcolata e la concentrazione dello *standard* oscillano tra $-0,9$ e $+1,7 \mu\text{g P L}^{-1}$.

Un controllo ancora più accurato sulla regressione può essere eseguito calcolando per ogni *standard* il fattore di risposta (R.F.) per unità di concentrazione (Green 1996).

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

Valori di R.F. costanti indicano un'ottima correlazione lineare (Tab. 2 e Fig. 8), vengono comunque ritenuti soddisfacenti andamenti dell'R.F. contenuti entro intervallo di $\pm 5\%$ del valore medio. Evidenti variazioni sul valore di R.F. indicano una bassa correlazione lineare tra *standard* e segnale; tali condizioni possono essere indice di errori nella preparazione delle soluzioni calibranti o di andamenti non lineari che richiedono altri tipi di regressione, ad esempio quella quadratica.

Tab. 2 Valori di assorbanza misurati alla lunghezza d'onda di 890 nm, relativi alla concentrazione degli *standard* utilizzati per la calibrazione del fosforo totale, concentrazioni calcolate dalla retta di calibrazione (a , intercetta, b , pendenza) e fattore di risposta (RF) per unità di concentrazione.

Assorbanza cuvetta 5 cm u.A	Concentrazione <i>standard</i> $\mu\text{g P L}^{-1}$	Concentrazione calcolata $\mu\text{g P L}^{-1} = a + b \text{ u.A}$	Residui $\mu\text{g P L}^{-1}$	Fattore di risposta per unità di concentrazione R.F. = u.A / $\mu\text{g P L}^{-1}$ <i>standard</i>
0,0125	4	3,6	-0,4	0,00313
0,0264	8	8,0	0,0	0,00330
0,0389	12	11,9	-0,1	0,00324
0,0502	16	15,5	-0,5	0,00314
0,0956	30	29,9	-0,1	0,00319
0,1899	60	59,9	-0,1	0,00317
0,3177	100	100,4	+0,4	0,00318
0,6367	200	201,7	+1,7	0,00318
1,2584	400	399,1	-0,9	0,00315

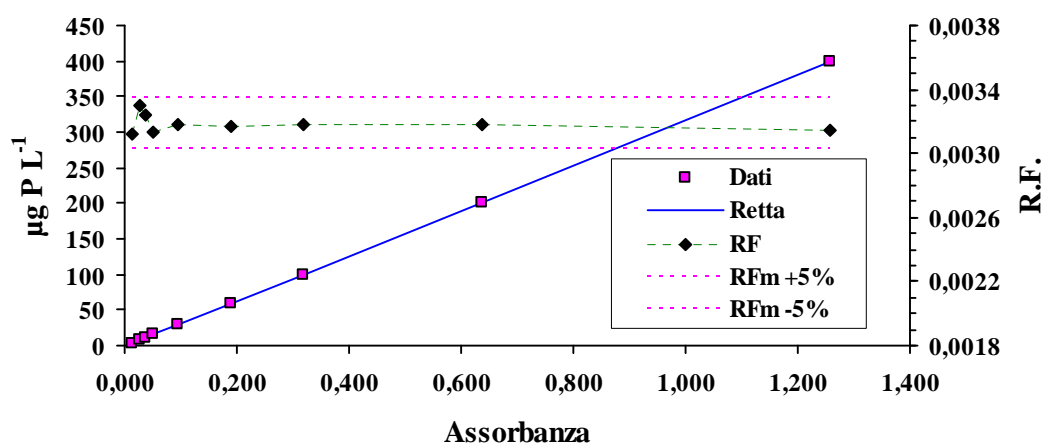


Fig. 8. Esempio di regressione lineare per la determinazione del fosforo totale con il metodo spettrofotometrico (cuvetta da 5 cm) e visualizzazione del fattore di risposta (R.F. ◆) per unità di concentrazione e suo intervallo $\pm 5\%$ del valore medio.

