



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



**Calcio, magnesio, sodio, potassio, zolfo, silice e fosforo
 metodo in spettrometria ad emissione al plasma (ICP-OES)**

PRINCIPIO DEL METODO

La determinazione viene eseguita in spettrometria ad emissione atomica accoppiata induttivamente al plasma d'argon con rivelatore ottico (ICP-OES). Un'aliquota di campione viene inviata, tramite una pompa peristaltica, al nebulizzatore, da dove l'aerosol formatosi va alla torcia ICP. Qui il campione viene immerso nel plasma dove, ad una temperatura compresa tra 7000 e 10000°K, ogni elemento raggiunge un livello energetico superiore al suo stato fondamentale. Gli elettroni dell'atomo eccitati tornano allo stato fondamentale per via diretta oppure attraverso livelli energetici intermedi; in questi passaggi avviene l'emissione di energia luminosa che genera uno spettro di emissione a diverse lunghezze d'onda (righe o linee). Ciascuna riga dello spettro è originata da una particolare transizione elettronica tra due differenti livelli energetici, e poiché ciascuna specie atomica è caratterizzata da una serie di possibili stati o livelli energetici, gli atomi producono un proprio spettro di emissione caratteristico. L'intensità di una riga spettrale dipende sia dalla probabilità della transizione che dal numero di atomi che sono in grado di effettuarla. Poiché il numero di atomi eccitati è rapportabile al numero complessivo di atomi presenti, è possibile stabilire una relazione lineare tra l'intensità della radiazione elettromagnetica emessa e la quantità degli atomi presenti dell'analita. Il rivelatore ottico, posto dopo la torcia, permette l'identificazione degli elementi sulla base delle lunghezze d'onda emesse e la quantificazione attraverso la misura dell'intensità del segnale; la determinazione quantitativa degli analiti avviene per confronto delle intensità dei segnali ottenuti sul campione, rispetto a soluzioni di calibrazione multi elemento a concentrazione nota.

CAMPO DI APPLICAZIONE

La metodica qui descritta viene utilizzata nell'analisi di campioni di acque superficiali (laghi subalpini italiani, acque di fiume), acque a basso contenuto salino (laghi alpini) ed acque di pioggia prelevate a cielo aperto e dopo il dilavamento fogliare (sotto chioma e lungo il tronco degli alberi).

INTERVALLO DI UTILIZZO, LUNGHEZZE D'ONDA E RIPETIBILITA'

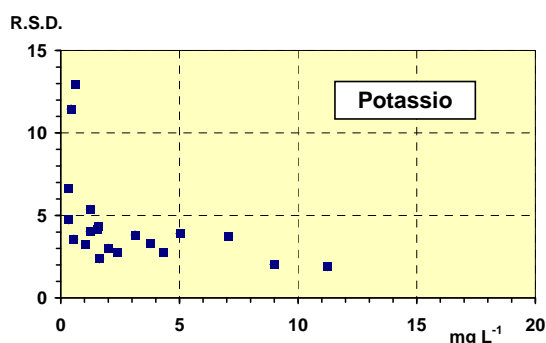
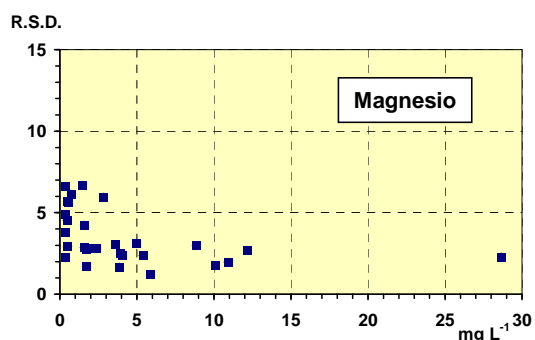
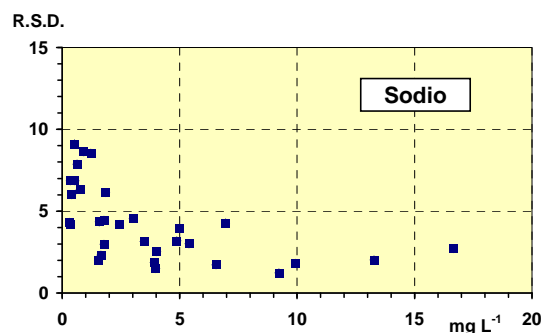
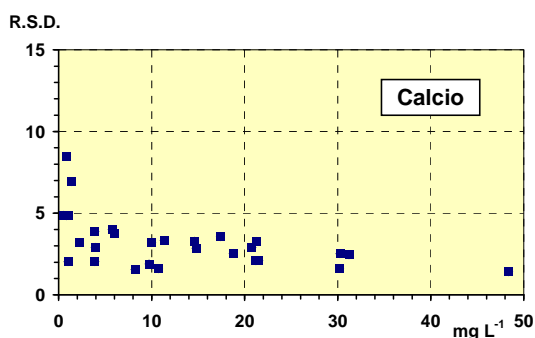
Nella tabella seguente per ciascun analita viene riportato l'intervallo di misura e le lunghezze d'onda considerate nell'analisi dei metalli alcalino terrosi in ICP-OES.

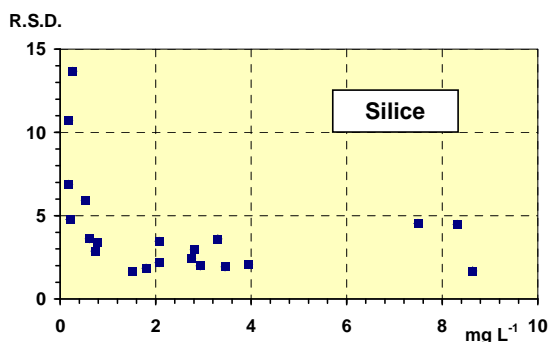
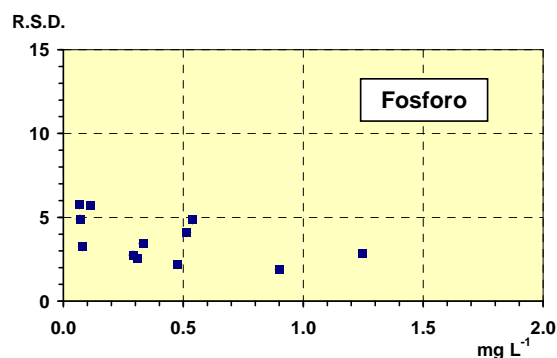
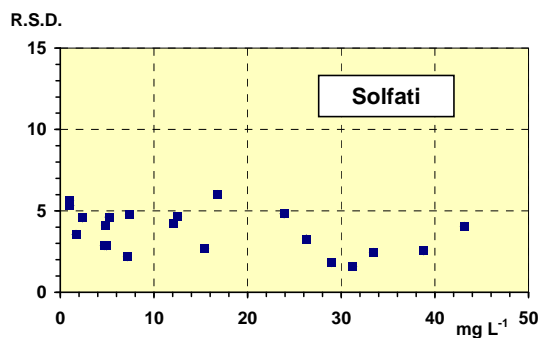
Alla lunghezza d'onda con maggior sensibilità analitica vengono riportati i valori di LOD, LOQ (mg L^{-1}) ed il fattore di risposta RF (*slope* o *sensitivity*), espresso come intensità del segnale per unità di concentrazione (mg).

