

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Dip. del relatore: Scienze Chimiche

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie
per l'Ambiente e il Territorio (STAMT)

Speciazione del Cromo trivalente ed esavalente nelle acque con HPLC-ICP-MS

Trivalent and hexavalent chromium speciation in waters by
HPLC- ICP-MS

Relatore
Prof.ssa Bogialli Sara
sara.bogialli@unipd.it

Laureanda
Angela Benvegnù
Matricola n.1130668

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

SCOPO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONI	5
1.1 Caratteristiche cromo trivalente ed esavalente.....	5
1.2 Genotossicità.....	8
1.3 Epidemiologia.....	9
1.4 Modalità d'azione.....	10
2 CONTESTO LEGISLATIVO IN MATERIA DI ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO	13
3 ROMAGNA ACQUE	15
3.1 Approvvigionamenti idrici nel territorio romagnolo.....	16
3.2 Impianto Capaccio (Santa Sofia-FC).....	20
3.3 Impianto Standiana (Ravenna).....	23
3.4 Impianto Bassette (Ravenna).....	28
3.5 Modalità di abbattimento del cromo nelle acque.....	30
3.6 Metodi analitici in uso per la speciazione del cromo nelle acque.....	31
4 CAMPIONAMENTO	33
4.1 Metodica di riferimento per la speciazione del cromo in HPLC-ICP-MS.....	33
4.1.1 Complessazione del cromo trivalente con EDTA.....	34
5 SPETTROMETRIA DI MASSA	37
5.1 HPLC.....	37
5.2 ICP-MS.....	38
5.2.1 Sorgente.....	38
5.2.2 Analizzatore.....	40
5.2.3 Rivelatore	41
6 MATERIALI E METODI	43
6.1 Messa appunto della metodica per la speciazione del cromo in HPLC-ICP-MS.....	43

6.1.1 Soluzioni di calibrazione per l'HPLC.....	44
6.1.2 Soluzioni di calibrazione per i metalli per l'ICP-MS.....	44
6.1.3 Soluzioni di calibrazione per il cromo totale per l'ICP-MS.....	45
7 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	47
7.1 HPLC-ICP-MS.....	47
7.2 ICP-MS.....	47
8 MODALITA' OPERATIVE PER LE ANALISI.....	49
8.1 Speciazione cromo trivalente ed esavalente con HPLC-ICP-MS.....	49
8.2 Quality control.....	50
8.3 Incertezza estesa.....	50
8.3.1 Incertezza estesa <i>del cromo totale</i>	51
8.3.2 Incertezza estesa <i>del cromo esavalente</i>	56
8.3.3 Incertezza estesa <i>del cromo trivalente</i>	58
9 RISULTATI E ANALISI DEI DATI RACCOLTI.....	59
9.1 Rette di calibrazione dei metalli.....	59
9.1.1 Rette di calibrazione <i>del cromo totale</i>	61
9.1.2 Rette di calibrazione <i>del cromo trivalente ed esavalente</i>	61
9.2 Validazione dei risultati: prove inter-laboratorio.....	62
9.3 Analisi di campioni reali.....	64
9.4 Campioni nei quali è presente Cr(VI).....	70
10 CONSIDERAZIONI.....	77
11 CONCLUSIONI.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	83
SITOGRAFIA.....	87
SOFTWARE UTILIZZATI.....	89

SCOPO

Gli obiettivi dell'attività di ricerca sono stati la messa appunto di un metodo che consenta la quantificazione del cromo totale tramite ICP-MS e delle sue specie, trivalente ed esavalente, tramite HPLC-ICP-MS nelle acque da destinarsi e destinate al consumo umano in accordo con la legislazione vigente. I campioni analizzati sono stati prelevati nelle provincie di Forlì-Cesena, Ravenna e Rimini, e sono stati trattati dagli impianti di potabilizzazione di Capaccio, della Standiana e delle Bassette, tutti gestiti da Romagna Acque Società delle Fonti S.p.A. I tre impianti sono strutturalmente diversi in quanto devono trattare acque che, pur essendo tutte di origine superficiale, posseggono differenti classificazioni (D. Lgs. 3 aprile 2006, n. 152 art. 80).

ABSTRACT

The aim of the research was the implementation of an advanced method that allows the quantification of the total chromium by ICP-MS and trivalent and hexavalent chromium species by HPLC-ICP-MS according to the Italian legislation, in waters to be destined and destined for human consumption.

The samples analyzed were collected in the provinces of Forlì-Cesena, Ravenna and Rimini, and are treated by the Capaccio, Standiana and Bassette water treatment plants. These three structures are different, due to the different quality of the superficial water to be treated.

1 INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche cromo trivalente ed esavalente

Il cromo trivalente ed esavalente sono diversi per tossicità e modalità d'azione: il primo è un oligoelemento indispensabile alla vita, il secondo è invece cancerogeno. Le proprietà tossiche dei cromati sono legate alla facilità di diffusione attraverso le membrane biologiche e al forte potere di ossidazione, motivo per cui nel D.M. 14/11/16 è stato introdotto come nuovo parametro il cromo esavalente la cui concentrazione limite è fissata a 10 µg/L, che sarà in vigore il 31 dicembre 2018. (G.U. n. 164 del 15.7.2017).

Romagna Acque Società delle Fonti S.p.A. è una Società a totale capitale pubblico, che gestisce tutte le fonti idropotabili della Romagna garantendo acqua a 1,1 milioni di residenti oltre la popolazione turistica estiva della costa romagnola, con oltre 110 milioni di m³ d'acqua annui distribuiti. La sua missione aziendale consiste nel garantire qualità e controllo, innovazione e ricerca, ed ha ritenuto di fondamentale importanza lo studio e la messa a punto di un metodo analitico per la speciazione del Cr (III) e del Cr (VI) nelle acque.

Il cromo è un metallo di transizione, molto abbondante nella crosta terrestre, esiste in natura principalmente come minerale cromite. Esso è presente naturalmente nei suoli, nelle rocce e nei gas emessi dai vulcani, ma può derivare anche da attività umane legate agli scarichi di concerie, industrie metallurgiche e di coloranti. (Gomez, 2006)

Il cromo venne isolato per la prima volta nel 1797 da Vauquelin da un materiale denominato "Piombo Rosso di Siberia" scoperto trentasei anni prima da Johann Gottlob Lehmann, e trovò ampio impiego negli anni a seguire come pigmento nelle vernici e nei vetri. Nell'uso comune la lunga denominazione venne sostituita con "Cromo" che in Greco significa colore. Esso allo stato naturale si presenta solido, lucido e di colore grigio, a differenza del nome originario assegnatogli basandosi sulla colorazione attribuita al metallo da contaminazioni di ossidi di ferro. Fonde con

difficoltà ed è molto resistente alla corrosione, ha peso atomico pari a 52.01 g/mol e numero atomico pari a 24. ^(krebs, 2006)

Il cromo rientra nella categoria dei metalli essenziali, presente in piccole quantità in numerose rocce e terreni, con però un potenziale effetto tossico per la salute umana. Il minerale più diffuso è la cromite o cromito ferroso (FeCr_2O_4), seguito dal piombo rosso di Siberia o crocoite (PbCrO_4), visibili in figura 1 come A e B.

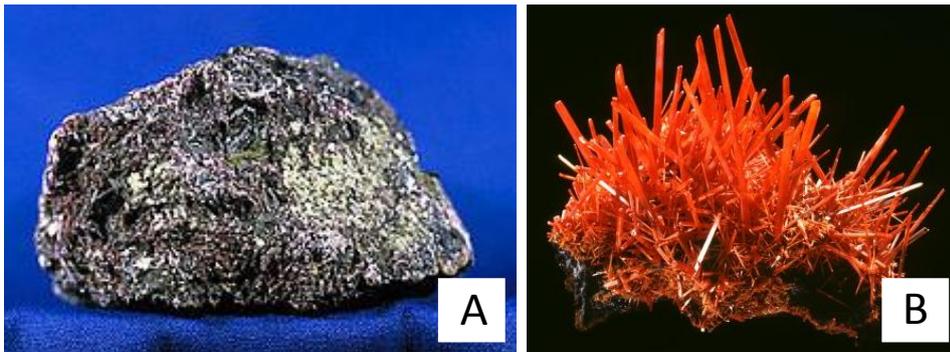


Figura 1. Cromite (A) e piombo rosso di Siberia (B).

Il cromo può legarsi con altri elementi mediante diverse forme di ossidazione, le più comuni delle quali sono il cromo III (trivalente) e il cromo VI (esavalente). La valenza della forma chimica (III o VI) è influenzata dal pH della soluzione: il cromo trivalente, più stabile del corrispondente stato ossidato, viene convertito nell'idrossido insolubile a pH neutro. ^(De Vivo, 2004)

Il Cr (III) si presenta chimicamente come un acido forte che forma complessi di coordinazione ottaedrici con leganti come acqua, solfato, urea, ammoniaca e acidi organici, mentre il Cr (VI) è tendenzialmente molto solubile e mobile. ^(De Vivo, 2004) Gli Ioni di Cr (VI) sono facilmente ridotti a Cr (III) da donatori di elettroni quali materia organica, specie inorganiche come Fe^{2+} , fosfati e solfuri. ^(Ma, 2008)

In particolare, il cromo in acqua può esistere come diverse forme di coordinazione a seconda del pH e delle condizioni di ossidazione presenti, come illustrato nel grafico in figura 2.

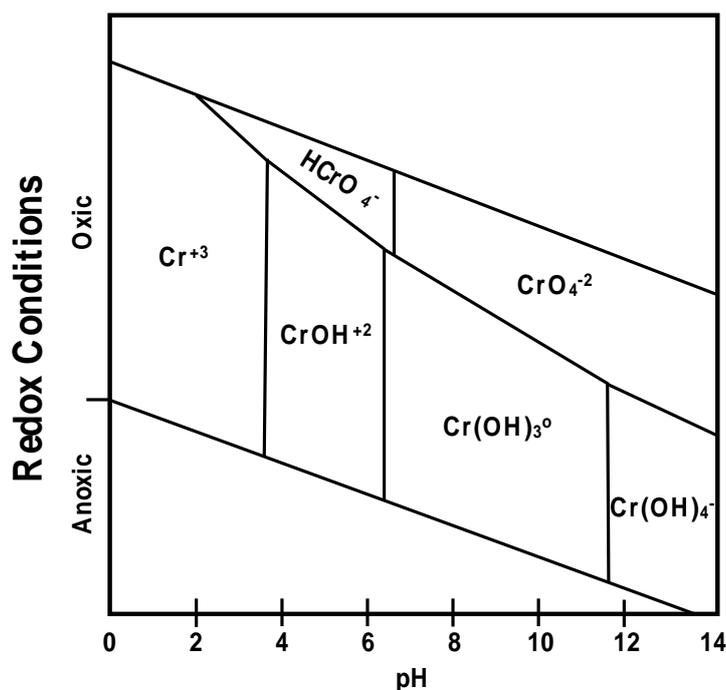


Figura 2. Diagramma Eh-pH di stabilità del cromo.

Lo schema Eh-pH descrive la predominanza delle specie Cr (III) e Cr (VI) in soluzione acquosa, in relazione al pH e al potenziale redox. Secondo studi condotti dalla *Water Research Foundation* il Cr (VI) predomina nelle acque potabili ricche di ossigeno o in presenza di ossidanti, acidi forti o moderatamente forti come cloro e clorammine. (McNeil, 2012)

Nelle acque potabili il Cr (VI) è presente come HCrO_4^- per valori al di sotto di pH 6,5 e CrO_4^{2-} tra pH 6,5 e 10. In condizioni ossidanti a pH acido inferiore a 4, la specie dominante è Cr^{+3} , seguita da CrOH^{+2} (da pH 4 a pH 6) e Cr(OH)_3^0 (da pH 6 a pH 12). In condizioni anossiche basiche con pH maggiori di 10 si ha la forma Cr(OH)_4^- . Il Cr (III) tende ad essere estremamente insolubile (<20 $\mu\text{g/L}$) tra pH 7 e pH 10, con minima solubilità a pH 8 di circa 1 $\mu\text{g/L}$. (McNeil, 2012)

Nei sistemi ambientali si è visto che gli ossidanti migliori nei confronti del cromo trivalente sono nell'ordine: ossidi di manganese, ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. (Ma, 2008)

La concentrazione di cromo nella maggior parte delle matrici ambientali è nell'ordine di $\mu\text{g/L}$. In atmosfera si riscontrano concentrazioni più basse,

nell'ordine di pg/L, mentre nei campioni d'acqua la concentrazione varia da ng/L fino a g/L, in prossimità delle industrie. (Gomez, 2006)

In tracce, il cromo trivalente è un oligoelemento essenziale alla vita in quanto cofattore dell'insulina, ormone indispensabile nella regolazione della concentrazione di glucosio nel sangue, dove la sua concentrazione è tra 20 e 30 µg/L. (De Vivo, 2004) Da un punto di vista nutrizionale, una dieta carente di cromo trivalente può causare effetti negativi sulla crescita e sul metabolismo mentre l'ingestione e l'esposizione ai fumi di concentrazioni elevate di cromo esavalente causa rispettivamente danni renali e tumori all'apparato respiratorio. (Mertz, 1969), (De Vivo, 2004)

Il metodo previsto per la sua determinazione secondo l'ISS (Istituto Superiore di Sanità) è la Spettrometria di Assorbimento Atomico con Atomizzazione Termoelettrica. (Ottaviani, 2007)

1.2 Genotossicità

Con il termine genotossicità ci si riferisce all'azione esplicata da una sostanza genotossica nelle cellule umane, che può causare danni al DNA o ai cromosomi portando a potenziali mutazioni ereditarie e trasformazioni maligne come il cancro. L'OEHA (*Office of Environmental Health Hazard Assessment, California*) attraverso studi condotti in vivo su colture di cellule batteriche e di mammiferi, ha constatato come il cromo trivalente entri nelle cellule attraverso diffusione lenta e senza generare tossicità. (Phillips, 2009)

La genotossicità risulta invece essere legata alla forma di cromo esavalente, che come ione cromato (CrO_4^{-2}) entra nelle cellule attraverso trasportatori attivi di tipo solfato, e una volta dentro, viene ridotto da parte di tioli a basso peso molecolare, come ad esempio cisteine e glutatione, o da antiossidanti come l'ascorbato, diventando cromo trivalente. Tra le principali conseguenze correlate alla genotossicità del cromo vi sono il danneggiamento del DNA e i fenomeni di mutagenesi. (McNeill, 2013)

Secondo uno studio condotto da McCarroll et al. nel 2010 tutte le cellule sono in grado di far penetrare al loro interno il Cr(VI) e operare la sua riduzione in Cr (III), quindi potenzialmente tutte le cellule possono portare

all'innesco di effetti negativi per la salute umana. ^(McCarroll, 2010) Il sistema di difesa dell'organismo nei confronti del Cr (VI) prevede la sua riduzione in Cr (III), fuori dalle cellule, nel tratto gastro intestinale con seguente eliminazione attraverso le urine.

Purtroppo nell'uomo, il 10-20% del Cr (VI) anche se a basso dosaggio, sfugge all'inattivazione gastrica umana (vedi paragrafo "Modalità d'azione"), creando effetti mutageni. ^(Zhitkovich, 2011) Eventi di mutagenesi, come *cross linkages* tra DNA-proteina e formazione di complessi instabili di Cr (V) e Cr (VI) possono essere promossi dalla formazione di addotti (Cr (III)-DNA), nei quali il Cr (III) ridotto si lega al DNA oppure in presenza di radicali tiolici che reagiscono con le ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) come radicali idrossilici e l'idroperossido.