Per le metodiche spettrofotometriche qui considerate le calibrazioni vanno controllate ogni 12 - 18 mesi al fine di verificare la stabilità del processo analitico e la prestazione dello spettrofotometro in tutto l'intervallo analitico. Per la verifica della confrontabilità delle calibrazioni nel tempo, si consiglia di organizzare i risultati delle tarature eseguite in un archivio per ogni metodo spettrofotometrico. Un esempio del confronto delle assorbanze ottenute per i diversi *standard* è riportato in tabella 3 con i valori di assorbanza ottenuti dal 1985 al 2000 con diversi modelli di spettrofotometri, nelle calibrazioni del fosforo totale eseguite al CNR-ISE di Verbania con cuvetta passo ottico da 4 cm. In tabella 4 vengono poi riportati i valori medi di assorbanza ottenuti con lo stesso metodo ma con cuvetta passo ottico 5 cm nelle otto calibrazioni eseguite dal 2000 al 2012 con un solo spettrofotometro (SAFAS UV mc²).

I bassi valori di deviazione *standard* relativa (R.S.D.) evidenziano l'elevata confrontabilità di risposta tra diversi spettrofotometri (Tab. 3) e la stabilità con un solo spettrofotometro (Tab. 4); le variazioni molto contenute (entro il 7 % con un solo spettrofotometro) sono giustificate dagli errori associati alla preparazione degli *standard*, al processo analitico, ed alle piccole differenze tra prestazioni degli spettrofotometri utilizzati. Va segnalato l'aumento del valore di assorbanza che si è avuto dall'anno 1992 per gli *standard* a concentrazione più elevata (Tab. 3 concentrazione 400 µg P L⁻¹), che può essere attribuito al miglioramento avvenuto nello spettrofotometro con un intervallo di lavoro più ampio dei precedenti (190-1100 nm rispetto a 190-900 nm); tale miglioramento ha permesso di eseguire misure più accurate alla lunghezza d'onda di lettura del fosforo (890 nm), lunghezza d'onda prossima al limite delle possibilità strumentali dei precedenti spettrofotometri (Tab. 1).

Dall'anno 2000, con l'introduzione dello spettrofotometro SAFAS UV mc², i metodi che utilizzavano cuvette da 4 cm sono stati ottimizzati per le cuvette a passo ottico da 5 cm. Dal 2007, considerata l'elevata stabilità e confrontabilità delle calibrazioni spettrofotometriche (tabelle 3 e 4), si è deciso di utilizzare per ciascun metodo spettrofotometrico la calibrazione calcolata dalla regressione tra *standard* e valore medio in assorbanza ottenuto nel periodo di utilizzo dello spettrofotometro SAFAS UV mc² (esempi di tabella 4 e figure 9 e 10).

Tab. 3 Valori di assorbanza (u.A) relativi agli *standard* utilizzati per la calibrazione del fosforo totale con cuvetta da 4 cm di passo ottico, ottenuti dal 1985 al 2000 con vari spettrofotometri. Statistica con media, deviazione *standard* (D.S.) e deviazione *standard* relativa in percentuale (R.S.D.).