Analita	Intervallo di misura mg L^{-1}	Lunghezze d'onda utilizzate λ nm	Sensibilità massima			
			λ nm	LOD mg L^{-1}	LOQ mg L^{-1}	RF
Calcio	0,4 - 40	315,887 – 317,933 - 396,847	396,847	0,005	0,017	2339244
Magnesio	0,16 - 16	279,078 - 279,553 – 285,213	279,553	0,001	0,004	420082
Potassio	0,16 - 4	766,491 - 769,897	766,491	0,016	0,052	127262
Sodio	0,16 - 16	330,237 - 588,995 - 589,592	589,592	0,005	0,015	285782
Fosforo	0,03 - 2	177,434 - 213,618	213,618	0,005	0,018	999
Solfato	0,5 - 60	181,972 - 182,562	181,972	0,05	0,17	73
Silice	0,08 - 12	251,611 - 288,158	288,158	0,02	0,06	5752

I valori di LOD ed LOQ sono stati ottenuti dalla variabilità dei valori di intensità dei bianchi e calcolati come 3 S.D. per LOD e 10 S.D. per LOQ.

La ripetibilità analitica ottenuta nel laboratorio del CNR-ISE di Verbania, espressa come deviazione standard relativa (R.S.D.) è stata valutata su campioni sintetici a diverse concentrazioni, analizzati per un periodo di 3-4 mesi in giorni diversi nelle condizioni qui descritte per un totale di circa 30÷50 determinazioni.





Ripetibilità analitica per gli elementi Ca, Mg, Na, K, SO₄, P e Si espressa come R.S.D. ottenuta dalle analisi delle carte di controllo; ogni valore rappresentato è ottenuto da una serie di circa 30÷50 determinazioni eseguite in giorni diversi sullo stesso campione.

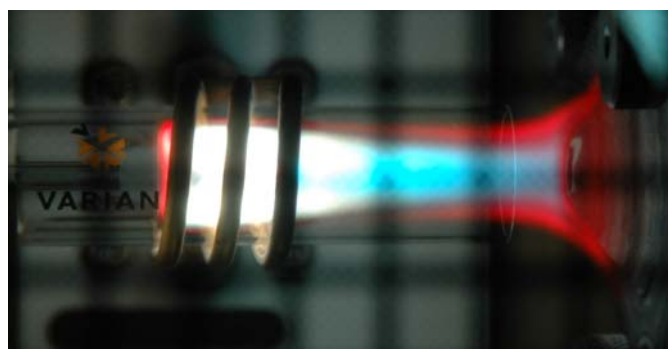
DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIATURA

Sistema spettrometrico ad emissione ICP-OES Varian modello Vista-MPX simultaneo con torcia assiale, autocampionatore Sample Preparation System SPS5 con possibilità di diluizione in linea. Lo strumento è inoltre collegato ad un sistema di termoregolazione ad acqua per il raffreddamento di alcune parti a 25 °C.

Software ICP-Expert per l'acquisizione e l'utilizzo dei dati in ambiente Microsoft Windows XP professional.



ICP-OES Varian Vista-MPX con torcia assiale ed autocampionatore SPS5



Plasma assiale la cui temperatura in ° K varia da circa 10000 nella parte bianca a circa 6000 all'esterno

Lo spettrometro ICP-OES Varian Vista-MPX è sinteticamente costituito dalle seguenti parti:

- autocampionatore SPS5 per il prelievo e/o diluizione dei campioni e degli *standard*;
- pompa peristaltica a 10 rulli con velocità regolabile tra 5 e 50 giri min⁻¹ (rpm) per l'aspirazione del campione e l'aggiunta di eventuali modificatori di matrice prima dell'invio al nebulizzatore;
- controllo del gas al nebulizzare tramite *mass flow* regolabile tra 0,5÷1,3 L min⁻¹
- nebulizzatore del campione di tipo concentrico *Conikal (Glass Expansion)*;
- camera di espansione ciclonica (*spray chamber*);
- torcia assiale per plasma di atomizzazione ad eccitazione a 40 MHz di radio frequenza con potenza variabile da 0,7 a 1,5 kW e stabilità migliore dello 0,1%;
- sistema dispersivo della luce composto da prisma di separazione, reticolo e policromatore Echelle termostatati a 35 °C e flussati con argon a 0,7 – 3Lmin⁻¹;
- rivelatore simultaneo a CCD con 1,12 milioni *pixels* raffreddato per effetto *Peltier* a -35 °C, gamma spettrale da 175 a 785 nm, risoluzione compresa tra 0,009 e 0,070 nm, calibrazione automatica su linee di emissione dell'argon, possibilità d'utilizzo di almeno 32000 lunghezze d'onda;
- software di controllo, acquisizione ed elaborazione dei dati *ICP-Expert*.

Per una descrizione più approfondita delle singole parti, vedere il paragrafo di introduzione alla spettrometria ad emissione ICP e consultare i manuali dei singoli componenti strumentali ed i manuali d'uso Varian.

PREPARAZIONE E VERIFICHE DELLO STRUMENTO

Prima di iniziare un ciclo analitico, lo strumento deve essere alimentato (acceso in assenza di plasma) per almeno 24 ore al fine di termostatare la parte ottica.

Lo strumento richiede inoltre una regolare manutenzione ed una attenta messa a punto prima dell'inizio dell'attività analitica. Ogni anno si consiglia una manutenzione totale dello strumento eseguita da un tecnico specializzato con il controllo del generatore di radio frequenza.

Si riportano sommariamente qui di seguito le principali manutenzioni periodiche che devono essere eseguite dall'utilizzatore:

- pulizia mensile della torcia per eliminare i residui lasciati dal precedente utilizzo che potrebbero interferire con le analisi successive, immergendo la torcia per 10-15 minuti in acqua regia (3 parti di HCl 35% + 1 parte HNO₃ 65%); risciacquare poi con acqua deionizzata ed asciugare in stufa;
- allineamento della torcia ad ogni sua sostituzione o spostamento sul suo supporto, procedendo alla lettura dello *standard* di Mn 5 mg l⁻¹;
- calibrazione mensile delle lunghezze d'onda utilizzando la soluzione multi elemento contenente K, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Zn;
- ogni 2-3 settimane (in funzione dell'utilizzo) sostituzione dei tubi in *tygon* della pompa peristaltica e del tubo di connessione tra *spray chamber* e torcia;
- lavaggio del nebulizzatore ogni mese con soluzione di HNO₃ 10%, nei casi più difficili si può utilizzare una soluzione di HF 40% 200µl in 10 mL di acqua ultrapura per non più di 10 minuti per evitare alterazioni del nebulizzatore stesso a causa dell'acido fluoridrico;
- lavaggio della *spray chamber* ogni mese con soluzione di HNO₃ 10%;
- pulizia ogni due o tre mesi (quando iniziano a vedersi dei depositi sul cono stesso) del cono ottico con acqua e vim oppure con ossido di alluminio.

Queste operazioni vanno eseguite nel rispetto delle norme di smontaggio e montaggio della ditta costruttrice. I lavaggi con acidi si eseguono sotto cappa con l'obbligo dell'uso di occhiali di protezione.

Eseguiti questi controlli prima di iniziare una sequenza analitica è necessario accedere al software *ICP-Expert* ed accendere il plasma per almeno 15 minuti, tempo necessario al condizionamento del rivelatore CCD a -35°C (effetto Peltier). Nel caso si eseguano letture a lunghezze d'onda inferiori ai 200 nm si deve flussare l'ottica con argon accendendo il *Poly Purge (Boost)* almeno 30 minuti prima dell'inizio della calibrazione.