1.3 Epidemiologia

Con il termine epidemiologia ci si riferisce alla scienza che studia la frequenza con cui si manifestano sulla salute umana effetti negativi dati da malattie e/o esposizione a diverse sostanze e le condizioni che favoriscono od ostacolano il loro sviluppo. ^(treccani)

Il cromo esavalente negli ultimi anni è stato dichiarato tossico e cancerogeno per la salute umana dall'ISS anche se non sono molti gli studi in letteratura che correlano in modo diretto l'assunzione di Cr (VI) con l'insorgenza di cancro. I primi lavori di ricerca risalgono al 1987 e si sono svolti in Cina osservando l'elevata mortalità per cancro allo stomaco nei villaggi dove nelle acque potabili presentavano alte concentrazioni di questo metallo. ^(Zang, 1987) Uno studio più recente effettuato nel 2008 da Beaumont in Cina ha mostrato lo stesso effetto di quello precedente. ^(Beaumont, 2008)

Infine nel 2011 Linos ha dimostrato una correlazione positiva dell'insorgenza della mortalità legata al cancro al fegato in cittadini esposti a cromo esavalente assunto da acqua potabile nella cittadina greca di Oinofyta. ^(Linios, 2011) Il limite di questi studi è dovuto al basso numero di casi di cancro osservati, i brevi periodi di monitoraggio dall'insorgenza della

malattia e la mancanza di dati relativi all'esposizione individuale di questo agente. (Beaumont, 2008), (Kerger, 2009)

1.4 Modalità d'azione

McCarroll e Thompson nel 2011 basandosi sulle *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment* dell'USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) e sul *National Toxicology Program* (NTP) definiscono il *Mode of Action* (MOA) del cromo, ovvero la modalità d'azione con la quale a partire dal cromo esavalente a seguito di riduzione o stress ossidativo si hanno l'insorgenza di tumori e mutazioni. Analisi effettuate su topi evidenziano effetti dannosi sulla salute degli animali i cui risultati possono essere traslati alla popolazione umana in relazione al rischio di esposizione. (McNeill, 2013)

La figura 3 rappresenta il MOA per effetti legati all'insorgenza del cancro da ingestione di Cr (VI) presente nell'acqua potabile.

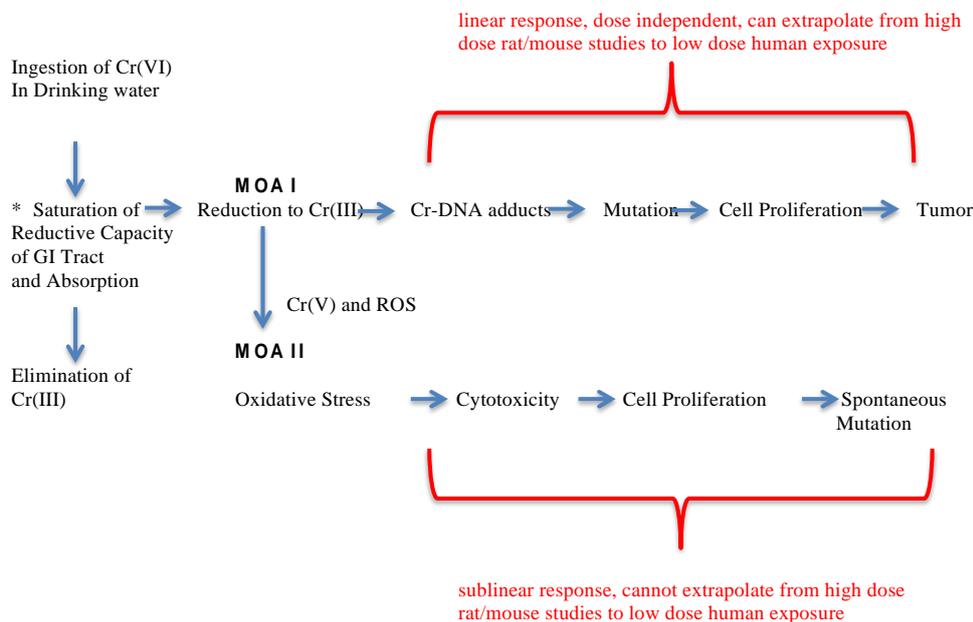


Figura 3. *Mode of Action* (MOA) a seguito di ingestione di Cr(VI) contenuto in acqua potabile.

In seguito all'ingestione di acqua contenente Cr (VI), una frazione del metallo può essere ridotta a Cr (III) non tossico dalla saliva e dall'ambiente acido nello stomaco. Questo meccanismo protettivo continua finché le

condizioni redox sono tali da permetterlo e non vi è saturazione della capacità assorbente del tratto gastro-intestinale (GI). Il 10-20% del Cr (VI) ingerito però non viene ridotto a Cr (III) ma può seguire due vie:

- MOA I: l'assorbimento dei cromati attraverso i canali dei solfati permettono l'ingresso nella cellula del Cr (VI) che viene poi ridotto a Cr (III) mediante la formazione di addotti Cr-DNA e altri danni genetici, generando mutazioni e proliferazioni di cellule tumorali nel GI; ^{(McCarroll, 2010), (Zhitkovich, 2011), (OEHHA, 2011)}
- MOA II: il Cr (VI) in presenza di ROS (*Reactive Oxygen Species*) porta ad una condizione di stress ossidativo che causa citotossicità, proliferazione cellulare, mutazioni spontanee fino a cambiamenti nell'espressione genica. ^{(Thompson, 2011), (Kopec, 2012)}

Da recenti studi condotti da De Flora S. et al. i succhi gastrici sono effettivamente in grado di ridurre il Cr (VI). La capacità di riduzione analizzata risulta essere particolarmente elevata nei campioni post-pranzo rispetto a quelli pre-pranzo con valori pari a (20.4 ± 2.6) e (10.2 ± 2.3) $\mu\text{g Cr (VI)/mL}$ di succo gastrico. Ulteriore conferma deriva da analisi di spettrometria di massa che confermano una riduzione del 70% del Cr (VI) entro 1 min e una del 98% raggiunta dopo 30 min con un pH pari a 2 dei succhi gastrici, paragonabile ai campioni post-pranzo.

Con pH alcalini si ha un decremento della capacità di riduzione del Cr (VI) in Cr (III). Questo meccanismo pH-dipendente fornisce una formidabile barriera nel limitare tossicità, genotossicità e cancerogenicità da cromo esavalente introdotto per via orale. Il meccanismo funziona finché il pH resta acido e non si raggiunge il livello di saturazione del GI. ^(De Flora, 2016)

2 CONTESTO LEGISLATIVO IN MATERIA DI ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

La qualità delle acque destinate al consumo umano è un tema di grande interesse negli ultimi decenni, ma è solo con la Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 che si incomincia a definire e regolamentare i parametri qualitativi e quantitativi che le risorse idriche devono presentare. Gli Stati membri vigilano affinché le disposizioni della direttiva vengano adottate e seguite, al fine di evitare un deterioramento dell'attuale qualità delle acque e le possibili ripercussioni sulla salute umana. Altro aspetto molto importante che si prefissa tale Direttiva è di evitare l'aumento dell'inquinamento delle acque da destinarsi ad uso potabile. In Italia l'attuazione di questa Direttiva si ha con il D.lgs. 31/2001 "Qualità delle acque destinate al consumo umano", secondo la quale l'acqua potabile viene definita come "acqua trattata o non trattata, per la preparazione di cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori". Essa deve soddisfare i requisiti di conformità riguardanti i parametri microbiologici (parte A), chimici (parte B) e indicatori (parte C) presenti nell'Allegato I del medesimo Decreto (e relative modifiche attuate nel D.lgs. 46/2014).

Il cromo totale rientra nella tabella n°2 "parametri chimici" con una concentrazione limite pari a 50 µg/L come cromo totale mentre è nel D.M. 14/11/16 che viene fissato il limite per il cromo esavalente con limite pari a 10 µg/L, dove il parametro deve essere ricercato soltanto se il valore di cromo totale risulta essere maggiore di 10 µg/L. ^{(D.lgs. 31/2001), (Gazzetta)}

3 ROMAGNA ACQUE

Romagna Acque-Società delle Fonti S.p.A. è la Società per azioni a capitale pubblico che gestisce tutte le fonti idropotabili della Romagna.

L'ente si occupa della produzione e fornitura della risorsa idrica come soggetto grossista per le Province di Forlì-Cesena, Ravenna e Rimini. Cliente principale è Hera S.p.A., gestore del servizio idrico integrato che assorbe circa il 99% della fornitura idrica erogata. Una definizione di gestore idrico la troviamo nel D.lgs. 152/2006 nella parte III "Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche", che recita come segue: "il gestore del servizio idrico integrato è rappresentato da chiunque fornisca acqua a terzi attraverso impianti idrici autonomi o cisterne, fisse o mobili". ^(bosettiegatti)

La rete di distribuzione romagnola ha una lunghezza complessiva di 604 Km che permette la distribuzione annua media di circa 111.000.000 di metri cubi d'acqua con una popolazione residente servita di 1.100.000 persone, oltre alle presenze turistiche. Romagna Acque si pone in una dimensione sociale che ha lo scopo di valorizzare il capitale umano, applicando un'economia che garantisca solvibilità e stabilità futura con un'ottica di sostenibilità ambientale e responsabilità. Questi aspetti si riflettono nel rispetto delle normative di riferimento, nelle regolari attività di monitoraggio degli aspetti ambientali, dei consumi e delle emissioni al fine di garantire il massimo rispetto della biodiversità e della qualità dell'acqua fornita, investendo in fonti energetiche rinnovabili come quella solare. Il "Servizio Controllo Qualità dell'Acqua" è costituito da due sedi situate presso gli impianti di potabilizzazione di Capaccio e di Ravenna. Entrambe sono dotate di una vasta gamma di strumenti analitici e programmi moderni che permettono di svolgere controlli chimico-fisici e microbiologici sulla filiera di trattamento e sulla rete di distribuzione. L'acqua distribuita è conforme ai requisiti imposti dalla normativa nazionale, il D.lgs.31/2001, integrato e modificato con il D.lgs.27/2002, che disciplina la qualità delle acque destinate al consumo umano.

Importante è la partecipazione dell'ente a circuiti inter-laboratorio nazionali e internazionali in quanto strumento indispensabile per la valutazione esterna e l'affidabilità dei risultati analitici forniti. Dal 2014 Romagna Acque cura aspetti legati alla ricerca scientifica, promuovendo varie collaborazioni come quelle con il dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali di Bologna, il Politecnico di Milano e la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico. Romagna Acque, grazie a queste collaborazioni esterne si impegna nel monitoraggio e nell'analisi di fibre di amianto, inquinanti emergenti, prodotti fitosanitari (come il Glifosato), *Legionella Pneumophila* e *Legionella spp.*, studio di AOPs (*Advanced Oxidation Processes*) per la rimozione di microinquinanti emergenti, ottimizzazione del processo di pre-ossidazione con biossido di cloro, ect.

(romagnacque qualita)

3.1 Approvvigionamenti idrici nel territorio romagnolo

Il fabbisogno idrico complessivo del territorio romagnolo viene soddisfatto dalle risorse presenti nelle 3 provincie nel modo seguente:

- Forlì-Cesena è in grado di soddisfare il 58% del totale del fabbisogno idrico. Di questo il 50% proviene dall'invaso artificiale di Ridracoli e dalla derivazione di fiumi come il Bidente e il Rabbi e da bacini idrografici ricadenti all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi Monte Falterona e Campigna. Solo l'8% deriva da acque di falda tramite pozzi. L'istogramma di figura 1 indica le sottostanti ripartizioni idriche, rappresentate con bande colorimetriche in relazione all'origine della fonte (diga, sotterranea, sub-alveo, superficiale). ^(fonti, 2016)

Acqua captata¹ in m³ nel 2016

TOTALE **64.508.397**

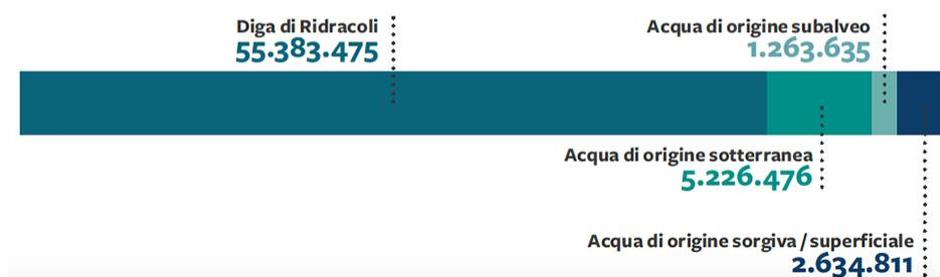


Figura 1. Ripartizioni idriche relative al 2016 per la provincia di Forlì-Cesena.

- Territorio del ravennate che concorre alla produzione con un 22% attraverso acque superficiali derivanti dai fiumi Lamone, Reno e CER (Canale Emiliano Romagnolo). Il grafico in figura 2 rappresenta le ripartizioni idriche di Ravenna e dintorni, rappresentate con bande colorimetriche in relazione all'origine della fonte (superficiale-Bassette e Standiana, sotterranea). ^(impianti, 2016)

Acqua captata in m³ nel 2016

TOTALE **25.696.778**

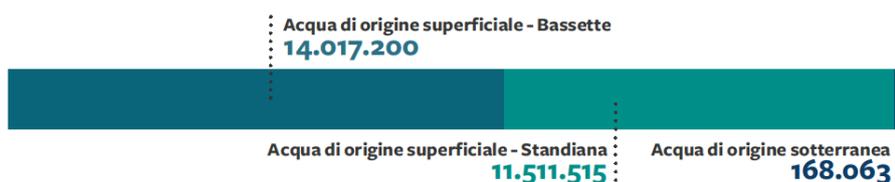


Figura 2. Ripartizioni idriche relative al 2016 per la provincia di Ravenna.

- Territorio riminese che sopperisce al restante 20% della richiesta idrica utilizzando prevalentemente acqua di falda estratta da pozzi e dai Conoidi del Marecchia e del Conca. In figura 3 si può notare la ripartizione idrica, rappresentata da bande colorimetriche relative alla tipologia di fonte (sotterranea Marecchia e Conca, Diga, subalveo, sorgenti e fonti superficiali). ^(impianti, 2016)

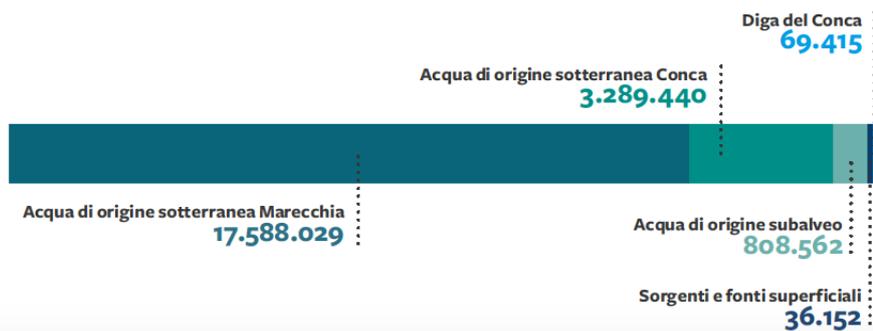


Figura 3. Ripartizioni idriche relative al 2016 per la provincia di Ravenna.

Nella cartina sottostante (figura 4) è rappresentata la rete impiantistica in cui sono visibili le fonti idropotabili del territorio romagnolo in cui le tre provincie di Forlì-Cesena, Ravenna e Rimini sono colorate rispettivamente di grigio, verde e verde scuro. (rete, 2016)



Figura 4. Cartina rappresentante le fonti idropotabili del territorio romagnolo.

Nella figura 4 sono riportati diversi impianti di potabilizzazione: i principali sono quelli di Capaccio in provincia di Forlì-Cesena, Standiana e delle Bassette in provincia di Ravenna, indicati con una freccia gialla in cartina. Altri impianti di potabilizzazione minori sono rappresentati da: Centrale di Montaspro, Pandolfa, Romiti, Quarto Impianto, Centrale Neruda, Potabilizzatore del Conca, centrale Raggera, Sarzana, Dario Campana, Centrale Via Erta, Centrale S. Maria del Piano, Albertazzo, Bordonchio e Fusignano.

Le tre provincie presentano acque con diverse caratteristiche come mostra la tabella 1, nella quale sono riportati i principali parametri e i limiti di legge stabiliti dal D.lgs. 31/2001. ^(romagnacque qualita)

Tabella 1. Caratteristiche relative alle acque di Forlì-Cesena, Ravenna e Rimini.