Spettrofotometro		Concentrazione degli <i>standard</i> di calibrazione $\mu\text{g P L}^{-1}$								
modello	Anno	4	8	12	16	30	60	100	200	400
Beckman 25	1985	0,0120	0,0240		0,0410	0,0770	0,1520	0,2410	0,4840	0,9500
Beckman 25	1986	0,0125	0,0240		0,0420		0,1500	0,2400	0,4810	0,9555
Perkin Elmer L 1A	1987	0,0100	0,0170		0,0370	0,0690	0,1460	0,2430	0,4850	0,9550
Perkin Elmer L 1A	1989	0,0105	0,0200		0,0390	0,0725	0,1460		0,4880	0,9575
Perkin Elmer L 1A	1990	0,0075	0,0190		0,0385	0,0730	0,1460	0,2430	0,4890	0,9645
Perkin Elmer L 1A	1991	0,0095	0,0170		0,0350	0,0670	0,1390	0,2350	0,4755	0,9500
Perkin Elmer L 2	1992	0,0100	0,0203	0,0308	0,0406	0,0755	0,1502	0,2505	0,4983	1,0019
Perkin Elmer L 2	1993	0,0104	0,0203	0,0305	0,0408	0,0759	0,1514	0,2534	0,5039	1,0061
Perkin Elmer L 2	1995	0,0099	0,0306	0,0306	0,0403	0,0754	0,1490	0,2515	0,5018	1,0133
Perkin Elmer L 2	1997	0,0103	0,0202	0,0305	0,0405	0,0761	0,1517	0,2530	0,5026	0,9992
Perkin Elmer L 2	1998	0,0101	0,0200	0,0306	0,0405	0,0756	0,1513	0,2512	0,5033	1,0058
Perkin Elmer L 2	2000	0,0104	0,0199	0,0291		0,0750	0,1504	0,2500		0,9962
	n° dati	12	12	6	11	11	12	11	11	12
	Media	0,0103	0,0210	0,0303	0,0396	0,0738	0,1486	0,2465	0,4920	0,9796
	D.S.	0,0012	0,0037	0,0006	0,0020	0,0032	0,0038	0,0063	0,0102	0,0258
	R.S.D.	12,0	17,6	2,1	5,2	4,3	2,5	2,5	2,1	2,6

Tab. 4 Valori di assorbanza media (u.A) e deviazione standard relativa (R.S.D.) ottenuti dalla lettura degli *standard* utilizzati per la calibrazione del fosforo totale con cuvetta da 5 cm di passo ottico, nelle otto calibrazioni eseguite dal 2000 al 2012 con un solo spettrofotometro (SAFAS UV mc^2).

$\mu\text{g P L}^{-1}$	4	8	12	16	30	60	100	200	400
u A media	0,0133	0,0260	0,0388	0,0511	0,0956	0,1907	0,3160	0,6342	1,2521
R.S.D.	6,4	4,6	4,9	3,5	2,1	1,2	1,5	1,1	0,7
n° dati	27	30	27	28	31	30	31	28	30

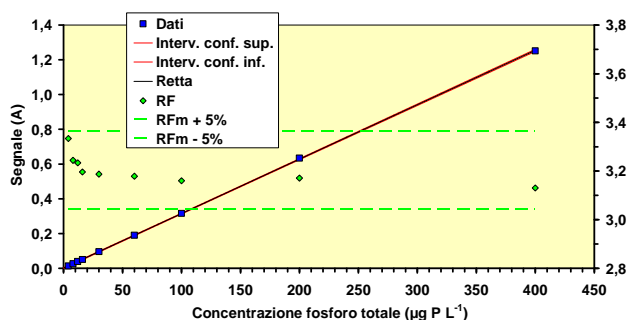


Fig. 9. Regressione lineare del fosforo totale (cuvetta da 5 cm) con intervalli di confidenza della regressione (al 95 %) e visualizzazione del fattore di risposta (R.F. ◆) per unità di concentrazione con l'intervallo $\pm 5\%$ del valore medio; il segnale (A) è ottenuto dalla media dei valori nel periodo 2000÷2012 con lo spettrofotometro SAFAS UV mc^2 .

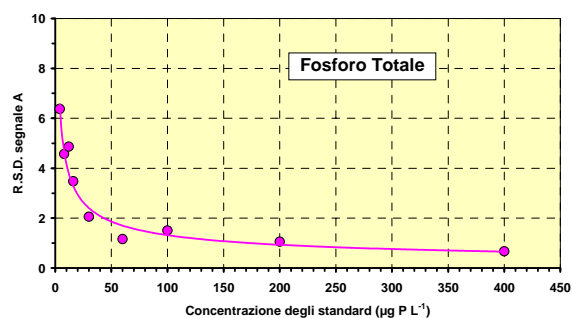


Fig. 10. Variabilità (R.S.D.) dei valori di assorbanza ottenuti per ciascuno *standard* nel periodo 2000÷2012 con lo spettrofotometro SAFAS UV mc^2 nella calibrazione del fosforo totale con cuvetta da 5 cm.