CONDIZIONI OPERATIVE

Tutte le condizioni analitiche utilizzate ed impostate sullo strumento sono contenute in un unico *file (WorkSheet)* con le condizioni operative (impostazioni strumentali, lunghezze d'onda, modalità di calibrazione, controlli di qualità, ecc.) utilizzate nella determinazione; nello stesso *WorkSheet* verranno poi memorizzati tutti i risultati analitici. Le condizioni operative per l'analisi dei metalli alcalino terrosi sono qui di seguito riassunte:

Generatore di radiofrequenza:	potenza impostata a 1,3 kW
Flusso di argon al plasma:	16,5 L min ⁻¹
Flusso ausiliario di argon:	1,5 L min ⁻¹
Flusso di argon al nebulizzatore:	0,70 L min ⁻¹
Tempo di lettura per ogni replica:	30 secondi
Numero di repliche per campione:	3
Tempo di stabilizzazione tra ogni campione:	30 secondi
Ritardo per avvinare tra i campioni:	60 secondi con pompa a 50 rpm
Tempo di lavaggio in acqua ultrapura del campionatore:	40 secondi con pompa a 50 rpm

Pompaggio del campione: per mezzo della pompa peristaltica a tre vie, viene inviato il campione al nebulizzatore, contemporaneamente dalla *spray chamber* viene asportato l'eccesso di campione non nebulizzato. Variando le dimensioni dei tubi utilizzati si possono ottimizzare le condizioni analitiche; la velocità di rotazione della pompa peristaltica viene normalmente mantenuta a 15 rotazioni al minuto (rpm).

I tubi utilizzati sono in materiale inerte (*tygon*) ed hanno le seguenti caratteristiche.

Tubo pompa peristaltica	Colore identificativo	Sezione interna (mm)	Portata a 15 rpm (mL min⁻¹)
Campione	Bianco/Bianco	0,82	1,01
Scarico	Giallo/Giallo	1,42	1,82

Controllo della deriva strumentale: contemporaneamente alla lettura di ogni campione vengono eseguite le letture di intensità delle linee di emissione dell'argon a 420,067 - 703,025 e 737,212 nm, tale controllo come *standard* interno permette di evidenziare e correggere le eventuali derive strumentali.

Controllo della nebulizzazione: a torcia spenta con il tubo di prelievo immerso in acqua ultrapura, serrare i pressa tubi della pompa peristaltica di campionamento stringendo leggermente le viti di

chiusura. Entrare nel menù *Instrument Setup* e *Diagnostics* utilizzando la parola chiave *wallaby* ed entrare nella cartella *Gasbox*; attivare il pannello con *Auto Refresh*, impostare il valore di 15 in *Pump rate (rpm)* ed impostare il flusso al nebulizzatore in *MFC Flow (L/min)* il valore $0,70 \text{ L min}^{-1}$ ed inviare allo strumento le impostazioni con *Apply Changes*; estrarre poi il nebulizzatore dalla *spray chamber* e controllare la qualità del nebulizzato regolando progressivamente le viti di chiusura sulla pompa e verificando contemporaneamente la qualità della nebulizzazione e l'assenza di pulsazioni come riportato in figura. Terminata la regolazione azzerare il flusso al nebulizzatore in *MFC Flow (L/min)*, azzerare *Pump rate* ed *Apply Changes*. Questa regolazione va eseguita con molta attenzione e nel corso dell'analisi non deve essere più ritoccata; si consiglia di controllare questa regolazione ogni volta che vengono rilasciati i pressa tubi ed all'inizio di ogni sequenza analitica.



Esempio del controllo della nebulizzazione

Controllo dell'introduzione del campione: contemporaneamente alla lettura di ogni campione vengono anche eseguite le letture di intensità della linea di emissione dell'ittrio e del cesio rispettivamente a 371,029 e 672,328 nm come controllo finalizzato ad evidenziare eventuali anomalie nel prelievo automatico da parte dell'autocampionatore e nell'iniezione del campione o nella sua omogeneità.

Sequenza di accensione dello strumento

- controllare che la pressione della linea di argon si almeno a 6 bar
- collegare e serrare i tubi di prelievo nella pompa peristaltica ed immergere il tubo di prelievo campione in acqua ultrapura
- accendere il sistema esterno di termoregolazione
- accendere la cappa di aspirazione
- attivare la sequenza automatica di accensione dal *software ICP-Expert*.

Impostazione delle condizioni analitiche sullo strumento

- aprire il *WorkSheet* della sequenza da analizzare
- nella cartella *Method*, in *Edit Method, Conditions* eseguire un *Read Spectrum (Shift+F8)* per inviare le condizioni operative allo strumento e leggere un campione con queste impostazioni
- si consiglia inoltre di procedere con l'analisi di alcuni standard o campioni di controllo utilizzando lo stesso *WorkSheet* della sequenza da analizzare.

Sequenza di spegnimento dello strumento

- spegnere la torcia dal *software ICP-Expert*
- uscire dal *software ICP-Expert*

- attendere circa cinque minuti
- chiudere l'argon e spegnere il sistema esterno di termoregolazione oppure se si desidera restare nel *software ICP-Expert* per elaborare i dati
- spegnere la torcia dal *software ICP-Expert*
- da *Analyze* spegnere il raffreddamento *Peltier* (-35°C) del rivelatore
- attendere circa cinque minuti per il raggiungimento della temperatura ambiente
- chiudere l'argon e spegnere il sistema esterno di termoregolazione.

SCelta DELLE LUNGHEZZE D'ONDA E DELLE CONDIZIONI DI INTEGRAZIONE DEL SEGNALE

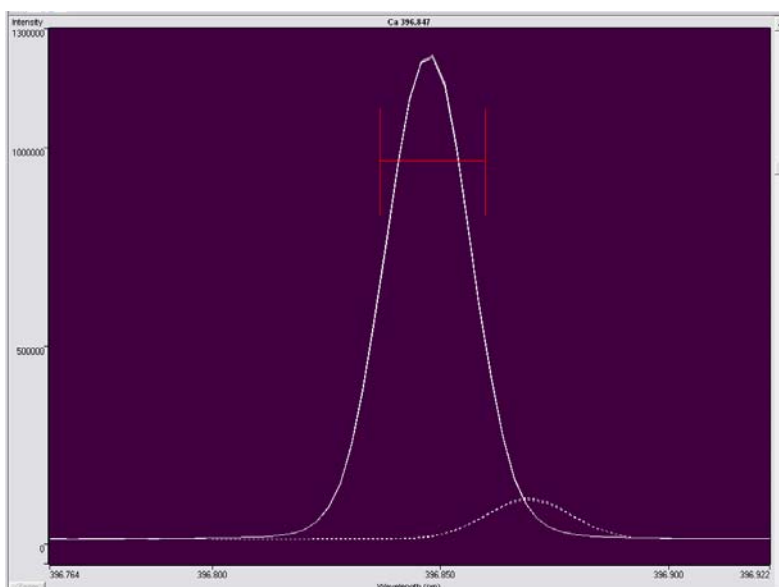
Per ogni elemento analizzato si consiglia di utilizzare almeno due lunghezze d'onda analitiche per la lettura degli *standard* a diversi intervalli di concentrazione (od anche uguali). La scelta delle lunghezze d'onda dipende dalla sensibilità analitica richiesta, dai *range* di concentrazioni considerati e dalle possibili interferenze per sovrapposizione con altre linee di emissione. Si consiglia comunque di eseguire le letture ad almeno due lunghezze d'onda con *range* di calibrazione almeno in parte sovrapposti.

Per la scelta delle linee di emissione dei singoli elementi si utilizza l'archivio contenuto nel *software ICP-Expert*; per ogni elemento esso propone la scelta tra le più comuni linee utilizzabili riportando la loro sensibilità ed evidenziando le possibili interferenze con altri elementi. In alternativa si possono consultare testi quali *Optical Emission Lines of the Elements* che raccolgono queste informazioni e dispongono di un archivio elettronico per una rapida consultazione.