	Forlì-Cesena	Ravenna	Rimini	Limiti di Legge Dlgs 31/2001
	Media			
pH	7,7	7,8	7,6	6,5÷8,9
Conducibilità (µS/cm)	422	438	544	2500
Durezza totale (°F)	22	20	26	consigliato 15÷50
Residuo fisso a 180° (mg/L)	295	307	381	consigliato 1500
Ammonio (mg/L)	0,02	<0,05	<0,05	0,5
Sodio (mg/L)	13	19	25	200
Nitrati (mg/L)	5	4	8	50
Nitriti (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01	0,1
Cloruri (mg/L)	18	28	31	250
Calcio (mg/L)	64	59	76	-
Manganese (µg/L)	3	3	4	50

Dalla tabella 1 si può osservare come i valori di pH siano simili per tutte e tre le provincie con valori medi prossimi alla neutralità. Durezza e residuo fisso ricadono negli intervalli consigliati. Ammonio, sodio, nitrati, cloruri e manganese presentano valori molto al di sotto del limite di legge, quindi l'acqua fornita risulta essere conforme e di buona qualità.

Nel mese di giugno del 2016 l'ammontare totale della fornitura idrica è pari a 10.680.513 m³, per le provincie di Forlì-Cesena, Ravenna e Rimini

rispettivamente con valori pari a 3.502.743, 3.224.814 e 3.952.956 m³.

(distribuzione)

3.2 Impianto Capaccio (Santa Sofia-FC)

L'impianto di Capaccio situato nei pressi di Santa Sofia, tratta l'acqua proveniente dalla diga di Ridracoli, inserita all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna, lungo il corso del fiume Bidente, nell'alto Appennino tosco-romagnolo. L'invaso ha una capacità di 33 milioni di metri cubi d'acqua e permette una produzione massima di 220.000 m³ d'acqua al giorno.

Il processo di potabilizzazione prevede il passaggio dell'acqua in due vasche di pre-ossidazione da 10.000 m³ ciascuna, trattate con biossido di cloro. L'acqua così trattata viene quindi convogliata a un torrino piezometrico al fine di regolarne la portata per transitare poi in due linee parallele dove subisce il processo di chiariflocculazione (in figura 5) con policloruro di alluminio (PAC), cloruro basico di alluminio avente formula molecolare $Al_2(OH)_4Cl_2$. Si tratta di un complesso polimolecolare polielettrolita che ha lo scopo di far precipitare i solidi sospesi colloidali non sedimentabili aventi dimensioni comprese tra 0,001 e 10 µm, e i solidi sedimentabili molto fini, difficili da eliminare con un trattamento fisico semplice a causa della loro velocità di sedimentazione estremamente bassa. In generale si ha una buona riduzione della torbidità con pH compresi tra 6 e 9. Qui avviene un primo processo detto coagulazione nel quale i cationi derivanti dal PAC, interagiscono con la superficie carica negativa che riveste i colloidali. Si ha una destabilizzazione delle sostanze colloidali sospese nell'acqua da trattare con la formazione di micro fiocchi e fiocchi che precipitano facilmente. Fattori che influenzano la coagulazione sono: pH, temperatura, dosaggio dei reagenti, tipologia e ordine di somministrazione, tempo di reazione e velocità di agitazione.



Figura 5. Chiariflocculatore relativo all'impianto di Capaccio dove avviene l'immissione del PAC.

L'acqua defluisce poi su 2 linee parallele ciascuna costituita da 8 vasche di sezione rettangolare, denominate filtri, che hanno lo scopo di sedimentare la frazione fine non sedimentata nei chiariflocculatori. Il letto filtrante è costituito da uno strato di sabbia (quarzite) spesso circa un metro e di granulometria $0,7\div 1,2$ mm. Il periodo normale di funzionamento di una unità filtrante è di circa 30 ore con una produzione approssimativa di 25.000 m³, dopodiché si procede ad un lavaggio di rigenerazione per ripristinare le migliori condizioni di funzionamento. Il lavaggio avviene in controcorrente, prima con aria ed acqua per $10\div 15$ minuti, poi con sola acqua per altri $5\div 6$ minuti con un consumo di poco meno di 600 m³ di acqua per lavaggio. Il ciclo può essere effettuato in manuale o in automatico. L'acqua della prima fase di contro lavaggio dei filtri (contenente la quasi totalità dei fanghi accumulati nel letto filtrante) viene convogliato nella stazione di sollevamento dei fanghi, la restante acqua della seconda fase viene rinvia in testa all'impianto.

La figura 6 mostra un esempio di filtri a sabbia.



Figura 6. Filtri a sabbia relativi all'impianto di Capaccio.

L'acqua viene stoccata in una vasca di accumulo da 10.237 m³, dove viene trattata con idrossido di sodio per correggerne il pH ed essere successivamente immessa in rete tramite la condotta principale.

In parallelo alla linea di trattamento dell'acqua vi è quella dei fanghi. L'acqua in uscita dal lavaggio dei filtri a sabbia viene convogliata in una vasca di accumulo, dove, mediante delle pompe, la fanghiglia viene convogliata in due linee parallele di vasche a sezione circolare (ispessitori dinamici) equipaggiate di raschiatore a pettine rotante incernierati al centro, che raccoglie meccanicamente il fango sedimentato sul fondo convogliandolo verso la tramoggia di raccolta e alle relative centrifughe.
(capaccio)

In figura 7 sono rappresentati un ispessitore (A), una centrifuga (B) e dei fanghi palabili (C). I fanghi palabili sono definiti dal D.lgs. 152/2006 come "rifiuto a bassa putrescibilità e a basso tenore di umidità proveniente da raccolta differenziata o selezione o trattamento dei rifiuti urbani, avente un rilevante contenuto energetico", e vengono perciò trattati come rifiuto speciale, in quanto contengono reagenti di processo e carico organico elevato, destinati ad inceneritori, discariche specializzate o come materiali integrativi al cemento. (camera)



Figura 7. Ispessitore (A), centrifuga (B) e fanghi palabili (C) relativi all'impianto di Capaccio.

3.3 Impianto Standiana (Ravenna)

L'impianto della Standiana, inaugurato nel 2015, e in funzione dal 2016 con lo scopo di far fronte ai fenomeni siccitosi e permettere la diversificazione delle fonti di approvvigionamento, rappresenta una delle sedi di potabilizzazione più tecnologicamente avanzate d'Europa. L'impianto è situato in località Fosso Ghiaia alle porte di Ravenna ed è interconnesso alla rete del lughese, al potabilizzatore delle Bassette e all'Acquedotto della Romagna, inoltre tratta l'acqua del Po proveniente da una derivazione del Canale Emiliano-Romagnolo.

Questo impianto ha portata massima di acqua in entrata pari a 900 L/s e utilizza l'ultrafiltrazione (UF) fisica su membrana di 0.04 μm come principale sistema di filtrazione al posto dei tradizionali filtri a sabbia.

L'acqua in ingresso viene sottoposta a grigliatura (figura 8) con setacci da circa 1 cm, seguita da stacciatura su 2 griglie a tamburo rotante (figura 9) da 1 mm basate su un sistema di gestione a tempo e a differenza di livello d'acqua in entrata; questo meccanismo consente di proteggere le membrane ad ultrafiltrazione da eventuali corpi estranei (eventualmente appuntiti o taglienti).



Figura 8. Macchinario che permette la grigliatura nell'impianto della Standiana.



Figura 9. Macchinario atto alla staccatura su griglie a tamburo rotante relativo all'impianto della Standiana.

L'acqua passa poi ad un torrino dove viene regolata in portata e pH e convogliata per gravità dalle condotte nel resto dell'impianto.

L'acqua arriva quindi alla vasca di pre-ossidazione costituita da 4 vasche parallele a serpentina (figura 10), così costruite per aumentare il tempo di contatto tra acqua e biossido di cloro, il quale oltre a disgregare la sostanza

organica e ad ossidare ferro e manganese, esplica azione disinfettante andando a diminuire il carico microbiologico.



Figura 10. Vasche a serpentina relative all'impianto della Standiana, trattate con biossido di cloro.

L'immissione del biossido di cloro avviene attraverso un generatore immerso nell'acqua; il tempo di contatto alla massima portata (1100 L/s) è di 1 ora; ciò significa che a portate inferiori il tempo di contatto è progressivamente maggiore (alla portata di 550 L/s il tempo di contatto sarà di 2 ore).

L'acqua transita nelle due adiacenti vasche di flocculazione, in figura 11, dove viene a contatto con il PAC. Sono presenti due agitatori per il rimescolamento dell'acqua: il primo effettua un rimescolamento veloce per miscelare al meglio il reattivo, il secondo mescola in modo più lento per permettere la formazione dei fiocchi. In queste vasche vi è il dosaggio anche di cloruro ferroso al fine di diminuire gli ioni clorito, secondo la seguente reazione di ossido-riduzione:





Figura 11. Vasca di flocculazione dell'impianto Standiana.

L'acqua arriva nel cuore dell'impianto dove si effettua l'ultrafiltrazione su membrane. Si tratta di 8 treni paralleli, ciascuno contenente 5 cassette fatte da 64 moduli, in figura 12 è mostrato un modulo (A). Ogni modulo contiene moltissime fibre (B) costituite da una speciale plastica idrofilica appositamente trattata che le rende permeabili all'acqua, una buona idrofilicità rende infatti le membrane più resistenti allo sporco e possono quindi essere più facilmente pulite e recuperare velocemente le caratteristiche iniziali. Queste fibre sono ancorate alle estremità e sono lasciate appositamente lasche per consentire il distacco di tutte le impurità adese alle membrane filtranti durante la fase di lavaggio. I metodi di pulizia dell'UF includono il flussaggio in controcorrente, la pulizia con aria, il flussaggio con aggiunta di reagenti ed il lavaggio chimico. Il flussaggio in controcorrente consente di rimuovere lo strato di sporco sulla superficie della membrana, mentre la pulizia con aria miscelata all'acqua distacca più efficacemente gli inquinanti. Il flussaggio con aggiunta di reagenti ed il lavaggio chimico utilizzano agenti chimici per rimuovere colloidali, microrganismi, sali inorganici che intasano la membrana di UF internamente.

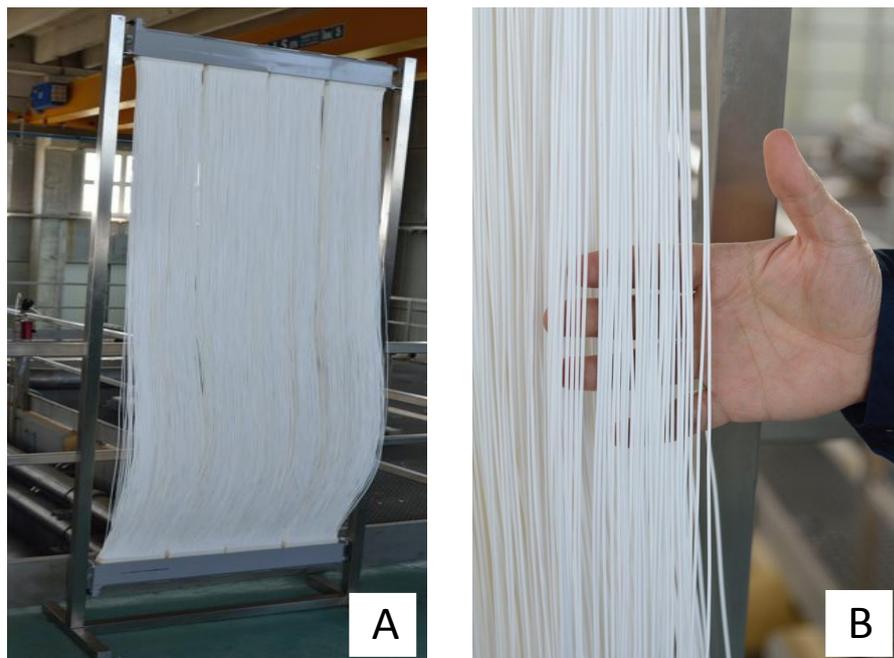


Figura 12. Modulo (A) e fibre (B) relative al processo di ultrafiltrazione dell'impianto della Standiana.

L'acqua passa quindi nella vasca di *Break point* nella quale si ha l'eventuale immissione di ipoclorito di sodio, qualora ci fosse presenza di ammoniaca. L'ammoniaca reagisce infatti con l'ipoclorito, secondo la nota tecnica della "clorazione al *break-point*", con formazione di clorammine.

L'ultimo passaggio prevede il trattamento dell'acqua con 32 filtri GAC (*Granular Activated Carbon*) / BAC (*Biologic Activated Carbon*) (figura 13) attivi suddivisi in 4 stecche ciascuna da 8 moduli. Le batterie di filtri a carbone sono monitorate da strumenti in continuo che tengono costantemente sotto controllo i seguenti parametri: torbidità, TOC (*Total Organic Carbon*), SAC 254 (la sonda misura il coefficiente di assorbimento spettrale a 254 nm, una misura indiretta del contenuto di sostanze organiche nei fluidi), clorito, potenziale *redox* e ammoniaca.



Figura 13. Filtri GAC/BAC dell'impianto della Standiana.

L'impianto della Standiana è un impianto in cui non viene sprecata neanche una goccia d'acqua. Anche l'acqua che deriva dagli ispessitori, infatti, viene reimpressa in testa all'impianto. Si producono in media dalle 1500 alle 1800 tonnellate di fango/anno su 15 milioni di m³ d'acqua prodotti. ^(standiana)

3.4 Impianto Bassette (Ravenna)

L'impianto delle Bassette è stato costruito alla fine degli anni '60 nella Zona Industriale di Ravenna in prossimità di Porto Corsini, con lo scopo di rimediare alla carenza idrica del territorio ravennate. In questo impianto avviene il trattamento delle acque provenienti dai fiumi Lamone e Reno. Ha una potenzialità di produzione media di 1300 L/s. L'acqua in ingresso all'impianto viene sottoposta a grigliatura per trattenere i solidi grossolani non sedimentabili (rami, foglie, stracci, plastica, ecc.) e i solidi grossolani sedimentabili (ghiaia, ecc.).

L'areazione (figura 14) invece aumenta il tenore di ossigeno disciolto mentre la pre-clorazione con biossido di cloro è propedeutica all'ossidazione della sostanza organica oltre che a diminuire il tenore di carica batterica.



Figura 14. Acqua sottoposta ad areazione nell'impianto Bassette.

L'acqua transita successivamente in due decantatori. Nel primo decantatore viene immesso carbone in polvere, per adsorbire la sostanza organica senza l'aggiunta di ulteriori reagenti chimici, nel secondo decantatore viene aggiunto il flocculante (PAC). In figura 15 sono mostrati dei decantatori (A), cilindri costituiti da una struttura a raggiera dove transita l'acqua all'interno e quella pulita viene espulsa attraverso dei fori (B) e finisce nella vasca di clorazione, mentre all'interno i fiocchi vanno nella linea dei fanghi.

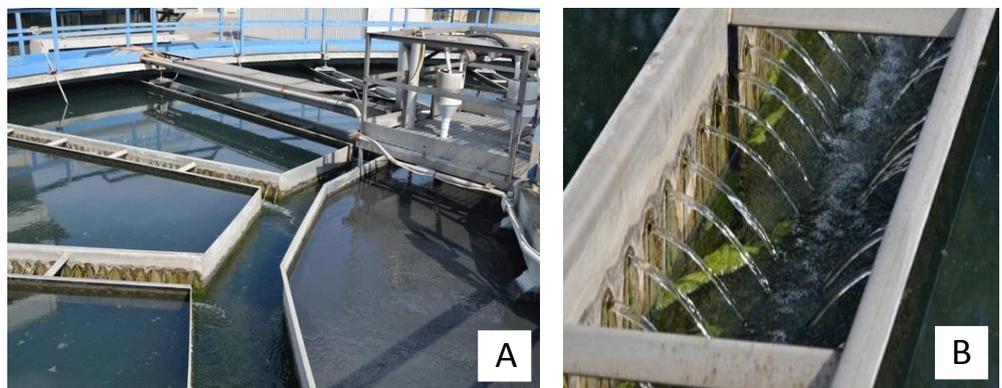


Figura 15. Decantatori (A) e fuoriuscita di acqua pulita (B) nell'impianto NIP.