I vantaggi di utilizzare i valori medi di assorbanza ottenuti in un lungo periodo (alcuni anni) per ciascun *standard*, sono che le calibrazioni non risentono delle piccole fluttuazioni introdotte dal passaggio da una calibrazione all'altra e che la calibrazione media è più robusta ed impone un accurato confronto con tutte quelle precedenti. I parametri delle calibrazioni lineari ottenute dai valori medi del periodo 2000÷2012 per ciascun metodo spettrofotometrico qui descritto, sono riportati in tabella 5 ed approfonditamente descritti all'interno di ogni metodo analitico.

Tab. 5 Parametri delle regressioni lineari (Concentrazione = $a + b$ u.A) eseguite per ogni variabile analizzata con i metodi in assorbimento molecolare. Calibrazioni eseguite con i valori medi dei segnali in assorbanza del periodo 2000÷2012; (p.o. = passo ottico cuvetta; N° cal. = numero di calibrazioni eseguite nel periodo; R.F. = fattore di risposta).

Variabile e unità di misura	Intervallo analitico	p.o. cm	N° cal.	Pendenza b	Intercetta a	Coefficiente correlazione (r)	R.F.
PO ₄ µg P L ⁻¹	4 - 400	5	10	286,385	0,596	0,999995	0,00338
PO ₄ µg P L ⁻¹	4 - 60	5	10	287,882	0,552	0,999929	0,00333
PT µg P L ⁻¹	4 - 400	5	10	319,173	-0,617	0,999983	0,00320
PT µg P L ⁻¹	4 - 60	5	10	315,691	-0,198	0,999999	0,00323
NT mg N L ⁻¹	0,40 - 6,00	1	10	4,328	-0,027	0,999968	0,2348
NT mg N L ⁻¹	0,40 - 2,00	1	10	4,275	-0,009	0,999970	0,2364
NH ₄ µg N L ⁻¹	5 - 200	5	10	196,677	0,876	0,999872	0,00495
NH ₄ µg N L ⁻¹	100 - 1500	1	10	968,591	-4,665	0,999642	0,00103
NO ₂ µg N L ⁻¹	1 - 100	5	11	57,265	0,067	0,999995	0,0172
Si mg Si L ⁻¹	0,05 - 1,00	2	9	0,9329	0,0001	0,999967	1,073
Si mg Si L ⁻¹	0,40 - 5,00	0,5	9	3,7637	0,0066	0,999996	0,265

Dal confronto della serie storica più lunga (1983÷2008) sulle pendenze delle calibrazioni, riferita ai metodi che utilizzano a cuvette con passo ottico da 1 cm (azoto ammoniacale ed azoto totale), è possibile trarre alcune considerazioni sulle prestazioni degli spettrofotometri utilizzati in quel periodo (Fig. 11. Per la lunghezza d'onda nel visibile (ammonio 695 nm) la variabilità è molto bassa (R.S.D. 3 %) e non si evidenziano particolari differenze nelle risposte tra i quattro spettrofotometri utilizzati, mentre per le lunghezza d'onda nell'ultravioletto (azoto totale 220 nm) malgrado la variabilità sia poco elevata (R.S.D. 5 %), le pendenze delle calibrazioni si raggruppano in funzione dello spettrofotometro, ad indicare che vi possono essere prestazioni leggermente discordanti al variare delle caratteristiche degli strumenti considerati.

Da questa sommaria valutazione si consiglia la verifica delle calibrazioni ogni volta che si cambia lo spettrofotometro o vengono eseguite importanti manutenzioni (quali la pulizia degli specchi di riflessione) o la sostituzione del rivelatore (fotomoltiplicatore o fotodiodi); in ogni caso prima di utilizzare calibrazioni medie di più anni, anche se riferite ad un solo spettrofotometro, è importante verificare la confrontabilità delle risposte nel periodo considerato.