Per il controllo delle derive strumentali si consiglia di inserire anche la lettura come *standard* interno delle linee di emissione dell'argon (420,067 - 703,025 e 737,212 nm); queste misure permettono di evidenziare eventuali derive della parte ottica, ed eventualmente correggerle automaticamente.

Dopo avere scelto le lunghezze d'onda di lettura ed eseguito alcune determinazioni sugli *standard*, le condizioni di integrazione dell'intensità di emissione del segnale vengono ottimizzate con il programma *Varian ICP-Expert*. Per ogni linea di emissione selezionata si ottiene uno spettro come quello riportato in figura; sulle ordinate come unità di misura compare l'intensità, espressa come numero di conteggi, ed in ascissa la lunghezza d'onda espressa in nanometri (nm).

La linea tratteggiata rappresenta la linea di base (rumore di fondo), mentre con la linea continua vengono riportate le tre repliche dell'emissione dell'elemento considerato. L'intensità massima viene misurata all'interno dell'intervallo riportato dal segmento rosso, l'ampiezza della finestra entro la quale vengono acquisite le letture del picco può essere modificata dall'utilizzatore in modo che l'apice del picco vi risulti cadere all'interno; nella finestra vengono automaticamente selezionati i punti più elevati per l'integrazione del segnale. Normalmente si utilizzano due o tre punti, aumentando il numero di punti migliora la ripetibilità ma può diminuire la sensibilità.



Esempio di spettro di emissione ICP ottenuto nell'analisi del calcio alla lunghezza d'onda di 396,847 nm

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni destinati all'analisi di Ca, Mg, Na, K, S, Si e P in ICP-OES vengono filtrati su 0,45 μm e prima dell'analisi viene aggiunto l'1% di una soluzione contenente cloruro di cesio, ittrio e Triton X-100 in acido nitrico; dopo l'aggiunta agitare bene capovolgendo il recipiente almeno due volte (verificare in fase di lettura la costanza del segnale di Y e Cs). Il cesio viene utilizzato come tampone di ionizzazione per limitare gli effetti degli elementi facilmente ionizzabili (EIE) migliorando così l'intervallo analitico di linearità, l'ittrio è utilizzato come standard interno per controllare l'introduzione e l'omogeneità del campione, mentre il Triton X-100 facilita lo scorrimento dei campioni nei tubi di prelievo ed il trasporto in torcia.

La filtrazione dei campioni si esegue con filtri da 25 o 32 mm a membrana inerte monouso da 0,45 μm utilizzando siringhe da 50 mL e recipienti lavati con acqua ultrapura. Nella fase di filtrazione risciacquare con due aliquote di campione la siringa e l'apparato di filtrazione, prelevare poi una terza aliquota di campione e filtrare il volume di 50 mL nei recipienti dedicati. Prima del prelievo sul campione successivo sostituire il filtro e risciacquarlo come precedentemente descritto. Nel caso si filtrano campioni con concentrazioni molto simili (varie profondità dello stesso lago) è sufficiente risciacquare siringa ed apparato di filtrazione con il campione successivo senza sostituzioni del filtro per 4-5 campioni.

Le operazioni di filtrazione possono essere eseguite sul campo o in laboratorio, in ogni caso devono avvenire nelle 12-24 ore seguenti il campionamento.

Soluzione di CsCl, Y e Triton X-100: in un matraccio da 100mL aggiungere 14 g di CsCl, 15 mL di *standard* da 1 g Y L⁻¹, 20 mL di HNO₃ al 65% e 100 μL Triton X-100.

Al momento dell'analisi a 10 mL di campione filtrato si aggiungono 100 μL la soluzione di CsCl-Y-Triton direttamente nelle provette da 10 mL da utilizzare nell'autocampionatore.

L'aggiunta della soluzione di CsCl-Y-Triton (100 μL in 10 mL di campione) corrisponde ad una concentrazione finale di 1,1 g Cs L⁻¹, 1,5 mg Y L⁻¹, 0,02 % di HNO₃ e 0,01 % Triton X-100.

STANDARD DI LAVORO MULTI ELEMENTO

Le analisi in emissione atomica richiedono almeno una calibrazione giornaliera; è indispensabile quindi avere sempre pronta una serie di *standard* rappresentativi dell'intervallo di concentrazioni dei campioni analizzati. A questo scopo si preparano le soluzioni multi elemento per l'uso più corrente denominate *standard* CAT-1 ÷ CAT-6.

L'elevata sensibilità della metodica analitica impone l'utilizzo di sali ad alto grado di purezza (grado analitico) ed opportunamente essiccati; per l'uso frequente si consigliano soluzioni *standard* multi elemento con certificato analitico (a concentrazioni variabili secondo il produttore) o a singolo elemento pronte per l'uso alla concentrazione di 1 g L^{-1} (1 mg mL^{-1}) specificatamente preparate per le determinazioni in ICP e assorbimento atomico.

Note operative: in tutte le fasi della preparazione bisogna prestare la massima attenzione ai possibili inquinamenti tra le diverse soluzioni; per le pipette utilizzare sempre puntali nuovi risciacquandoli con lo *standard* da prelevare. E' consigliabile utilizzare sempre lo stesso gruppo di pipette a volume fisso di classe A per ogni soluzione *standard* o pipette di tipo elettronico a volume variabile periodicamente calibrate per pesata; i matracci tarati devono essere di classe A risciacquati di volta in volta solo con acqua deionizzata ultrapura.

Ogni volta che si preparano nuovi *standard*, questi vanno confrontati con i precedenti per verificare che nella preparazione non siano stati commessi errori; sono accettabili differenze massime fra nuovi e vecchi *standard* nell'ordine di grandezza del 2%.

Tutte le operazioni di diluizione si eseguono con acqua deionizzata ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega$) filtrata a $0,22 \mu\text{m}$.

La seguente tabella riassume i volumi di ciascun *standard* da 1 g L^{-1} (1 mg L^{-1}) a singolo elemento da prelevare in matraccio da 250 mL per la preparazione della soluzione madre A multi elemento conservabile ed utilizzabile per un periodo di circa tre mesi.

Soluzione <i>standard</i> 1 g L^{-1}	Volume prelevato in matraccio da 250 mL	Soluzione madre A	
		Concentrazione finale mg L^{-1}	Concentrazione finale mg mL^{-1}
Calcio	25 mL	100	0,100
Potassio	10 mL	40	0,040
Magnesio	10 mL	40	0,040
Sodio	10 mL	40	0,040
Fosforo	2000 μL	8	0,008
Zolfo	10 mL	40	0,040
Silice	5000 μL	20	0,020

Dalla soluzione madre A multi elemento vengono preparate le soluzioni *standard* CAT-1, 2, e 3, mentre la preparazione degli *standard* CAT-4, 5, e 6 viene eseguite partendo dagli *standard* da 1 g L^{-1} a singolo elemento.

Dopo avere portato al volume finale di 250 ml tutte le soluzioni standard CAT-1 ÷ CAT-6, aggiungere a ciascuna di esse 2,5 ml di soluzione di CsCl-Y-Triton; in questo modo gli standard sono pronti per l'utilizzo e contengono già CsCl, Y e Triton X-100 nelle stesse proporzioni dei campioni.

Le tabelle seguenti riassumono i volumi prelevati da ciascuna soluzione *standard* e portati al volume finale di 250 mL in matraccio tarato.