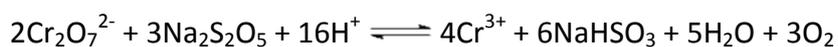
L'acqua viene sottoposta poi a clorazione per un tempo pari a due ore, rimescolata con agitatori, con lo scopo di garantire la massima resa di disinfezione. L'acqua entra in una vasca ad "L" dove presenta una torbidità compresa tra 10 e 200 N.T.U. (Unità di Torbidità Nefelometrica); è con il successivo passaggio ai decantatori che la torbidità scende a valori compresi tra 1 e 2 N.T.U., per passare poi ai filtri a sabbia dove si ha un'ulteriore diminuzione dello stesso parametro a valori compresi tra 0.1 e 0.3 N.T.U. . I filtri hanno sezione rettangolare e sono riempiti con 90 cm di sabbia con granulometria media di 0.5 mm.

L'acqua transita poi in 30 filtri a carbone, suddivisi in 6 gruppi da 5 ciascuno, i quali attraverso un processo unicamente fisico di adsorbimento da parte della superficie del carbone permettono di abbattere cloro in eccesso e odori. Attualmente l'azienda sfrutta il vapore prodotto dalle aziende vicine per operare in loco una parziale rigenerazione del carbone con temperature comprese tra i 100 e i 110 °C. Tale processo permette di prolungare l'utilizzo del carbone prima della sua rigenerazione completa. ^(bassette)

3.5 Modalità di abbattimento del cromo nelle acque

Per l'eliminazione del cromo nelle acque si possono utilizzare varie tecniche tra cui la rimozione con resine a scambio ionico, osmosi inversa, adsorbimento su filtri, etc. La tecnica che si è dimostrata più efficiente e sostenibile in termine di costi è il processo che si basa sulla riduzione del Cr (VI) a Cr (III) e successiva precipitazione di quest'ultimo con l'aggiunta di opportuni reagenti.

Metasolfito e bisolfito di sodio possono essere utilizzati previa correzione del pH (valori pari a 2). Essi necessitano di vasche nelle quali l'acqua transita per avere un tempo di contatto minimo affinché avvenga la riduzione a Cr (III) e successivo dosaggio di coagulante per far aggregare i precipitati. La reazione che avviene è la seguente:



Un'alternativa per l'eliminazione del cromo si basa sull'utilizzo di idrogeno, come specificato nella reazione sotto riportata, e anche in questo caso necessita di essere seguita dal dosaggio di un coagulante per aggregare il precipitato di Cr (III).



Infine, anche il solfato ferroso può essere utilizzato per l'eliminazione del cromo e in questo caso non vi è la necessità di correggere il pH, né di aggiungere un coagulante. ^(Tomasoni, 2014)



3.6 Metodi analitici in uso per la speciazione del cromo nelle acque

La determinazione del cromo esavalente nelle acque potabili si basa sulle norme italiane UNI EN ISO 18412:2006 e 23913:2009 che richiedono rispettivamente l'utilizzo di un metodo fotometrico e di uno che prevede l'analisi di flusso accoppiata alla rilevazione spettrofotometrica. Il primo metodo è utilizzabile solo in caso di acque poco contaminate con concentrazioni di Cr(VI) comprese tra 2 e 50 µg/L, mentre il secondo con l'impiego di CFA (*Continuous Flow Analysis*), permette di analizzare concentrazioni maggiori comprese tra 2 e 200 µg/L di Cr (VI). Questi metodi possono essere applicati anche alle acque di falda, superficiali, eluati e di scarico variando opportunamente le condizioni operative. ^{(ISO 23913:2009), (ISO}

^{18412:2006)} La speciazione del cromo può essere fatta anche seguendo la metodica americana 218.7 EPA (*United States Environmental Protection Agency*) che prevede l'utilizzo di cromatografia a scambio anionico con derivatizzazione post colonna mediante 1,5- difenilcarbazide e rilevazione spettroscopica UV-VIS a lunghezza d'onda di 530 nm. ^(EPA 218.7)

4 CAMPIONAMENTO

I Rapporti Istisan 07/31 “Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.lgs. 31/2001. Metodi chimici” - Prelievo e conservazione dei campioni ISS.PGA.901. rev00”, definiscono il metodo di campionamento utilizzato per la raccolta e la conservazione dei campioni.

I campioni vengono acidificati con acido nitrico fino a pH < 2. (Ottaviani 2007), (Rapporti 2001), (APAT CNR-IRSA), (Unichim), (APHA)

4.1 Metodica di riferimento per la speciazione del cromo in HPLC-ICP-MS

Il riferimento da cui si è partiti per la messa a punto del metodo di quantificazione del cromo trivalente ed esavalente è quello certificato dall’azienda Agilent Technologies “Speciazione Cr(III) e Cr(VI)” che prevede l’impiego di una cromatografia liquida accoppiata ad una spettrometria di massa (HPLC-ICP-MS). In tabella 1 è mostrato il *set up* relativo all’HPLC (in verde) e all’ICP-MS (in giallo). (Agilent Handbook)

Tabella 1. *Set up* relativo ad HPLC e ICP-MS.

ICP-MS	
Parametri	Valori
Strumentali	
Potenza della RF	1450÷1550W
Flusso gas plasma (Ar)	15 L/min
Flusso gas nebulizzatore	1.05 mL/min
Flusso gas ausiliario	1.0 mL/min
Gas per CID	He
Analitici	
Masse selezionate	52 (Cr), 53 (Cr), 59 (Co)
Masse dello standard interno	209 (Bi), 72 (Ge), 115 (In), 117 (Li), 163 (Li), 51 (Sc), 159 (Tb), 89 (Y)
Masse della soluzione di tuning	58 (Ce), 59 (Co), 7 (Li), 205 (Ti), 89 (Y)
Acquisizioni	
Modalità di rilevazione	Conteggi Ioni
Punti per picco	3
Tempo di acquisizione in campione	4 min
Ossidi	inferiori
Doppie cariche	inferiori

HPLC	
Parametri	Valori
Strumentali	
Colonna	Resina a scambio ionico (G3268A) in PEEK; dimensioni 4.6mm x 300mm
Flusso max di operatività	1.5 mL/min
Temperatura max di operatività	40°C
Condizionamento della colonna	almeno 3 ore a 0.3 mL/min; per campioni con cromo $10 \mu\text{g/L}$ il flusso deve essere $0.8 \div 1.5 \text{ mL/min}$
Portata del campione	100 μL
Fase mobile	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba) $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$; Na_2SO_4 (VWR Chemicals) $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; EDTA-2Na (Carlo Erba) $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; flusso 0.2 mL/min
Pre-trattamento del campione	Complessazione a gnomaria con EDTA (0.1 M) per 3 ore a 40°C; pH 5
Analitici	
Masse selezionate	52 (Cr)
Acquisizione dati	
Modalità di rilevazione	Conteggio Ioni
Punti per picco	3
Tempo totale della corsa cromatografica	5 min
Tempo di ritenzione Cr(III)	1 min
Tempo di ritenzione Cr(VI)	2.5 min

Partendo da questa metodica, con gli obiettivi di quantificare concentrazioni di cromo fino a $1 \mu\text{g/L}$ e ottimizzare la qualità dei risultati forniti, si è deciso di modificare i seguenti parametri relativi al pretrattamento dei campioni e al *set-up* strumentale in HPLC e ICP-MS: temperatura di complessazione dei campioni con EDTA, concentrazione dei sali della fase mobile, flusso e tempo di condizionamento della colonna cromatografica, tempo totale della corsa cromatografica. L'ottimizzazione è descritta nel paragrafo "Messa a punto della metodica per la speciazione del cromo in HPLC-ICP-MS" all'interno della sezione Materiali e Metodi.

4.1.1 Complessazione del cromo trivalente con EDTA

L'EDTA (acido etilendiamminicotetraacetico), acido carbossilico viene utilizzato per complessare il cromo trivalente perché in grado di chelare i

metalli e può essere utilizzato in un ampio *range* di pH. (Schwarzenbach, 1957) Lo *step* limitante della reazione Cr(III)-EDTA è l'entrata dell'EDTA nella sfera di idratazione del cromato. Durante questo processo sia il cromato che l'EDTA esistono in diverse forme chimiche in relazione al pH. In questo lavoro di tesi le condizioni di pH sono comprese tra 5.5 e 7 e in questo intervallo le forme predominanti sono: $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{+2}$ e HEDTA^{3-} . Durante la reazione si ha la formazione di molti intermedi di reazione con diversi gradi di idratazione e protonazione, la perdita d'acqua porta al passaggio finale con formazione del complesso stabile $[\text{CrEDTA}]^-$ (figura 1). (Cerar, 2015)

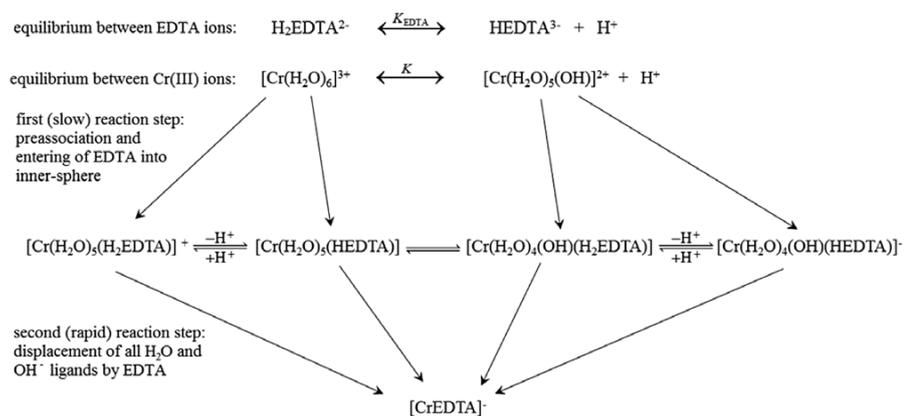


Figura 1. Reazione di formazione di intermedi e del complesso stabile $[\text{CrEDTA}]^-$ a seguito della reazione tra Cr (III) ed EDTA. (Cerar, 2015)

5 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che trova applicazione in svariati ambiti: chimico, farmaceutico, biochimico e clinico. Permette di effettuare analisi qualitative e quantitative di sostanze specifiche contenute all'interno di un campione. Essa si basa sulla separazione dei diversi ioni presenti nel campione sulla base del diverso rapporto massa carica (m/z). La strumentazione è costituita da una sorgente che ha come scopo quello di ionizzare il campione, da un analizzatore che discrimina gli ioni in base al rapporto massa carica (m/z) e da un rivelatore che permette di registrare il segnale prodotto dalla corrente ionica. Nel caso in cui la massa sia accoppiata ad una cromatografia liquida si può effettuare la separazione di diversi composti presenti nel campione e aventi rapporto m/z uguale e quindi non quantificabile solo con la massa.

5.1 HPLC

Per la speciazione del cromo si utilizza un HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) 1260 Infinity Agilent Technologies (figura 2) accoppiato ad un'ICP-MS. La cromatografia liquida è una tecnica analitica che permette la separazione di composti aventi massa uguale, mediante l'utilizzo di una fase mobile che trasporta il campione all'interno di una colonna cromatografica.

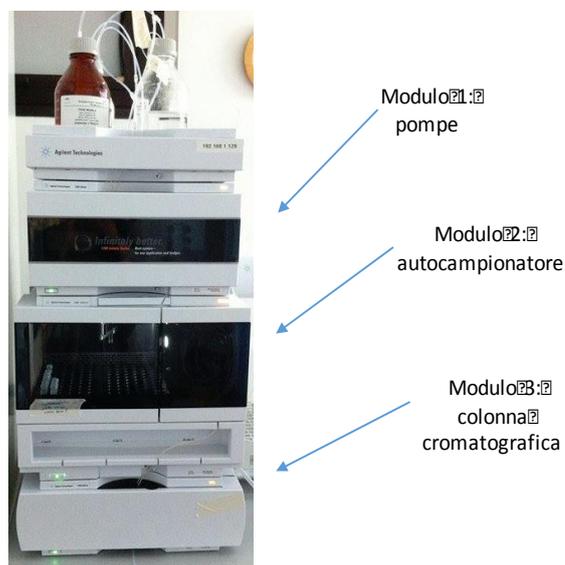


Figura 2. Strumento analitico HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) a tre moduli.

5.2 ICP-MS

Lo strumento utilizzato per le analisi in spettrometria di massa è l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) 7800 Agilent, mostrato in figura 3. Presenta come vantaggi quelli di analizzare dai 20 ai 30 elementi in contemporanea in pochi minuti, di ottimizzare dinamicamente il *range* di diluizione, di utilizzare standard interni e di poter sottrarre i bianchi dallo spettro.

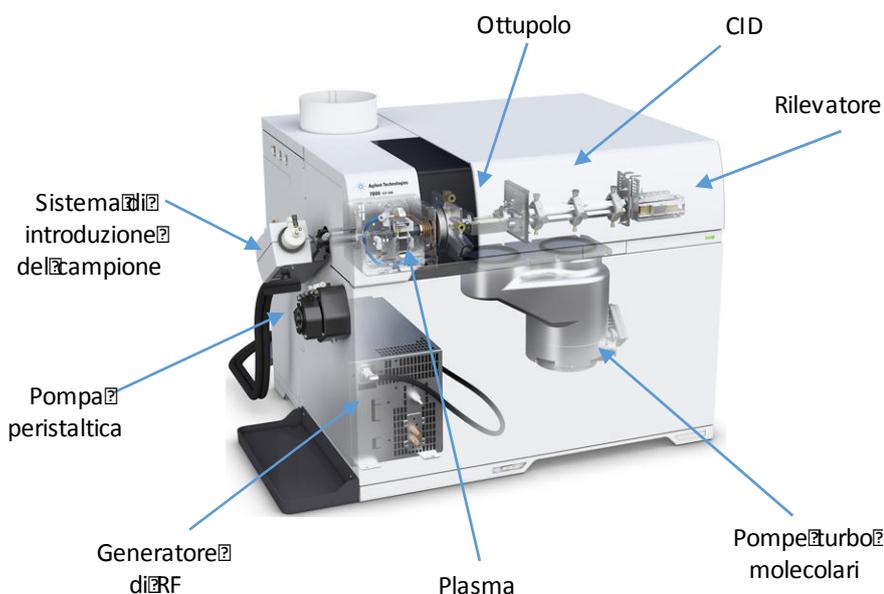


Figura 3. Strumento analitico ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

5.2.1 Sorgente

La sorgente è una torcia plasma accoppiata induttivamente (figura 4) denominata anche ICP (*Inductively Coupled Plasma*), dove il plasma viene prodotto a pressione atmosferica, mediante l'utilizzo di bobine magnetiche. Nel plasma gli ioni e gli elettroni ionizzati, vengono accelerati andando a ionizzare gli atomi di argon e successivamente il campione.

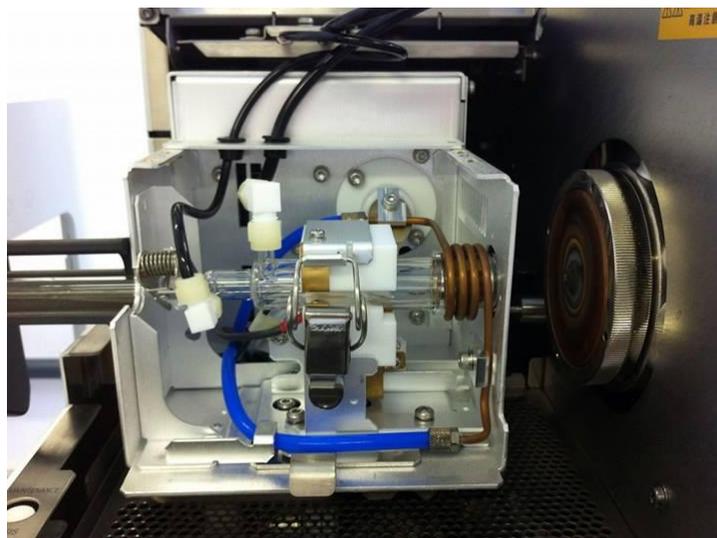


Figura 4. Torcia al plasma.

Il campione allo stato liquido viene introdotto come uno spray e trasportato all'interno del plasma caldo, con generazione di vapore, aerosol fine e micro particolato, immesso nel tubo al quarzo centrale con flussi di circa 11 L/min^{-1} . Le alte temperature desolvatano, vaporizzano e atomizzano il campione con grande efficienza.