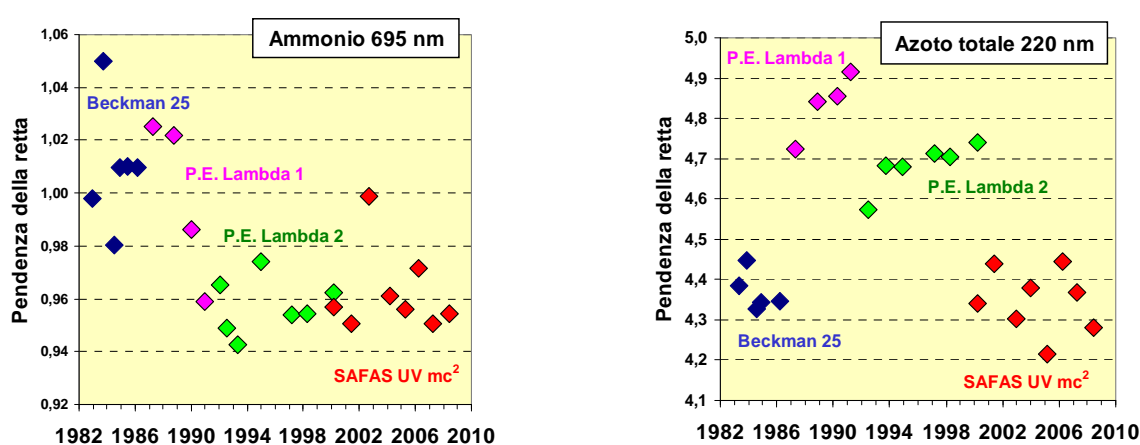


Fig. 11 Pendenze delle regressioni ottenute dalle calibrazioni con cuvetta da 1 cm per l'azoto ammoniacale a 695 nm e l'azoto totale a 220 nm, nel periodo 1983÷2008 con diversi spettrofotometri.

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

- calibrazione lineare (6 - 8 punti) eseguita utilizzando sempre *standard* preparati alle stesse concentrazioni e con le stesse modalità (quantità di sale pesata e diluizioni);
- frequenza di ricalibrazione ogni 12 - 18 mesi;
- ciascuna calibrazione deve essere confrontata con le precedenti per la verifica della stabilità della procedura analitica e della risposta dello spettrofotometro nell'intervallo analitico della metodica;
- verificata la confrontabilità delle calibrazioni ottenute negli anni (almeno 3-4 anni), si consiglia di utilizzare i valori medi di assorbanza ottenuti per ciascun *standard* nel periodo considerato per costruire la regressione lineare da utilizzare nelle determinazioni analitiche giornaliere. Continuare poi negli anni successivi a verificare la confrontabilità delle calibrazioni e aggiornare la regressione lineare con i valori medi del periodo.

Riferimenti bibliografici

- Cozzi R., Protti P. e Ruaro T. 2005. Analisi chimica strumentale. Seconda edizione. Tre volumi A 352 pp, B 424 pp, C 504 pp.
- Denney R. C. and Roy Sinclair. 1987. Visible and Ultraviolet Spectroscopy. Analytical Chemistry by Open Learning by John Wiley & sons. Chichester. 197 pp.
- Douglas A. Skoog e James J. Leary. 1995. Chimica analitica strumentale. EdiSES s.r.l., Napoli. 1135 pp.
- Green, J.M. 1996. A practical guide to analytical method validation. Anal. Chem., 68: 305A-309A.
- UNICHIM Manuale N. 177/6. 1995. Linee guida per la taratura della strumentazione analitica. Spettrofotometri nell'ultravioletto, visibile e vicino infrarosso. 35 pp.
- Tartari, G.A. & R. Mosello. 1997. Metodologie analitiche e controlli di qualità nel laboratorio chimico dell'Istituto Italiano di Idrobiologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Documenta Ist. ital. Idrobiol., 60: 160 pp.