	µL prelevati in matraccio da 250 mL		
	CAT- 1	CAT- 2	CAT- 3
Soluzione madre A multi elemento	1000	2500	10000

Soluzione <i>standard</i> 1 g L⁻¹	µL prelevati in matraccio da 250 mL		
	CAT- 4	CAT- 5	CAT- 6
Calcio	2500	5000	10000
Potassio	1000	2000	4000
Magnesio	1000	2000	4000
Sodio	1000	2000	4000
Fosforo	200	300	500
Zolfo	1000	2500	5000
Silice	500	1000	3000

Gli *standard* CAT-1 ÷ CAT-6 sono utilizzabili per 2-3 settimane e si conservano a temperatura ambiente in recipienti da 125 mL di policarbonato con tappo a vite; ogni recipiente verrà utilizzato sempre e solo per lo *standard* a quella concentrazione.

La seguente tabella riassume le concentrazioni finali in mg L⁻¹ degli *standard* di lavoro pronti per l'utilizzo giornaliero CAT-1 ÷ CAT-6 multi elemento.

Analita	Concentrazioni in mg L⁻¹ delle soluzioni standard multi elemento					
	CAT-1	CAT- 2	CAT- 3	CAT- 4	CAT- 5	CAT- 6
Calcio	0,400	1,00	4,00	10,00	20,00	40,00
Potassio	0,160	0,40	1,60	4,00	8,00	16,00
Magnesio	0,160	0,40	1,60	4,00	8,00	16,00
Sodio	0,160	0,40	1,60	4,00	8,00	16,00
Fosforo	0,032	0,080	0,320	0,80	1,20	2,00
Solfato	0,479	1,198	4,794	11,985	29,96	59,92
Silice	0,080	0,20	0,80	2,00	4,00	12,00

ANALISI

Le seguenti note analitiche sono relative alla strumentazione precedentemente citata, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore; per ulteriori informazioni tecniche vedere gli specifici manuali relativi al sistema analitico Varian ICP-OES.

Tutti i campioni, i bianchi, gli *standard* e le carte di controllo devono essere trattati come descritto nel precedente capitolo preparazione dei campioni, con l'aggiunta della soluzione di CsCl-Y-Triton. Pertanto a 10 ml misurati nelle provette utilizzate per l'autocampionatore, si devono aggiungere 100 µL della soluzione di CsCl-Y-Triton.

Una sequenza analitica è solitamente così organizzata:

- 1 bianco di acqua ultrapura
- 6 *standards* di calibrazione
- 2 carte di controllo
- 15÷20 campioni
- 2 carte di controllo
- 1 bianco di acqua ultrapura
- 6 *standards* di calibrazione
- 2 carte di controllo
- 15÷20 campioni
- ... ecc.
- 1 bianco di acqua ultrapura
- 6 *standards* di calibrazione

Nella sequenza descritta con la lettura dei bianchi viene eseguito l'azzeramento iniziale per ogni linea analitica e viene posto al valore unitario il segnale delle linee di controllo dell'argon e del tampone di ionizzazione Cs. Le oscillazioni sulle linee dell'argon devono essere contenute entro 0,95÷1,05, valori più elevati possono indicare instabilità strumentale nella nebulizzazione, nel plasma o derive ottiche; i valori delle letture ottenuti sul Cs devono essere contenuti entro 0,9÷1,1, oscillazioni più ampie possono indicare errori nella proporzione della loro aggiunta (0,1 a 10 mL), instabilità nel prelievo o nella nebulizzazione, oppure instabilità strumentale che dovrebbe essere evidenziata da analoga variabilità sulle linee dell'argon.

Per una più approfondita trattazione del significato dei bianchi e del loro uso nel calcolo dei limiti di detezione e quantificazione del metodo, si veda il capitolo introduttivo.

Al termine di ogni sequenza analitica si deve eseguire la valutazione degli andamenti dei valori dei bianchi e delle calibrazioni (fattori di risposta RF) per ogni linea analitica, come descritto nei paragrafi seguenti.

Le carte di controllo possono essere *standards* esterni certificati oppure campioni sintetici o naturali preparati all'interno del laboratorio, che vengono analizzati per un lungo periodo (mesi) al fine di controllare la variabilità analitica tra i giorni.

Modalità di calibrazione

Le calibrazioni si eseguono per regressione (lineare o quadratica) della concentrazione di ogni analita rispetto all'area del corrispondente picco, l'intercetta con l'origine deve essere calcolata.

La scelta delle modalità di calibrazione dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole considerare; normalmente vengono scelti intervalli che vanno da un minimo di un ordine di grandezza (1-10) fino a due ordini di grandezza (1-100).

Nella tabella seguente vengono riportate le linee utilizzate per ogni elemento analizzato assieme alle linee degli *standard* interni (Ar, Y e Cs), il tipo di regressione con l'eventuale correzione e gli *standard* utilizzati. Quando “*Thru blank*” è selezionato la regressione viene fatta passare attraverso il valore di bianco (segnale del bianco uguale a concentrazione zero), questa opzione permette di estrapolare con più precisione le concentrazioni prossime ai limiti di detezione e se ne consiglia l'utilizzo solo per le linee più sensibili.

Elemento e lunghezza d'onda (nm)	Tipo di regressione e correzione	Utilizzo del bianco “ <i>Thru blank</i> ”	<i>Standard</i> utilizzati (mg L ⁻¹)					
			CAT- 1	CAT- 2	CAT- 3	CAT- 4	CAT- 5	CAT- 6
Ar 420,067	<i>Standard</i>	interno	-	-	-	-	-	-
Ar 703,025	<i>Standard</i>	interno	-	-	-	-	-	-
Ar 737,212	<i>Standard</i>	interno	-	-	-	-	-	-
Ca 315,887	Lineare				4,00	10,00	20,00	40,00
Ca 317,933	Quadratica	X	0,40	1,00	4,00	10,00	20,00	
Ca 396,847	Lineare	X	0,40	1,00	4,00			
Cs 672,328	<i>Standard</i>	interno	-	-	-	-	-	-
K 766,491	Lineare	X	0,16	0,40	1,60	4,00		
K 769,897	Quadratica	X			1,60	4,00	8,00	16,00
Mg 279,078	Lineare				1,60	4,00	8,00	16,00
Mg 279,553	Lineare	X	0,16	0,40	1,60	4,00		
Mg 285,213	Lineare				1,60	4,00	8,00	16,00
Na 330,237	Lineare					4,00	8,00	16,00
Na 588,995	Lineare	X	0,16	0,40	1,60	4,00	8,00	16,00
Na 589,592	Lineare	X	0,16	0,40	1,60	4,00	8,00	
P 177,434	Lineare				0,32	0,80	1,20	2,00
P 213,618	Lineare	X	0,032	0,080	0,32	0,80		
SO ₄ S 181,972	Lineare	X	0,479	1,198	4,794	11,985		
SO ₄ S 182,562	Lineare					11,985	29,96	59,92
Si 251,611	Lineare				0,80	2,00	4,00	12,00
Si 288,158	Quadratica	X	0,08	0,20	0,80	2,00		
Y 371,029	<i>Standard</i>	interno	-	-	-	-	-	-