Gli ioni vengono convogliati poi nell'analizzatore di massa, attraverso un'interfaccia costituita da due coni (figura 5) che permettono di focalizzare il fascio ionico e convogliarlo. La separazione degli ioni sulla base del rapporto massa su carica avviene in condizioni di vuoto molto spinto, creato mediante pompe turbo molecolari.



Figura 5. Interfaccia costituita da due coni.

Solitamente i flussi utilizzati per l'immissione del campione sono ottenuti mediante l'utilizzo di una pompa peristaltica, con valori pari a circa 1 mL/min. (Gray, 1985), (Zoorob, 1998), (Hill, 1990)

5.2.2 Analizzatore

Gli ioni dopo essere stati prodotti dalla sorgente vengono indirizzati all'analizzatore, il quale ha come scopo quello di separarli in base al rapporto m/z sfruttando un campo elettrico in condizioni di alto vuoto. Lavorare nel vuoto permette di diminuire le interferenze analitiche generate dalle molecole di gas atmosferico. (Stoppini, 2012)

I parametri più importanti in uno spettrometro di massa sono: la *risoluzione* cioè la capacità che ha un analizzatore di separare due ioni con m/z simili, l'*accuratezza* che indica la precisione dello strumento nel rilevare la massa dell'analita e la *sensibilità* che è la quantità minima di analita che lo strumento è in grado di rilevare. (chromacademy)

L'analizzatore utilizzato è un ottupolo (figura 6), il cui meccanismo di funzionamento è riconducibile ad un quadrupolo, il quale è in grado di separare gli ioni in base al rapporto m/z grazie ad un campo elettrico oscillante. L'ottupolo è formato da otto barre parallele a sezione circolare o iperbolica a cui viene applicato un potenziale RF (Radiofrequenza) con polarità alternata da una barra alla successiva. In questo modo si crea un campo elettrico in grado di direzionare il fascio ionico lungo l'asse centrale dell'ottupolo e contemporaneamente mantenerlo focalizzato nelle due dimensioni trasversali. La formula che descrive il potenziale (U) è descritto dalla seguente formula seguente:

$$U(r) = n^2 z^2 e^2 V^2 / (4m r_0^2 \omega^2) (r/r_0)^{2n-2}$$

Dove z e m rappresentano rispettivamente la carica e la massa dello ione, V il voltaggio, ω è la velocità angolare, r è la distanza radiale dal centro delle barre mentre r_0 è la distanza interna tra le barre, n è il numero di coppie di barre che per l'ottupolo è pari a 4.

L'ottupolo a differenza del quadrupolo può essere usato solo per la trasmissione ionica, ha una capacità di focalizzazione leggermente più bassa di quella del quadrupolo, ma è in grado di trasmettere simultaneamente ioni all'interno di un *range* di massa più ampio.

Gli ioni nell'attraversare l'ottupolo assumono una traiettoria oscillante in base al rapporto m/z selezionato, e regolando l'intensità del campo elettrico si può decidere in quale *range* lavorare. Gli ioni selezionati passeranno tra le barre senza collidere e arriveranno all'analizzatore dove verranno quantificati, mentre gli ioni di non interesse finiranno per collidere sulle barre non giungendo all'analizzatore. ^(Hoffmann, 2007)

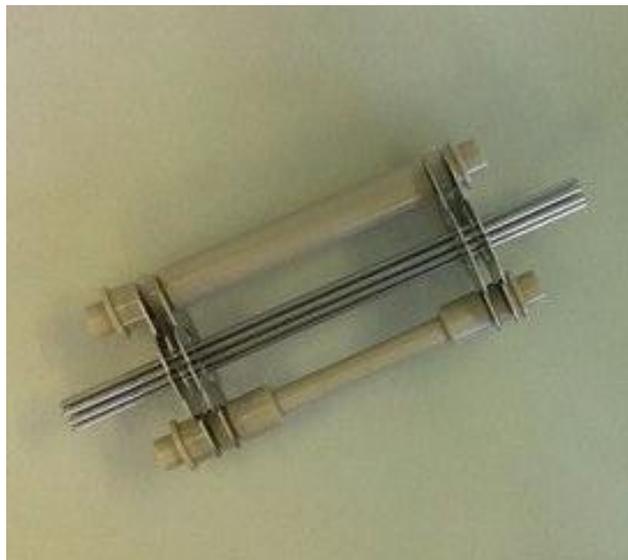


Figura 6. Analizzatore di massa ad ottupolo.

5.2.3 Rivelatore

Gli ioni scelti sulla base del rapporto m/z dopo aver attraversato l'analizzatore giungono al rivelatore, dove vi è la neutralizzazione della carica degli ioni su una superficie con trasferimento di elettroni che generano un flusso di corrente. L'intensità della corrente prodotta è proporzionale all'abbondanza degli ioni. Il segnale viene rilevato e registrato grazie ad un meccanismo di amplificazione e conversione della corrente. Risultato finale di tale processo è uno spettro di massa nel quale in ascissa

sono riportati i diversi tipi di ioni sulla base del rapporto m/z e in ordinata l'intensità del segnale. (Stoppini, 2012)

6 MATERIALI E METODI

6.1 Messa appunto della metodica per la speciazione del cromo in HPLC-ICP-MS

Come precedentemente accennato nell'introduzione, l'analisi HPLC-ICP-MS è stata messa a punto durante l'internato di tesi al fine di ottimizzare la risoluzione dei dati di quantificazione ottenuti e migliorare l'efficienza di quantificazione del cromo fino a rilevare livelli di 0.1 µg/L.

La fase mobile (FM) utilizzata è costituita da $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 mM, EDTA-2Na 5 mM, e Na_2SO_4 la cui concentrazione è stata però variata da 2.5 mM in quanto si è notato un miglioramento nella stabilità della linea di base. Anche l'ottimizzazione del condizionamento della colonna cromatografica si è rivelato essenziale per il miglioramento della sensibilità dell'analisi. In particolare, si è deciso di lavorare in modalità isocratica, condizionando la colonna per la speciazione del Cr (III) e del Cr (VI) per 8 ore a flusso di 0.4 mL/min solo al primo utilizzo, in quanto dopo circa 3 ore si è notato un netto peggioramento della stabilità della linea di base che si è riflessa in un aumento del rumore di fondo che è andato a coprire il segnale prodotto dagli analiti dei campioni in esame, viste le loro basse concentrazioni. Il condizionamento della colonna viene fatto prima dell'analisi di ciascun il *batch*, per un tempo compreso tra i 30 e i 60 min con un flusso della fase mobile di 0.4 mL/min che risulta essere inferiore rispetto a quello consigliato dall'Agilent Technologies pari a 0.8÷1.5 mL/min. Questo ha permesso di stabilizzare la linea di base e diminuire notevolmente il rumore di fondo permettendo di quantificare campioni le cui concentrazioni si trovano in prossimità del LOQ (Limite di Quantificazione). Lavorando ad un flusso minore, a parità di volume iniettato (100 µL) si ha l'aumento del tempo totale della corsa da 5 a 7 min con picchi di Cr (III) e Cr (VI) ben visibili e risolti rispettivamente a 2.0 e 5.5 min. Un aumento della durata della corsa cromatografica implica da un lato un maggior tempo previsto per effettuare le analisi, aspetto che potrebbe risultare svantaggioso, ma dall'altro permette di quantificare il cromo esavalente fino a concentrazioni

dieci volte inferiori rispetto a quelle previste dal metodo e dal limite di legge pari a 10 µ/L. Lavorando a parità di volume iniettato e con flussi minori rispetto a quelli previsti dall'Agilent non è stato necessario modificare la velocità della pompa peristaltica dell'ICP-MS che permette il defluire della soluzione in eccesso nello scarico dopo essere passata dal sistema di introduzione del campione alla camera di nebulizzazione. Nel caso in cui si dovesse lavorare con volumi d'iniezione dei campioni e flussi maggiori, questi parametri strumentali dovranno essere modificati altrimenti si incorre nel rischio di riempire la camera di nebulizzazione con la soluzione del campione iniettato in ICP-MS, con il conseguente spegnimento del plasma, il quale pur lavorando ad alte temperature non riesce a far evaporare velocemente tutta la soluzione acquosa. Questo fenomeno porta a danni all'ICP-MS che poi per poter essere riutilizzato necessita di varie fasi consecutive di accensione-spegnimento della torcia con costi connessi al consumo di gas (Ar) necessario alla produzione del plasma oltre al tempo sprecato per mancata operatività.

6.1.1 Soluzioni di calibrazione per l'HPLC

Gli standard per la retta di taratura in HPLC si preparano a partire da due soluzioni a 10 mg/L di Cr (III)-EDTA e di Cr (VI), dalle quali si fa una soluzione a 100 µg/L di Cr (III)-EDTA-2Na/Cr (VI) e da questa, per diluizione, una madre a 10 µg/L e i relativi standard di Cr (III) -EDTA-2Na/ Cr (VI) a 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 e 3.0 µg/L. Il pH degli standard deve essere compreso tra 6 e 7, altrimenti lo si aggiusta con LiOH (1 M); nel nostro caso non è stato necessario. Queste soluzioni si conservano per 3 mesi refrigerate a 5 °C in bottiglie in polietilene da 100 mL dotate di contro-tappo e tappo a vite.

6.1.2 Soluzioni di calibrazione per i metalli per l'ICP-MS

Per costruire la retta di taratura in ICP-MS dei metalli Fe, Mn, Al e As si parte da una soluzione madre multielemento (ICUS 3888 dell'ULTRA Scientific) a concentrazione 100 µg/mL dove per diluizione si preparano gli

standard a 10, 25, 50, 100 e 200 µg/L, i quali conservati hanno la stessa durata degli standard per la cromatografia.

6.1.3 Soluzioni di calibrazione per il cromo totale per l'ICP-MS

Per il cromo totale la soluzione madre a 10 µg/L viene fatta a partire da due soluzioni a 1000 µg/mL (Chem-Lab) di Cr (III) e Cr (VI), dalle quali per diluizione si fanno gli standard a 0.1, 0.5, 1.0, 0.25, 5 e 10 µg/L. Le soluzioni hanno lo stesso tempo di conservazione di quelle per la cromatografia e i metalli sopra citati.

7 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

7.1 HPLC-ICP-MS

La preparazione dei campioni da analizzare in HPLC-ICP-MS prevede il trattamento dei campioni con l'EDTA a bagnomaria. Lo scopo è quello di fare complessare il Cr (III) ottenendo il complesso Cr (III)-EDTA al fine di separarlo in modo distinto dal Cr (VI).

Si mettono 10 mL di campione nelle *vial* termoresistenti da 15 mL (WR Chemicals), ai quali vengono aggiunti 500 μ L di EDTA-2Na (0.1 M Carlo Erba) e 500 μ L di LiOH (0.1 M Merck). Si verifica con una cartina tornasole che il pH sia circa 7, in caso contrario lo si aggiusta con LiOH (0.1 M). Si mettono le provette nel bagno termostatico (Julabo) per un tempo di 3 ore a temperatura di 90 °C in modo tale che il Cr (III) sia completamente complessato con l'EDTA (Cr (III)-EDTA). Trascorso tale tempo si tolgono le *vial* dal bagnomaria e si fanno raffreddare a temperatura ambiente.

Si trasferisce 1mL di campione in una *vial* in polipropilene (Agilent), si chiude con il tappo e si analizza con HPLC sfruttando il rivelatore dell'ICP-MS. Se non vengono utilizzati subito, i campioni si possono conservare in frigorifero a 4 °C per alcune settimane.

7.2 ICP-MS

Per analizzare i metalli e il cromo totale in ICP-MS si pre-trattano 10 mL di campione in *vial* in polipropilene Agilent da 15 mL acidificandoli con 100 μ L di HNO₃ 1 M (67÷69 % Carlo Erba) per circa 1 ora.

8 MODALITA' OPERATIVE PER LE ANALISI

8.1 Speciazione del cromo trivalente ed esavalente con HPLC-ICP-MS

I campioni analizzati in HPLC-ICP-MS vengono iniettati in modo automatico nell'HPLC, per essere poi separati in modalità isocratica utilizzando una colonna (Agilent G3268A) per la speciazione del cromo trivalente ed esavalente, rivestita in PEEK e costituita internamente da una resina basica idrofilica polimetacrilata a scambio anionico, ha una grandezza di 4.6 mm X 30 mm i.d., il flusso, la pressione e temperatura massima di lavoro sono rispettivamente pari a 1.5 mL/min, 9.8 MPa e 40 °C. La fase mobile (FM) utilizzata contiene gli stessi reagenti previsti dalla metodica ufficiale con le seguenti modifiche in concentrazione: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 mM (Carlo Erba), Na_2SO_4 2.5 mM (VWR Chemicals) e EDTA-2Na 5 mM (Carlo Erba); aggiustata a pH 7 con LiOH (1 M Merck). Il settaggio strumentale dell'HPLC utilizzato prevede un flusso della fase mobile pari a 0.4 mL/min, la colonna lavora a 25 °C, il volume di iniezione è pari a 100 µg/L, il tempo della corsa totale è di 7 min. Il *set-up* in massa prevede l'utilizzo di una radiofrequenza tra i 1450 e i 1550 W, un tempo di acquisizione di 240 s, un flusso di argon per formare il plasma di 15 L/min, quello del gas ausiliario e di quello di trasporto rispettivamente di 1.0 e 1.05 L/min.

La soluzione di lavaggio dell'ago e della linea è costituita dall'1 % di HNO_3 (67÷69 % Carlo Erba) e dal 3 % di HCl (1 M VWR Chemicals).

Prima di procedere alle analisi si condiziona la colonna facendo fluire la fase mobile a 0.4 mL/min per 30 minuti. Come *software* si utilizzano "Agilent Lab Advisor" e "MassHunter". Lo strumento effettua lo *start-up* iniziale utilizzando i seguenti parametri: *torch axis*, *EM*, *plasma correction*, *standard lens tune*, *resolution/axis* e *performance report*.

Al termine dello *start-up*, si fa leggere la soluzione di *tuning* (Agilent diluita 1:1000, contenente Ce, Co, Li, Tl, Y) che permette di controllare i conteggi, gli ossidi e le doppie cariche (inferiori a secondo gli *standard* aziendali). Se

questi parametri vengono rispettati si procede caricando nel metodo la sequenza dei campioni da analizzare dove vengono inseriti una calibrazione, i campioni e un controllo (1.0 µg/L) ogni 20 campioni.

I picchi dei cromatogrammi relativi al Cr (III) e al Cr (VI) ottenuti dalle analisi vengono integrati e riprocessati dalla versione *offline del software MassHunter*.

8.2 Quality Control

Dopo aver effettuato lo *start-up*, viene eseguita la lettura di una soluzione di *tuning* (Agilent part number 5188-6564 contiene analiti tutti a 10 µg/mL in un volume totale di 100mL) diluita 1:10 (Agilent contenente Ce, Co, Li, Tl, Y e stabilizzata con 2% HNO₃) dove e si controllano conteggi, ossidi e doppie cariche (inferiori a 2). Si carica la sequenza relativa al metodo di interesse che prevede una calibrazione, i campioni e un controllo (*Certified Reference Material* TM-23.4 dell'Environment Canada) ogni 20 campioni. La matrice certificata TM-23.4 fornisce un valido elemento di confronto dei dati ottenuti dal laboratorio relativi ad alluminio, arsenico, ferro, manganese e cromo con concentrazioni dichiarate nel certificato rispettivamente pari a (94.3±9.3) µg/L di Al, (8.1±0.6) µg/L di As, (14.7±2.4) µg/L di Fe, (8.8±0.6) µg/L di Mn e (6.8±0.6) µg/L di Cr.

I dati relativi ai metalli (Fe, Mn, Al, As) e al cromo totale vengono analizzati e riprocessati *offline* mediante l'utilizzo del software "*MassHunter*".