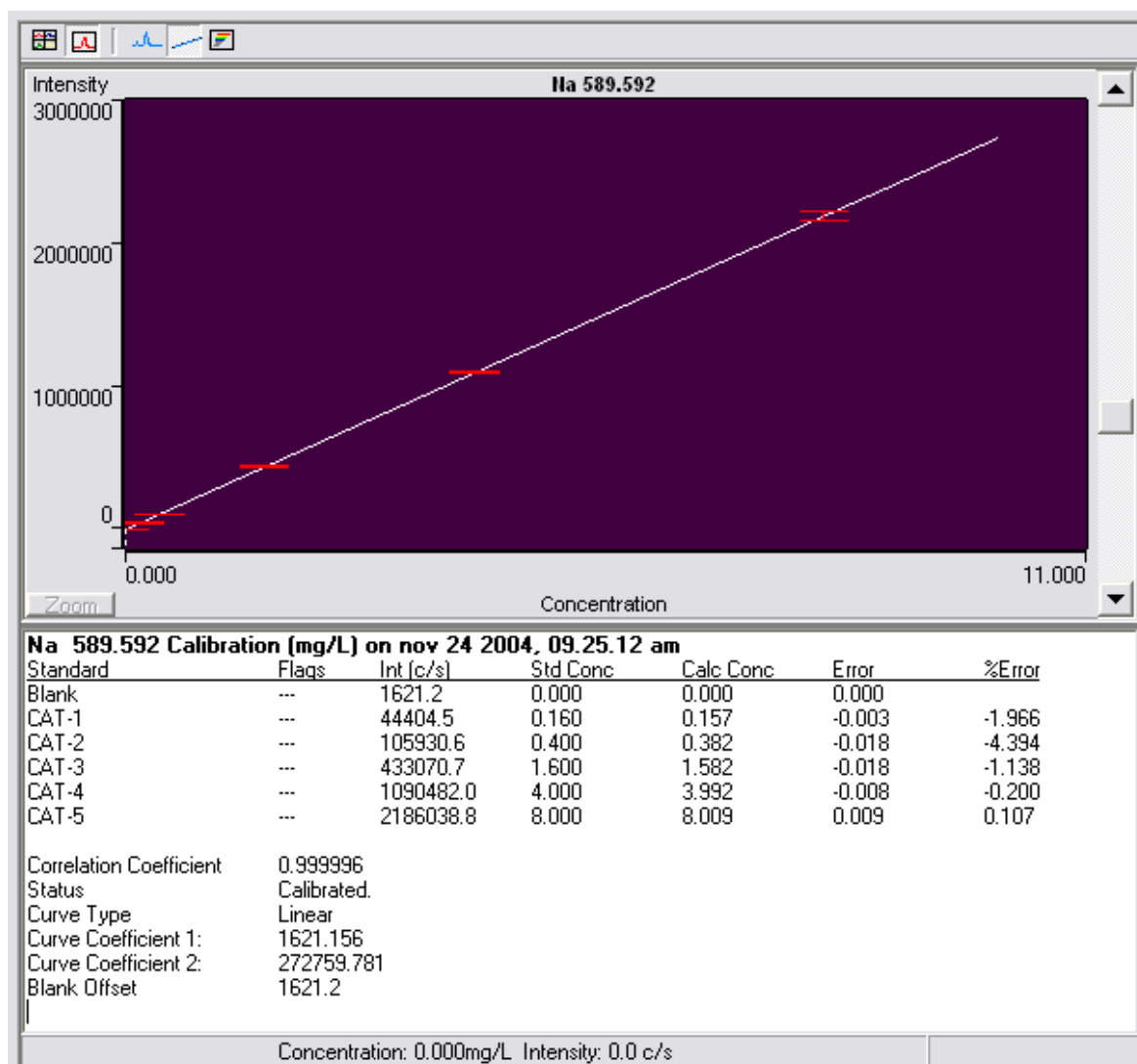
La determinazione del Na 588,995 nm può risentire dell'interferenza della linea di emissione dell'ittrio 588,955 nm su *standard* e campioni con concentrazioni inferiori ad 1 mg Na L⁻¹. Si consiglia pertanto di utilizzare la correzione FACT (*Fast Automated Curve-Fitting Technique*) che permette di scomporre con una serie di algoritmi le interferenze sul segnale dell'analita.

La regressione lineare è la modalità di calibrazione più utilizzata, tuttavia per gli elementi calcio (317,933 nm) e silice (288,158 nm), le calibrazioni quadratiche soddisfano meglio i parametri della regressione.

Il *software ICP-Expert* permette di eseguire una buona valutazione grafica e matematica della calibrazione. Nella figura si riporta l'esempio del Na 589,592 con i parametri della calibrazione

riportati dal *software*; con la linea bianca viene tracciata la regressione mentre i segmenti rossi rappresentano le letture sugli *standard* con la loro variabilità nelle repliche.

Per ogni calibrazione il *software* controlla che il coefficiente di correlazione sia migliore di 0,999 con una deviazione percentuale dello *slope* massima del 10%, per ogni analita viene accettato un errore massimo nell'interpolazione del 15 % (%Error).



Esempio di regressione nell'analisi del sodio 589,592 nm nell'intervallo 0,16-8 mg L⁻¹.

Un ulteriore approfondimento sulla qualità della calibrazione lo si può ottenere dall'osservazione della costanza degli andamenti del fattore di risposta (RF); per alcuni elementi esso non è contenuto nell'intervallo del $\pm 5\%$ del suo valore medio, ad indicare la necessità di utilizzare regressioni quadratiche anziché lineari.

Queste considerazioni possono essere fatte solo esportando i dati ad un foglio di calcolo *Excel* in quanto il *software ICP-Expert* non prevede questa elaborazione; nell'esempio del Na 589,592 la calibrazione lineare (bianco e cinque livelli di concentrazione) è la più adatta, in quanto i valori di RF sono perfettamente contenuti nell'intervallo del $\pm 5\%$ attorno al valore medio di RF.

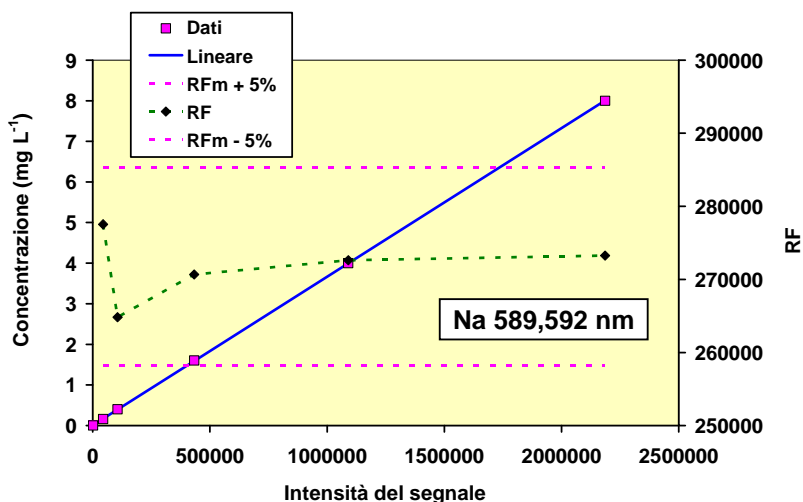
Esempio di regressione nell'analisi del sodio 589,592 nm nell'intervallo 0,16 – 8 mg L⁻¹.

Regressione lineare: $\mu\text{g L}^{-1} = 0,005 + 3,66 \cdot 10^{-6} \text{ intensità}$

Coefficiente di correlazione: $r^2 = 0,999992$

Fattore di risposta medio: $\text{RF}_{\text{medio}} = 271781$

Intervalli del fattore di risposta $\text{RF}_{\text{medio}} \pm 5\%$ 258192 e 285370



Nelle determinazioni di Ca 317,933 e Si 288,158 le regressioni lineari in ampi *range* di calibrazione (1-2 ordini di grandezza) non risultano avere RF entro il 5%, pertanto si consiglia di utilizzare regressioni quadratiche ottenute con almeno quattro livelli di concentrazioni compreso il bianco.

Esempio di regressione nell'analisi del calcio 317,933 nm nell'intervallo 0,4 - 20 mg L⁻¹.