8.3 Incertezza Estesa

Le Linee guida per il calcolo dell'incertezza di misura UNI ENV 13005 riportano la seguente definizione per incertezza estesa: "grandezza che definisce intorno al risultato di misurazione, un intervallo che si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione dei valori ragionevolmente attribuiti al misurando". (Linee guida incertezza)

Si è deciso di utilizzare il Metodo Metrologico o comunemente detto "*Bottom-Up*" che risulta essere il più rigoroso tra le varie tipologie di metodi proposti in quanto tiene conto di tutti i contributi possibili (fisici, chimici e

microbiologici) che concorrono alla grandezza denominata incertezza estesa.

Mediante elaborazione matematica, si è potuto calcolare tale grandezza tenendo conto dell'incertezza derivante dalla ripetibilità, dall'errore associato alle diluizioni sequenziali della soluzione iniziale di cromo, dal contributo della taratura strumentale a quella associata al risultato medio delle prove eseguite.

8.3.1 Incertezza del cromo totale

Prima di procedere con il calcolo dell'incertezza si deve valutare il tipo di regressione da utilizzare, operazione che viene fatta mediante la costruzione della retta di taratura, che in caso di regressione lineare, viene calcolata in automatico insieme agli scarti tipo dei residui ($s_{y/x}$).

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (y_{i_per} - y_{i_stimato})^2}{n-2}}$$

dove y_{i_per} è il segnale ottenuto sperimentalmente dalla lettura del materiale di riferimento, $y_{i_stimato}$ è il segnale ricavato dalla retta di taratura per ciascuna concentrazione del materiale di riferimento e n sono il numero dei punti con cui è stata costruita la retta di taratura.

Per il calcolo dell'incertezza dovuta alla retta di taratura (s_{tar}) si applica la seguente formula:

$$s_{tar} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{(x_i - \bar{x}_{reg})^2}{\sum (x_{reg} - \bar{x}_{reg})^2}}$$

dove $s_{y/x}$ è lo scarto tipo dei residui, y_i il segnale del campione per il quale si vuole calcolare l'incertezza, x_i la concentrazione dei livelli utilizzati per costruire la curva di taratura, \bar{y}_{reg} è il valore medio dei segnali ottenuti nella costruzione della retta di taratura, \bar{x}_{reg} il valore medio delle concentrazioni utilizzate per costruire la retta di taratura, b la pendenza della retta di taratura, n il numero di punti utilizzati per la curva di taratura e m il numero di repliche per il campione incognito.

Dai valori sopra ottenuti si calcola l'incertezza associata alla taratura strumentale $u_{tar}(x_m)$ e il corrispondente valore relativo $\bar{u}_{tar}(x_m)$ come segue.

$$u_{tar}(x_m) = \sqrt{\frac{\sum a_i^2}{N}}$$

$$\bar{u}_{tar}(x_m) = \frac{u_{tar}(x_m)}{x_m}$$

Dove con N si intendono il numero di repliche effettuate sul campione.

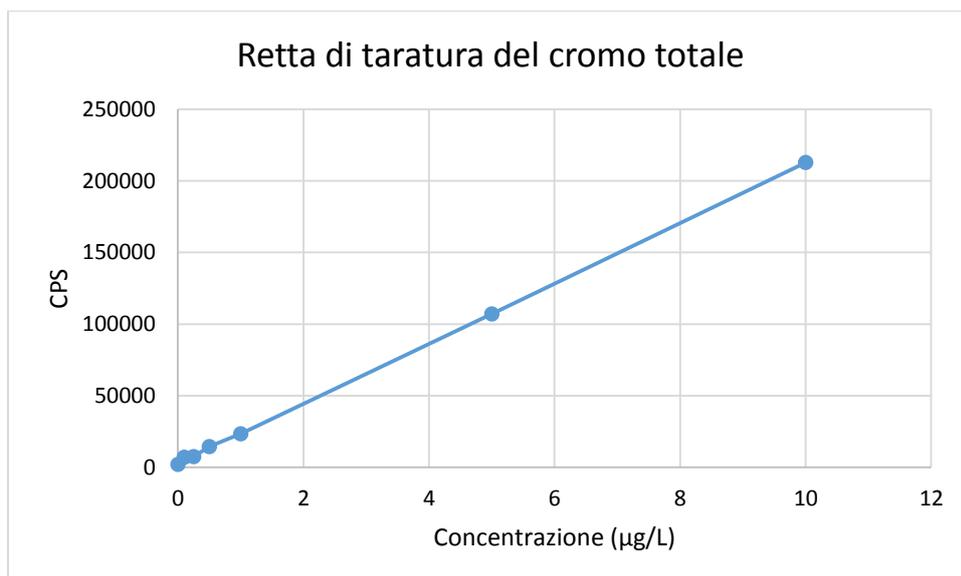
Generalmente, nell'esecuzione dei metodi di prova si effettua il controllo intermedio della curva di taratura, applicando un criterio di accettabilità superiore all'incertezza di taratura associata al livello di concentrazione stabilito. Nell'incertezza composta da associare alla prova si dovrà considerare oltre all'incertezza teorica di taratura anche il contributo dato dal criterio di accettabilità percentuale del controllo (ad es. 15%), dividendolo per cento e per il fattore di copertura utilizzato (ad es. 2) se tale criterio è stato determinato per via sperimentale o per la radice quadrata di 3, considerando una distribuzione rettangolare equiprobabile, nel caso in cui tale criterio sia stato stabilito a priori.

I dati relativi alla retta di taratura del cromo totale, sono visibili in tabella 1 e in figura 1, dove X sono le concentrazioni degli standard espressi in µg/L, Y sono i corrispondenti valori restituiti dallo strumento espressi come conteggi da parte dell'elettromoltiplicatore (CPS).

Tabella 1. Dati relativi alla retta di taratura del cromo totale.

X	Y	Y _{calcolato}
0	2025	3,05E+03
0,1	7003	5,14E+03
0,25	7443	8,28E+03
0,5	14460	1,35E+04
1,0	23374	2,40E+04
5,0	107089	1,08E+05
10,0	212877	2,13E+05

Figura 1. Retta di taratura del cromo totale.



La linearità è stata verificata con il test di Mendel e l'equazione della retta è stata ottenuta applicando i minimi quadrati come segue.

$$y = 2.09 \cdot 10^4 x + 3.05 \cdot 10^3$$

Il coefficiente di correlazione (r) e quello di determinazione (R^2) sono rispettivamente pari a 0.9999 e 0.99981, indici di dati accettabili perché soddisfano i requisiti imposti dal laboratorio di ottenere valori di R^2 superiori a 0.99.

L'incertezza (U) associata agli standard (X) della retta di taratura del cromo totale, in tabella 2, è calcolata come sopra indicato. La U associata agli standard presenta andamento inversamente proporzionale alla concentrazione degli stessi, dove con valori di 0.1 e 10.0 µg/L sono rispettivamente pari a 0.3 e 0.008. La quantificazione del cromo totale risulta essere accettabile con concentrazioni misurate superiori o uguali a 0.5 µg/L e incertezza associata inferiore a 0.1 µg/L, in caso di concentrazioni inferiori l' U risulta essere troppo elevata e il dato non attendibile.

Tabella 2. Incertezza relativa (U) agli standard di taratura del cromo totale a diverse concentrazioni (X).

X	U _{taratura}
0	-
0,1	0,3
0,25	0,3
0,5	0,1
1,0	0,06
5,0	0,01
10,0	0,008

Il metodo utilizzato per la determinazione del cromo totale in ICP-MS segue l'ISO 17294-2 e i dati di precisione concernenti il cromo sono mostrati in tabella 3. (ISO 17294-2:2003)

Tabella 3. Dati di riproducibilità e ripetibilità del cromo totale.

Elemento	X _{medio}	σ_R	Riproducibilità ² CV%	σ_R	Ripetibilità ² CV%
Cr	3,39	0,634	18,7	0,294	8,7

Il metodo normalizzato contiene i dati di ripetibilità e riproducibilità pertanto è possibile calcolare l'incertezza di misura utilizzando lo scarto tipo di riproducibilità del metodo, dopo aver preliminarmente verificato la capacità del laboratorio di eseguire la prova con una ripetibilità statisticamente confrontabile con quella del metodo (servono almeno 10 prove ripetute a livelli di concentrazione prossimi a quelli del metodo). I risultati sperimentali sono trattati statisticamente mediante test di normalità di Shapiro-Wilk ed eventuali test di Dixon, Grubbs e Huber per eliminare dati anomali o sospetti. Si verifica che il rapporto tra lo scarto tipo di ripetibilità (s_r) sperimentale e quello dichiarato dal metodo normato (σ_r) cada entro i limiti sotto riportati, in funzione dei gradi di libertà:

$$A \leq s_r/\sigma_r \leq B$$

Tuttavia in questo caso, il metodo normalizzato riporta il coefficiente di variazione percentuale (CV %), pertanto il confronto si fa con questo parametro, ricavando il CV% sperimentale, dividendo lo scarto tipo s_r per il valore medio delle prove ripetute e moltiplicando per 100.

In tabella 4 sono riportate le prove di ripetibilità eseguite sulle concentrazioni 0,1 µg/L; 1,0 µg/L e 5,0 µg/L.

La scelta di eseguire prove di ripetibilità a 0,1 µg/L serve per verificare la

performance dello strumento a concentrazioni molto basse; mentre i valori a 1,0 e a 5,0 µg/L che hanno come scopo quello di verificare la conformità ai valori di precisione del metodo.

Tabella 4. Prove di ripetibilità relative al cromo totale eseguite a diverse concentrazioni (µg/L).

	Livelli		
	1	2	3
Valore atteso (µg/L)	0,100	1,000	5,000
Valori (µg/L)	0,121	0,984	5,140
	0,133	0,973	5,031
	0,149	0,975	4,982
	0,139	0,966	5,049
	0,134	0,969	5,042
	0,133	0,978	5,092
	0,135	0,975	5,081
	0,139	0,985	5,029
	0,128	0,995	5,079
	0,128	0,982	5,139
	0,132	0,971	5,091
Media (µg/L)	0,134	0,978	5,069
Scarto tipo	0,007	0,008	0,05
CV%	7,1	0,8	1,3
Numero prove (N)	11	11	11

I CV% ricavati dalle prove di ripetibilità risultano essere tutti inferiori al valore di 8,7 riportato dal metodo normalizzato, probabilmente perché lo strumento di ultima generazione è stato acquistato recentemente.

Poiché il metodo normato riporta lo scarto tipo di ripetibilità e riproducibilità per un numero di livelli che non coprono l'intero campo di misura del metodo, si è effettuata la stima dell'incertezza di misura ad altri livelli, in modo che per ogni misurando siano definiti i dati di precisione a tre livelli di concentrazione, scelti con i criteri descritti sopra.

La formula utilizzata per il calcolo dell'incertezza estesa da associare al risultato è la seguente:

$$U = \sqrt{\sigma_L^2 + \frac{s_r^2}{n}}$$

Dove σ_L^2 indica la differenza tra σ_R^2 e σ_r^2 (con σ_R^2 e σ_r indicanti rispettivamente lo scarto tipo di ripetibilità e quello dichiarato dal metodo), m il numero di prove eseguite nella routine (1, 2, ecc.) e s_r lo scarto tipo di ripetibilità del laboratorio calcolato con prove ripetute (almeno 10).

Il calcolo dell'incertezza estesa per il cromo totale, in tabella 4, è 7.1% a 0.1 µg/L, del 0.8% a 1 µg/L e del 1.3% a 5 µg/L. Un'incertezza elevata nei campioni a concentrazioni minori può essere spiegata dal fatto che si lavora in prossimità del LOQ (Limite di Quantificazione).

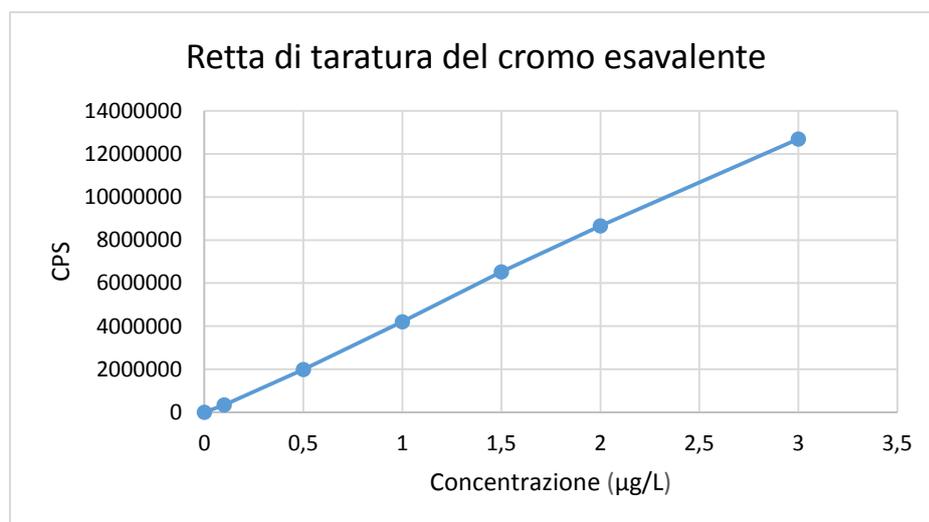
8.3.2 Incertezza del cromo esavalente

La retta di taratura, in tabella 5, è stata eseguita nella stessa modalità di quella del cromo totale e la corrispondente retta di taratura è visibile in figura 2.

Tabella 5. Dati relativi alla retta di taratura del Cr (VI).

X	Y	Y _{calcolato}
0	0	-4,49E+0,4
0,1	343591	3,84E+0,5
0,5	1986697	2,10E+0,6
1,0	4204811	4,24E+0,6
1,5	6522097	6,39E+0,6
2,0	8658128	8,53E+0,6
3,0	2692643	1,28E+0,7

Figura 2. Retta di taratura del Cr (VI).



Anche in questo caso la linearità è stata verificata con il test di Mendel e l'equazione ottenuta è riportata di seguito:

$$y = 4.29 \cdot 10^6 x - 4.49 \cdot 10^4$$

con r e R^2 rispettivamente di 0.99974 e 0.99948, che anche in questo

risultano essere accettabili.

L'incertezza, in tabella 6, mostra come nel caso del cromo esavalente quantificato mediante cromatografia liquida l'incertezza associata agli standard (X) sia la medesima per tutti i livelli di concentrazione con valore pari a 0.03, rendendo accettabile la quantificazione anche a 0.1 µg/L.

Tabella 6. Incertezza relativa (U) agli standard di taratura del Cr (VI) a diverse concentrazioni (X).

X	U _{taratura}
0	-
0,1	0,031
0,5	0,031
1,0	0,030
1,5	0,029
2,0	0,029
3,0	0,030

Le prove di ripetibilità eseguite a concentrazioni di 0.5 µg/L, 1.5 µg/L e 3.0 µg/L, sono riportate in tabella 7, dove le incertezze estese relative al Cr (VI) sono state calcolate come quelle del cromo totale e sono pari a 33.8% a 0.5 µg/L, del 7.2% a 1.5 µg/L e del 4.8% a 3.0 µg/L.

Tabella 7. Prove di ripetibilità relative al Cr (VI) eseguite a diverse concentrazioni (µg/L).

	Livelli		
	1	2	3
Valore atteso (µg/L)	0,500	1,500	3,000
Valori (µg/L)	0,340	1,763	2,770
	0,190	1,493	3,023
	0,198	1,450	3,120
	0,201	1,661	3,29
	0,270	1,581	3,149
	0,470	1,413	3,253
	0,302	1,432	3,225
	0,268	1,457	3,002
	0,196	1,539	3,04
	0,129	1,464	3,231
0,233	1,463	3,113	
Media (µg/L)	0,275	1,518	3,101
Scarto tipo	0,09	0,1	0,1
CV%	33,8	7,2	4,8
Numero prove (N)	11	11	11

8.3.3 Incertezza del cromo trivalente

Il calcolo dell'incertezza associata al Cr (III) non è stato applicato perché la cromatografia è risultata essere interferita, motivo che ha portato a risultati non attendibili e non ripetibili.

9 RISULTATI E ANALISI DEI DATI RACCOLTI

9.1 Rette di calibrazione dei metalli

Le rette di calibrazione dei metalli Fe, Mn, Al e As sono state ottenute grazie al metodo UNI EN ISO 17294-2, in possesso dell'azienda e al programma *Mass Hunter* (Agilent Technologies). Giornalmente prima dell'analisi della sequenza relativa ai campioni si è eseguita una taratura con un bianco seguito da concentrazioni crescenti degli standard (contenenti tutti e quattro i metalli) pari a 10, 25, 50, 100 e 200 µg/L.