Regressione lineare: $\mu\text{g L}^{-1} = -0,048 + 4,06 \cdot 10^{-5} \text{ intensità}$

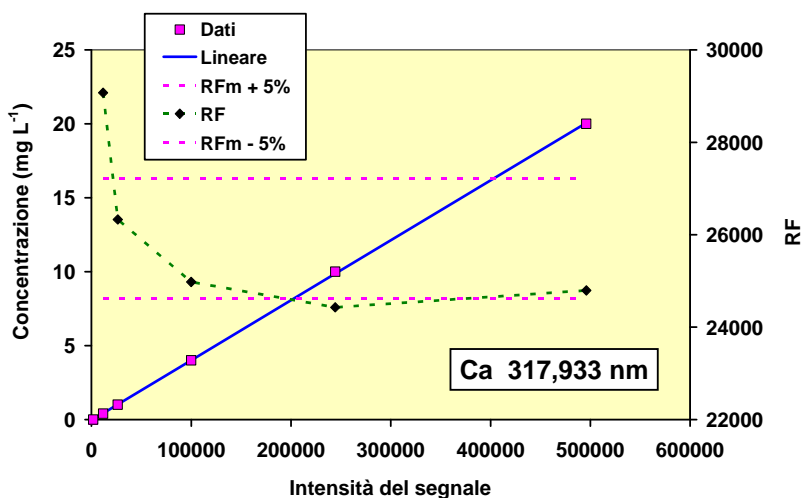
Coefficiente di correlazione $r^2 = 0,999918$

Regressione quadratica: $\mu\text{g L}^{-1} = -0,095 + 4,18 \cdot 10^{-5} \text{ intensità} - 2,56 \cdot 10^{-12} \text{ intensità}^2$

Coefficiente di correlazione $r^2 = 0,999989$

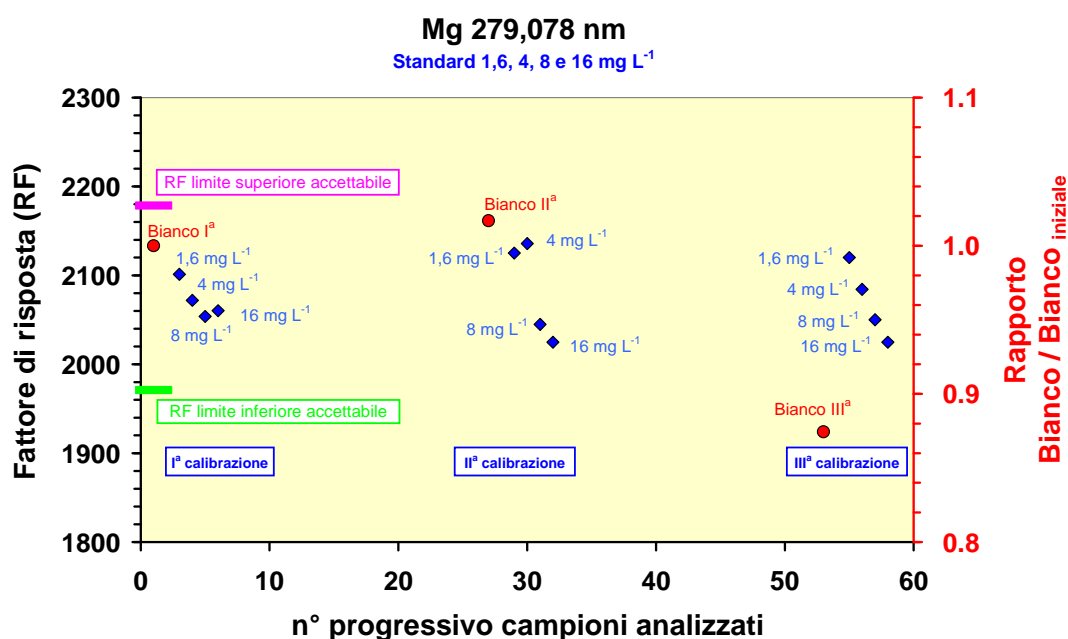
Fattore di risposta medio: $\text{RF}_{\text{medio}} = 22,3$

Intervalli del fattore di risposta $\text{RF}_{\text{medio}} \pm 5\%$ 21,2 e 23,4



Al fine di poter valutare attentamente gli andamenti delle regressioni all'interno di una sequenza analitica (30-50 determinazioni), per ogni calibrazione si consiglia di calcolare i valori di RF e confrontarli con l'intervallo $RF_{\text{medio}} \pm 5\%$ per valutare la più appropriata regressione (lineare o quadratica). Ogni sequenza di calibrazione deve inoltre essere confrontata con le precedenti e le successive per verificare la stabilità strumentale della risposta. Nell'esempio del Mg 279,078 si possono confrontare gli andamenti dei valori di RF di ogni standard all'interno della calibrazione e tra le calibrazioni rispetto al valore di $RF_{\text{medio}} \pm 5\%$ (limite superiore ed inferiore).

Questa visualizzazione grafica viene effettuata esportando i risultati analitici espressi in intensità e concentrazione in un foglio di calcolo *Excel* predisposto per questa elaborazione. Nell'esempio si nota la buona stabilità di risposta strumentale ottenuta nelle tre repliche di calibrazione eseguite durante una serie analitica di 59 determinazioni. In fase di elaborazione dei risultati, questa valutazione deve essere eseguita su tutti gli analiti considerati.



Esempio per l'analisi del magnesio 279,078 nm nell'intervallo 1,6 - 16 mg L⁻¹, relativo ai controlli di linearità e di stabilità della calibrazione (RF in colore blu) e all'andamento dei bianchi espressi come rapporto Bianco/Bianco_{iniziale} (in colore rosso).

Elaborazione e trascrizione dei risultati analitici

Al termine dell'analisi su una sequenza si deve salvare il *WorkSheet* contenente tutte le informazioni con un nome che riporta la tipologia di campioni e la data di analisi, ed eseguire i seguenti controlli sui risultati contenuti nel *WorkSheet* della sequenza:

- controllare l'acquisizione e l'appropriata integrazione dei picchi degli analiti, verificando che la finestra rossa di integrazione del picco sia ben centrata sul massimo del picco stesso (questo non è così importante per i picchi dell'argon), per la centratura premere il tasto *Ctrl* e spostare la barra rossa con il cursore del mouse;
- controllare che le letture dello *standard* interno argon (420,067, 703,025 e 737,212 nm) siano contenute nell'intervallo 0,98-1,02 corrispondente ad una variabilità compresa nel $\pm 2\%$;
- controllare che le letture dello *standard* interno ittrio 371,029 nm e cesio 672,328 nm siano contenute nell'intervallo 0,90-1,10 corrispondente ad una variabilità compresa nel $\pm 10\%$;

variabilità più elevate possono essere dovute a problemi di introduzione del campione (riscontrabili su tutti gli analiti) o ad una insufficiente agitazione del campione (riscontrabile solo sulle linee di Y e Cs);

- controllare le calibrazioni e verificare la qualità della regressione attraverso l'osservazione dei parametri della calibrazione riportati dal *software ICP-Expert*, le regressioni con parametri fuori dall'intervallo di qualità consentito dal metodo verranno riportate con il termine *uncal*;

Dopo queste verifiche eseguite sul *WorkSheet* della sequenza analitica, trasferire tutti i valori di intensità e concentrazione (copia & incolla) ad un foglio di calcolo *Excel* predisposto per l'elaborazione dei risultati. In questo file di elaborazione dei risultati eseguire i seguenti controlli:

- per ogni elemento e linea analitica, confrontare l'andamento dei valori di bianco visualizzati come rapporto tra ogni bianco ed il primo bianco letto nella sequenza analitica, le variazioni dovrebbero essere contenute nell'intervallo 0,7-1,3 corrispondente ad una variabilità compresa nel ± 30 %; come esempio di questo controllo vedere il grafico del magnesio 279,078 nm precedentemente riportato nelle modalità di calibrazione;
- per ogni elemento e linea analitica, confrontare le calibrazioni sulla base di fattori di risposta (RF) come riportato nel precedente grafico di esempio del magnesio;
- controllo e trascrizione dei valori di concentrazione ottenuti sui campioni prestando attenzione che la curva di calibrazione utilizzata comprenda i valori riscontrati nei campioni, questa operazione è facilitata dal *software* che indica i valori fuori calibrazione in rosso e con una lettera differente a seconda se si è sopra (o = *overrange*) o sotto (u = *underrange*, v = *under valid range*) il *range* di calibrazione.
- calcolo dei valori medi ottenuti dalle letture dello stesso elemento a due o più linee analitiche;
- verifica dei valori ottenuti dall'analisi dei campioni di carte di controllo e loro archiviazione su foglio di lavoro *Excel*, al fine di confrontare i dati conseguiti nella sequenza con i dati ottenuti nel periodo precedentemente considerato dalla carta di controllo;
- nel caso sia necessario apportare variazioni al *WorkSheet* che si riflettono sui risultati analitici (quali le modalità di calibrazione, le finestre di acquisizione del picco, od altro) si dovrà importare di nuovo nel foglio di elaborazione *Excel* i risultati modificati.
- al termine di questa elaborazione si procede alla stampa riassuntiva dei valori analitici ottenuti.

STABILITÀ STRUMENTALE

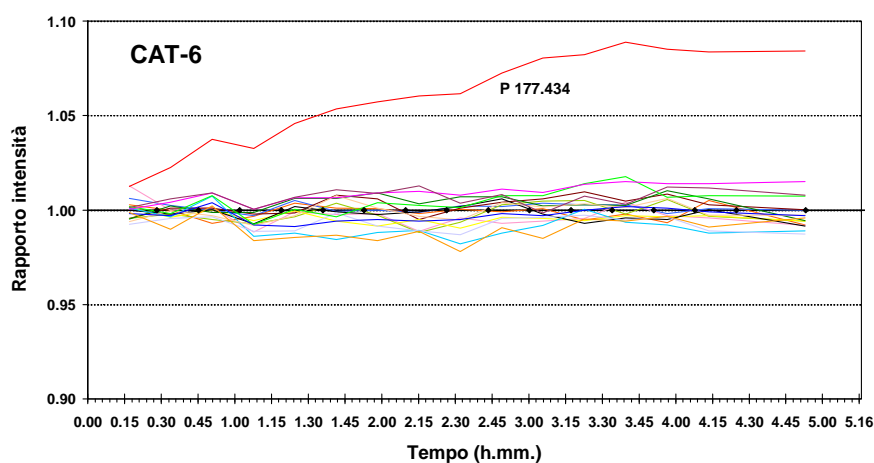
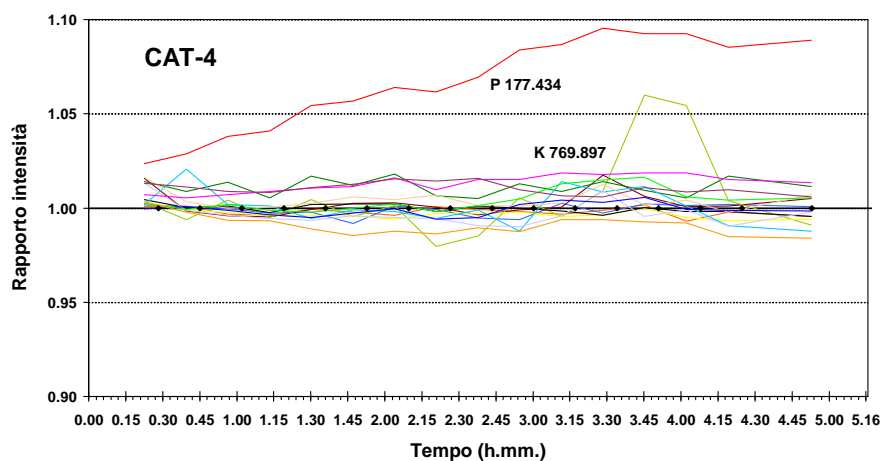
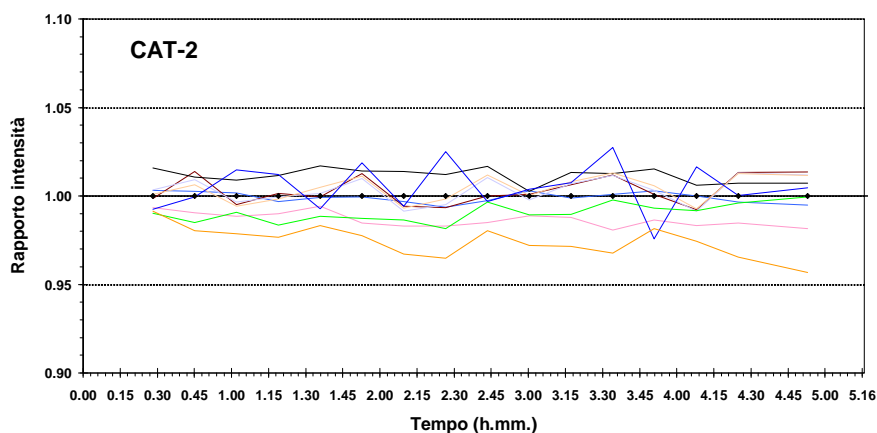
La stabilità dello strumento nelle analisi eseguite con il metodo qui descritto, è stata valutata effettuando dei test di alcune ore con prelievo da autocampionatore di tre standard a diverse concentrazioni. Le misure sono state effettuate sui tre standard CAT-2, CAT-4, CAT-6 ripetuti alternativamente per 16 volte nel tempo, per una durata complessiva di circa cinque ore.

Questo tipo di controllo permette di valutare l'insieme delle derive strumentali, dell'instabilità ottica e di introduzione del campione con l'alternanza di concentrazioni; si possono inoltre evidenziare le lunghezze d'onda con segnali troppo deboli e dunque soggette a sensibili fluttuazioni.

Il grafici seguenti riportano in ascisse il tempo di analisi e in ordinate il rapporto di intensità calcolato tra lo standard di calibrazione iniziale e l'intensità delle successive letture nel tempo; valori del rapporto di intensità pari a 1,1 corrispondono a variabilità del 10%.

I risultati mostrano per lo standard utilizzato a concentrazioni più basse (CAT-2), una stabilità strumentale contenuta nel tempo entro il ± 4 %, mentre per gli altri standard (CAT-4 e CAT-6) la

variabilità è compresa nel $\pm 2-3\%$ ad eccezione del K 769,897 ($\sim 6\%$) e del P 177,434 ($\sim 10\%$) la cui deriva potrebbe essere giustificata da una instabilità strumentale causata da un insufficiente spurgo del sistema ottico con gas inerte (argon) da effettuarsi alle lunghezze d'onda inferiori a 185 nm.



Stabilità strumentale delle letture nell'intervallo di tempo di 5 ore.

Riferimenti bibliografici.

- APAT, IRSA-CNR. 2003. Metodi analitici per le acque. 3020. Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES). Vol. 1. 490 pp.
- APAT, IRSA-CNR. 2003. Metodi analitici per le acque. 3030. Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica. Vol. 1. 490 pp.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater. (Method 3120 B). Am. Publ. Healt Ass., Washington.
- ISO 11885 1996. Water quality. Determination of 33 elements by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.
- U.S. E.P.A. 1994. Determination of metal and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Method 200.7. U.S.E.P.A., Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, Ohio.
- U.S. E.P.A. 1996. SW-846. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Method 6010B.
- Payling R. & P. Larkins. 2000. Optical Emission Lines of the Elements. Ed. J. Wiley & Sons Ltd, Chichester UK. 683 pp