I grafici mostrati nella figura 1 rappresentano le ottime rette di taratura (aventi tutte $R=1.000$) ottenute per ferro (A), manganese (B), alluminio (C) e arsenico (D), per le quali si è deciso di impostare il *fitting* della curva in modalità lineare e di far passare le rette per l'origine degli assi (*blank offset*). Nelle tabelle adiacenti alle rispettive rette sono visibili i diversi livelli di concentrazione teorici e quelli sperimentali, dove nel caso del ferro risultano essere sovrastimati gli standard a 10, 25 e a 100 µg/L (con valori pari a 10.167, 25.109, 100.417 µg/L) e sottostimati gli standard a 50 e 200 µg/L (con valori pari a 49.561 e 199.879 µg/L). Questo fenomeno è probabilmente imputabile all'instabilità dello strumento nel tempo che si riflette anche nelle rette di calibrazione di manganese e alluminio con una sottostima dello standard a 50 µg/L (con valori pari a 49.611 e 52.202 µg/L). Andamento opposto si ha invece per l'arsenico con una sottostima degli standard a 10, 25, 50 e 100 µg/L (con valori pari a 9.828, 24.893, 49.861 e 99.802 µg/L) e una sovrastima dello standard a 200 µg/L (con valore pari a 200.156 µg/L).

Gli standard relativi all'alluminio presentano una contaminazione da alluminio legata al rilascio di questo metallo dagli infissi del laboratorio. Conferma di tale contaminazione si ha da altre analisi effettuate con l'utilizzo di un altro ICP-MS in possesso dell'azienda, motivo che ha spinto a togliere il primo punto della retta di calibrazione in quanto troppo interferito.

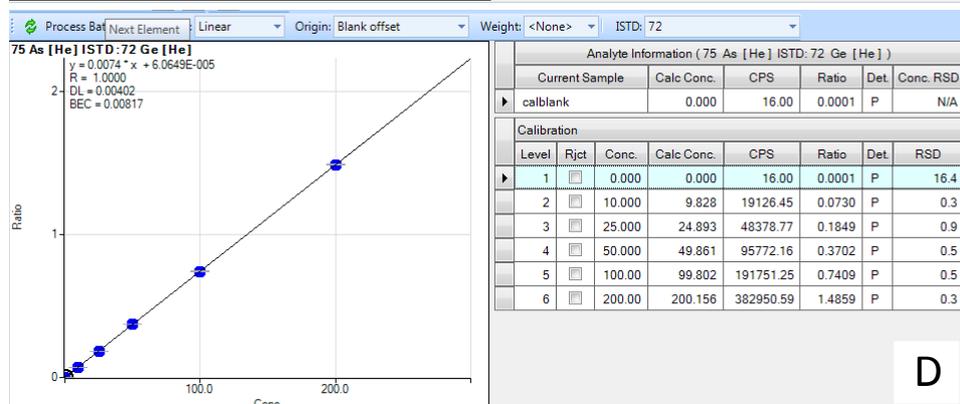
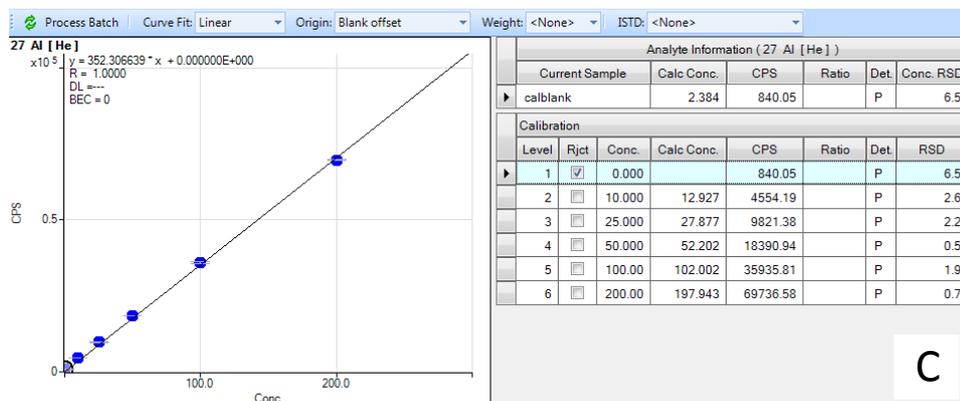
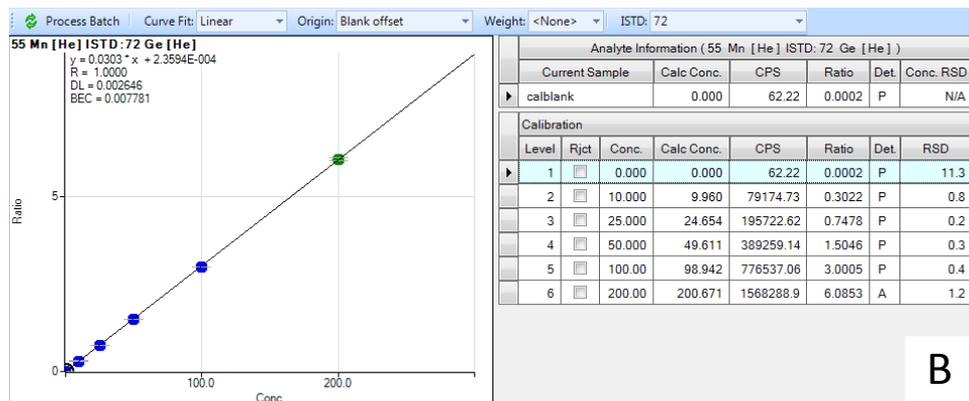
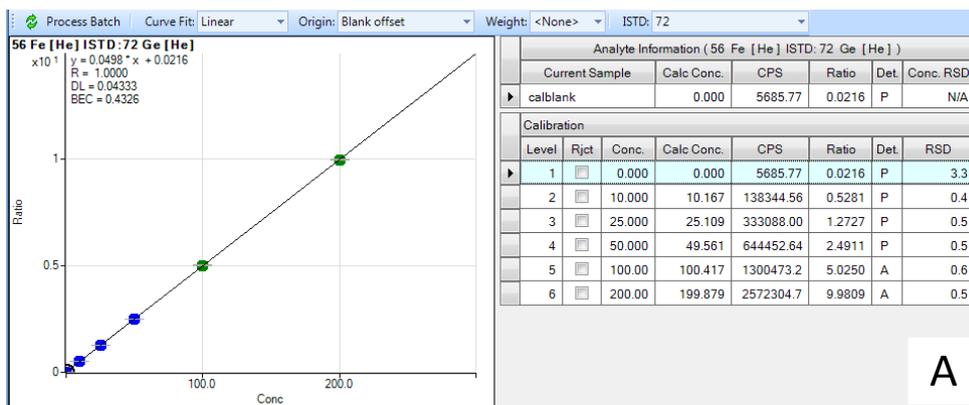


Figura 1. Rette di calibrazione ottenute con ICP-MS relative a ferro (A), manganese (B), alluminio (C) e arsenico (D).

9.1.1 Retta di calibrazione del cromo totale

La calibrazione per il cromo totale è stata effettuata utilizzando il metodo di calibrazione “Cromo totale” messo appunto durante l’attività di tirocinio e il programma *Mass Hunter*. Nella figura 2 è mostrata la retta di calibrazione del cromo totale (isotopo 52) nella quale è visibile $R= 1.0000$, sovrastima degli standard a 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 e 5.0 $\mu\text{g/L}$ con valori rispettivamente pari a 0.159, 0.251, 0.528, 1.029 e 5.024 $\mu\text{g/L}$ e leggera sottostima dello standard a 10 $\mu\text{g/L}$ con concentrazione pari a 9.983 $\mu\text{g/L}$.

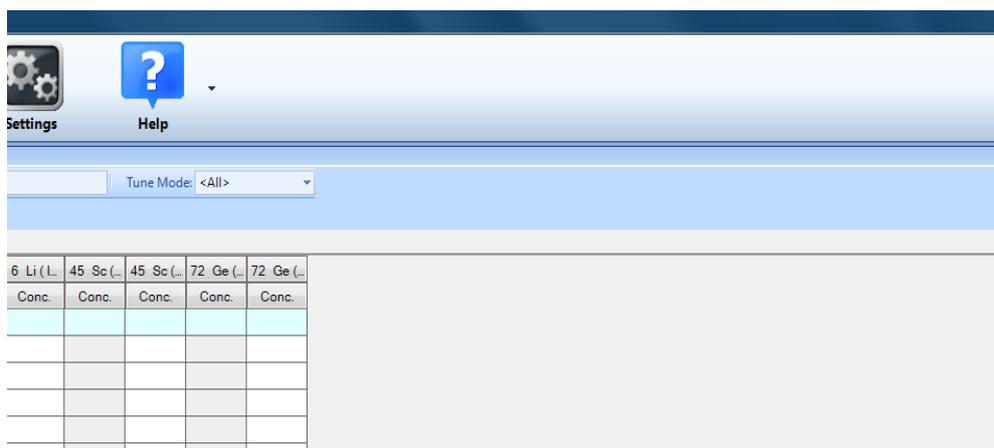


Figura 2. Retta di calibrazione relativa al cromo totale ottenuta mediante ICP-MS.

9.1.2 Rette di calibrazione del cromo (III) e (VI)

Gran parte del lavoro di tesi si è basata sulla messa appunto del metodo di calibrazione del Cr (III) e Cr (VI) mediante cromatografia liquida per poter rilevare concentrazioni di queste specie fino a concentrazioni pari a 0.1 $\mu\text{g/L}$. La tabella 1 mostra i dati relativi alle rette di taratura del Cr (III) (A) e del Cr (VI) (B), ottenute come le precedenti e, anche in questo caso, prima dell’analisi del *batch* relativo ai campioni si è eseguita una taratura con un bianco seguito da concentrazioni crescenti degli standard per diminuire eventuali contaminazioni derivanti da altre analisi svolte nello stesso strumento.

Tabella 1. Dati relativi alle rette di taratura del Cr (III) in A e del Cr (VI) in B ottenute con analisi HPLC-ICP-MS.

A

Cromo trivalente	
Eq. Retta $y=4675299,2237x-172458,9240$	
R=0,9991	
Conc. teorica	Conc. misurata
(µg/L)	(µg/L)
0	0
0,100	0,123
0,500	0,513
1,000	1,007
1,500	1,519
2,000	2,010
3,000	2,981

B

Cromo esavalente	
Eq. Retta $y=3354029,507569x$	
R=0,9998	
Conc. teorica	Conc. misurata
(µg/L)	(µg/L)
0	0
0,100	0,102
0,500	0,506
1,000	0,960
1,500	1,493
2,000	1,990
3,000	3,023

Dall'analisi dei dati relativi alle rette di cromo trivalente ed esavalente si denotano R rispettivamente pari a 0.9991 e 0.9998, indici di ottima linearità. Nella retta del Cr (VI) si ha sovrastima dello standard a 3.0 µg/L con valori riscontrati pari a 3.023 µg/L e sottostima degli standard a 1.0 1.5 e 2.0 µg/L con valori pari a 0.960, 1.493 e 1.990 µg/L, probabilmente legati al fatto che con il passare del tempo il Cr (VI) in soluzione viene convertito a Cr (III) e il meccanismo risulta essere più veloce a basse concentrazioni.

9.2 Validazione dei risultati: prove inter-laboratorio

Nel periodo che intercorre dal 18 dicembre 2015 al 9 giugno 2017 sono state condotte prove inter-laboratorio del gruppo "Aquacheck" fornite dal provider internazionale LGC Standards denominate PT-AQ-05: 5 - Toxic Metals in surface water (preservate in 0.5% di acido nitrico) che prevede la determinazione di 13 elementi tra cui anche il cromo totale.

Questi circuiti hanno visto coinvolti 53 laboratori ai quali veniva inviato un campione con un quantitativo incognito di cromo da analizzare tramite ICP-MS e, una volta analizzati i campioni, i risultati venivano inseriti *online* (tabella 2). Ad ogni prova è stato assegnato un numero identificativo, ad esempio "497", e uno z score calcolato nel seguente modo:

$$z = (x - X) / SDPA$$

dove x è il risultato del laboratorio che effettua le analisi, X è il valore assegnato e l'SDPA è la *Standard Deviation for Proficiency Assessment*.

Lo “z-score”, rappresenta la differenza tra la risposta fornita ed il valore assegnato. Minore è l’errore, più lo z-score sarà prossimo allo zero. È considerato accettabile un punteggio compreso tra -2 e +2.

Nella tabella 2 sono riportate le analisi condotte dal laboratorio di Capaccio in diversi periodi di tempo su diversi campioni acquosi contenenti cromo totale, utilizzando il metodo UNI EN ISO 17294-2 (di proprietà dell’azienda Romagna Acque) con una taratura che va da 10 a 200 µg/L.

Tabella 2. Protocollo *Acquacheck* per le prove svolte dal laboratorio di Capaccio (Romagna Acque) relative alla quantificazione del cromo totale in ICP-MS.

Prove interlaboratorio ACQUACHECK Cromo Totale					
Rapporto di prova n°	Data prova	Cromo Totale (µg/L)	Z-Score	Valore assegnato	SDPA
497	18/12/15	41,4	0,47	40,0	3,00
505	06/06/16	17,5	-0,55	18,6	2,00
509	05/08/16	31,1	0,04	31,0	2,33
513	21/10/16	46,2	-0,34	47,4	3,56
517	16/12/16	23,9	0,00	23,9	2,00
525	09/06/17	31,8	-0,33	32,6	2,45

I dati ottenuti dall’analisi dei vari rapporti di prova vengono confrontati non solo con gli z score di riferimento ma anche con quelli degli altri laboratori.

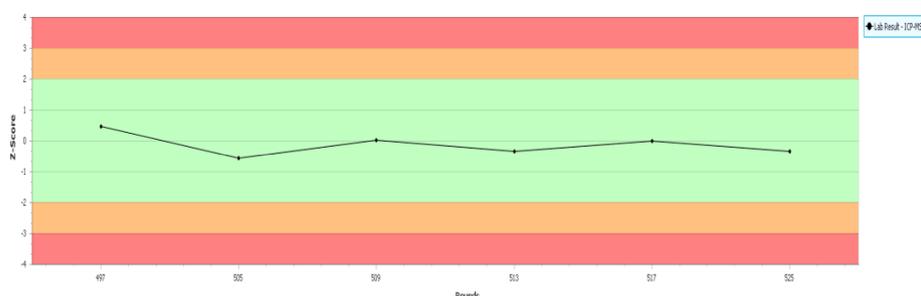


Grafico 1. Performance degli score (rapporto z/z') delle prove svolte dal laboratorio di Capaccio (Romagna Acque).

Il grafico 1 rappresenta le performance degli score relativi al rapporto z/z' riportato in ordinate in relazione alle prove eseguite, riportate in ascissa. Per z' si intende il parametro che minimizza l'incertezza dalla partecipazione alla prova da parte di altri laboratori in relazione alle prove eseguite secondo la formula:

$$z' = (x - X) \sqrt{(SDPA^2 + UxAV^2)}$$

dove $UxAV$ è l'*Uncertainty of the assigned value*. Nel grafico 1 sono visibili tre fasce colorimetriche: rossa, arancio e verde che rappresentano i risultati definiti come insoddisfacenti, discutibili e soddisfacenti sulla base del rapporto z/z' , rispettivamente con $|z| \geq 3.00$, $|z|$ compreso tra 2.00 e 3.00, $|z| \leq 2.00$. I risultati forniti dal laboratorio di Capaccio risultano avere tutti un trend compreso all'interno della fascia di confidenza verde, quindi il risultato fornito dal laboratorio è concorde con quello reale atteso e quello fornito dagli altri laboratori. Le prove inter-laboratorio risultano essere uno strumento importante per verificare la qualità dei risultati forniti da parte dei laboratori e un'efficace strumento di valutazione del *trend* di parametri di interesse nel tempo. Nel caso del cromo totale analizzato in ICP-MS i risultati di quantificazione sono ottimi, con valori di cromo compresi tra 18 e 47 $\mu\text{g/L}$ e rientranti nell'intervallo di taratura scelto (da 10 a 200 $\mu\text{g/L}$).
(ACQUACHECK)

9.3 Analisi di campioni reali

Sono stati analizzati più di 1000 campioni acquosi reali provenienti dagli Impianti di Potabilizzazione di Capaccio, della Standiana, delle Bassette e dagli impianti minori, dei quali si sono determinati i seguenti parametri chimico-fisici: temperatura, torbidità, pH, presenza di metalli (Fe, Mn, Al e As), quantità di cromo totale e speciazione delle forme di cromo trivalente ed esavalente.

Le tabelle 3 e 4 riassumono alcuni dei parametri sopra citati per le acque nelle diverse fasi di trattamento di potabilizzazione o grezze definite come "acque prelevate da una fonte di approvvigionamento prima di arrivare all'impianto di potabilizzazione"; e per le acque in uscita dai serbatoi e quindi già potabilizzate. ^(Dlgs 31/2001) Ad ogni campione è associato un codice numerico univoco che permette l'immissione dei dati all'interno di fogli di calcolo del programma *ProlabQ* utilizzato dai laboratori dell'azienda.

Tabella 3. Temperatura, torbidità e pH per campioni d'acqua grezza e nelle varie fasi dei processi di potabilizzazione aventi diversa origine.

Acque grezze						
Codice	Denominazione Campione	Tipologia di acqua	Provincia	T	Torbidità	pH
				°C	N.T.U.	
1738	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	Acqua superficiale	FC	9,9	12,1	7,6
1744	448 Cloratore sorgente Tevere	Acqua sotterranea	FC	5,6	0,2	7,6
1890	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,4	7,3	8,0
2059	STN P01A - Ingresso acqua grezza	Impianto Standiana	RA	12,0	7,7	8,1
2061	STN P02 VSC - B Uscita pre-ossidazione	Impianto Standiana	RA	11,7		7,6
2064	STN P06 U FC - Uscita filtri GAC	Impianto Standiana	RA	11,9	0,3	7,3
2066	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,6	5,2	8,1
2135	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	Acqua superficiale	FC	10,3	9,8	7,6
2138	447 - Cloratore Moia Bassa	Acqua sotterranea	FC	6,8	0,1	7,8
2254	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,5	4,5	8,0
2292	STN P12 Pul A+B	Impianto Standiana	RA	14,0	2,1	8,1
2320	433 Uscita cloratore Montione	Acqua sotterranea	FC	9,3	0,9	7,5
2419	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,7	3,5	8,1
2475	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	Acqua superficiale	FC	11,0	8,1	7,6
2640	00 G Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,8	3,1	8,0
2674	STN P12 Pul A+B	Impianto Standiana	RA	16,1	2,8	8,1
2675	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,8	3,6	
2768	STN P12 Pul A+B	Impianto Standiana	RA	16,8	3,6	7,9
2892	STN P12 Pul A+B	Impianto Standiana	RA	16,9	4,8	7,7
2898	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	Acqua superficiale	FC	11,1	7,9	7,8
2925	STN P12 Pul A+B	Impianto Standiana	RA	16,7	3,6	7,6
2926	00 Grezza Capaccio	Impianto Capaccio	FC	6,9	3,4	
2961	00 G Capaccio	Impianto Capaccio	FC	8,9	3,2	
2990	00 G Capaccio	Impianto Capaccio	FC	7,2	2,7	

Tabella 4. Temperatura, torbidità e pH per campioni d'acqua potabile di diversa origine. ^{(Dlgs}

31/2001)

Acque potabili						
Codice	Denominazione Campione	Tipologia di acqua	Provincia	T	Torbidità	pH
				°C	N.T.U.	
1742	425 Uscita serbatoio Baroni	Acqua sotterranea	FC	7,0	0,2	7,7
1743	424 Uscita serbatoio Straniera	Acqua sotterranea	FC	7,3	0,2	7,8
1746	429 a Uscita serbatoio Ogge	Acqua sotterranea	FC	6,4	0,3	7,8
1773	125 Ingresso centrale Fontana	Acqua potabile	RN	15,5	0,2	7,3
2495	125 Ingresso centrale Fontana	Acqua potabile	RN	14,9	0,2	7,4
2683	402 Uscita serbatoio Ca' d'Alessio	Acqua sotterranea	FC	16,1	2,8	8,1
2702	416 Uscita serbatoio Bonsignano	Acqua sotterranea	FC	12,8	0,5	7,1
2703	429 a Uscita serbatoio Ogge	Acqua sotterranea	FC	8,7	0,3	7,8
2704	425 Uscita serbatoio Baroni	Acqua sotterranea	FC	7,8	0,3	7,7

La temperatura, indice di qualità dell'acqua, direttamente correlata al quantitativo di ossigeno disciolto, allo stato di eutrofizzazione dei corpi idrici e alla biodiversità dell'ecosistema acquatico, mostra un trend molto vario, distintivo per la tipologia d'origine e rappresentativo delle diverse provincie. Le acque superficiali (tabella 3) presentano temperature medie più alte, generalmente superiori a 10 °C, rispetto a quelle sotterranee (tabella 4) che si aggirano a valori di circa 7 °C, a causa della maggiore esposizione ad

irradiazione solare e riscaldamento. Fanno eccezione le acque sotterranee in uscita dai serbatoi, tabella 3, che raggiungono temperature nettamente più elevate come si può notare nei campioni con codice 2683 e 2702 i cui valori sono rispettivamente di 16.1 e 12.8 °C. Analizzando la temperatura per provincia, tabella 4, si può osservare come Forlì-Cesena presenta temperature mediamente più basse rispetto a quelle di Rimini e Ravenna in quanto nel primo caso l'acqua deriva dall'invaso artificiale di Ridracoli che ha una capacità di invaso di 33 milioni di m³ d'acqua, mentre nel secondo l'acqua deriva dai fiumi Po, Lamone, Reno e CER (Canale Emiliano Romagnolo) che essendo corsi d'acqua esposti sono maggiormente soggetti a riscaldamento. Infine, l'impianto di potabilizzazione di Capaccio presenta una temperatura media di circa 7 °C, mentre quello della Standiana di circa 14 °C.

La torbidità misurata in N.T.U. (Unità Nefelometriche di Torbidità) è indice di delle sostanze di natura colloidale presenti nell'acqua. La torbidità è un fattore che influenza frequentemente la qualità dell'acqua potabile: valori elevati possono essere dovuti a presenza di materiale argilloso oppure a idrossidi di ferro o alluminio, sostanze, queste ultime, usate nel processo di potabilizzazione delle acque superficiali e che possono erroneamente finire nella rete acquedottistica. Talvolta fenomeni di corrosione delle tubature danno luogo ad acque "rosse" per presenza di idrossido di ferro. Più un'acqua è torbida, meno luce filtra nella colonna, maggiori sono le sostanze adsorbite sulle particelle e più difficili e costosi sono i mezzi per purificarla efficacemente. La normativa non fissa un valore limite per la torbidità, ma la considera accettabile per i consumatori in assenza di variazioni anomale (fissa un limite di 1 N.T.U. per acque provenienti da impianti di trattamento). Naturalmente le acque superficiali presentano torbidità maggiore di quelle sotterranee e i dati nelle tabelle 3 e 4 confermano una torbidità media rispettivamente di 10 e 0.6 N.T.U. Le acque degli impianti di potabilizzazione presentano torbidità varie in quanto i campioni sono stati prelevati in varie fasi del processo di potabilizzazione. Campioni con alta torbidità indicano acqua in ingresso all'impianto o

sottoposte ai primi processi di depurazione, mentre acque analizzate negli stadi finali di trattamento o all'uscita dagli impianti presentano bassa torbidità dovuta all'efficacia dei processi di purificazione. Un esempio è fornito dai dati di acqua potabile relativi ai campioni 1773 e 2495 che sono entrambi caratterizzati da valori di torbidità di 0.2 N.T.U.

Elevati valori di torbidità si hanno invece in presenza di alte concentrazioni di Fe e Mn, in quanto ossidi e idrossidi di questi due metalli vengono dilavati dalla rete idrica durante i processi di pulizia e si ritrovano quindi nei campioni.

Oltre alla torbidità e alla temperatura, nei campionamenti idrici si effettua anche una valutazione del pH, che secondo il D.lgs. 31/2001, deve essere compreso tra 6.5 e 9.5 unità pH. Nell'analisi condotta, il pH, mostrato nelle tabelle 3 e 4 risulta essere compreso tra 7.3 e 8.1 unità pH, quindi i campioni di acqua in esame hanno caratteristiche di neutralità o leggerissima basicità, in un intervallo più ristretto rispetto a quello richiesto dalla legge e pertanto conforme. Il pH è un parametro molto importante in quanto al variare delle condizioni ossido-riducenti si potrebbe innescare il rilascio o l'adsorbimento di metalli da parte di sostanze argillose contenute nell'acqua. Tra queste sostanze troviamo Fe, Mn e Al che in condizioni basiche formano ossidi e idrossidi che vengono assorbiti dalle particelle colloidali, mentre in condizioni acide questi vengono rilasciati nelle acque andando a modificare i profili di colore, sapore e durezza.

Le celle in bianco nella tabella 3 indicano dati mancanti in quanto l'azienda effettua pacchetti d'analisi diverse in relazione al campione, all'impianto e alla stagionalità.

Per gli stessi campioni analizzati sopra, è stata valutata la concentrazione di Fe, Mn, Al e As in $\mu\text{g/L}$, e i dati per le acque grezze e potabili sono riportati rispettivamente nelle tabelle 5 e 6.

Analizzando i dati della tabella 5 si nota come la maggior concentrazione di ferro, manganese e alluminio si ha rispettivamente nei campioni 1738, 2768 e 2292 con valori pari a con $1574 \mu\text{g/L}$ di Fe, $77 \mu\text{g/L}$ di Mn e $272 \mu\text{g/L}$ di Al; contrariamente l'arsenico in tutti i campioni risulta essere inferiore a $1 \mu\text{g/L}$

di As. Le acque grezze in ingresso agli impianti o quelle relative alle diverse fasi di potabilizzazione potrebbero presentare delle concentrazioni di metalli superiori a quelle previste dalla legge, andando a rispecchiare la diversa tipologia di risorsa idrica in relazione alla zona d'origine oppure all'aggiunta di reagenti necessari alla potabilizzazione. Il contenuto di ferro, manganese, alluminio e arsenico nell'acqua prima che questa venga sottoposta a processi di trattamento risulta non essere regolamentata in quanto la legge stabilisce dei valori limite per le acque dopo che queste hanno subito la potabilizzazione e solo allora devono essere conformi ai limiti per potere essere immesse nella rete idrica di distribuzione.

Tabella 5. Concentrazioni ($\mu\text{g/L}$) di ferro, manganese, alluminio e arsenico per i campioni di acque grezze analizzate in ICP-MS.

Acque grezze					
Metalli		Fe	Mn	Al	As
Codice	Denominazione	Concentrazione ($\mu\text{g/L}$)			
1738	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	1574	23		
1744	448 Cloratore sorgente Tevere	< 5	< 1	< 5	< 1
2066	00 Grezza Capaccio	119	12	191	< 1
2135	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	1515	51		
2138	447 - Cloratore Moia Bassa	< 5	< 1	< 5	< 1
2254	00 Grezza Capaccio	164	9	270	< 1
2292	STN P12 Pul A+B	452	35	272	
2320	433 Uscita cloratore Montione	86	1	139	< 1
2419	00 Grezza Capaccio	58	7	99	< 1
2475	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	1138	37		
2640	00 G Capaccio	90	5	181	< 1
2674	STN P12 Pul A+B	617	70	244	
2768	STN P12 Pul A+B	478	77	187	
2892	STN P12 Pul A+B	652	29	238	
2898	1126 Ing. Vasca Grezza filtri Case Nuove	1183	27		
2925	STN P12 Pul A+B	672	33	200	

Nella tabella 6 sono riportati i valori limite di questi metalli previsti nelle acque da destinarsi ad uso potabile, che in Italia sono regolamentati dal D.lgs. 31/2001 e sono rispettivamente: 200 $\mu\text{g/L}$ per ferro e alluminio, 50 $\mu\text{g/L}$ per il manganese e 10 $\mu\text{g/L}$ per l'arsenico (evidenziati in giallo).

I campioni risultano essere tutti conformi, presentando concentrazioni molto basse, quasi sempre inferiori a 5 µg/L nel caso di Fe e Al o addirittura inferiori a 1 µg/L nel caso di Mn e As.

Tabella 6. Concentrazioni (µg/L) di ferro, manganese, alluminio e arsenico e relativi limiti di legge per i campioni di acque da destinarsi ad uso potabile analizzati in ICP-MS.

Acque potabili					
Metalli		Fe	Mn	Al	As
		Concentrazione (µg/L)			
Codice	Valore limite nelle acque potabili (Dlgs 31/2001)	200	50	200	10
1742	425 Uscita serbatoio Baroni	< 5	< 1	< 5	< 1
1743	424 Uscita serbatoio Straniera	< 5	< 1	< 5	< 1
1746	429 a Uscita serbatoio Ogre	< 5	< 1	< 5	< 1
1773	125 Ingresso centrale Fontana	< 5	< 1	< 5	< 1
2495	125 Ingresso centrale Fontana	< 5	< 1	< 5	< 1
2683	402 Uscita serbatoio Ca' d'Alessio	< 5	< 1	< 5	< 1
2702	416 Uscita serbatoio Bonsignano	6	< 1	11	< 1
2704	425 Uscita serbatoio Baroni	< 5	< 1	< 5	< 1

Prima di passare alla speciazione vera e propria si sono condotte delle prove in ICP-MS per la quantificazione del cromo totale. In natura esistono quattro isotopi stabili del cromo che hanno rispettivamente masse di 50, 52, 53 e 54 con le seguenti abbondanze naturali percentuali (%) 4.345, 83.790, 9.500 e 2.365. Esiste anche l'isotopo 51 creato sinteticamente e non considerato in questo studio. Le specie maggiormente abbondanti risultano essere il cromo 52 e il 53. Ulteriore valutazione è stata condotta sui possibili interferenti di tali isotopi. Le specie maggiormente interferite sono il cromo 50 e il 54 a seguire il 53 come mostra la tabella 7 dove sono riportati i maggiori interferenti (in rosso) e la loro abbondanza relativa; tra i principali contaminanti troviamo sia specie atomiche sia poliatomiche generate in sorgente, quali BAr, MgMg, AlAl, FCl, CrH, Pd++, OCl e ClO. Per questi motivi si è deciso di considerare solo l'isotopo 52 (in verde in tabella 7) nella quantificazione del cromo totale in ICP-MS.

Tabella 7. Interferenze isobariche sul cromo causate da ioni poliatomici.

		Isotopi Cromo			
Massa	50	52	53	54	
Abbondanza (%)	4,345	83,790	9,500	2,365	
Interferenti:	Ti	5,180			
	V	0,250			
	Fe				
	MgMg	18,394			
	AlAl			100,000	
	Mo++	9,670			
	Ru++	12,600	18,620		
	Pd++		11,140	27,330	26,460
	Cd++			1,250	0,890
	BAr	19,820			
	CAr	0,059	98,534	1,066	
	NAr	0,339	0,060		99,241
	OAr		0,339		0,061
	CCl	0,259			
	NCl	0,273	0,087		
	OCl		0,030	24,333	0,010
	FCl				75,760
	TiH	5,417	0,001		
	VH		99,740	0,010	
	CrH			83,782	9,507
SO	4,430	0,018			
ClO		0,030	24,333	0,010	
ArO		0,339		0,061	

9.4 Campioni nei quali è presente Cr(VI)

In tabella 8 riporta i campioni nei quali si è riscontrata la presenza di cromo esavalente. I dati sono stati ottenuti dall'utilizzo di due metodi di quantificazione del cromo totale, che prevedono o meno l'accoppiamento di cromatografia liquida alla spettrometria di massa. Nello specifico, la prima parte in azzurro, riporta le concentrazioni di cromo totale (isotopo 52) ottenute mediante infusione diretta dei campioni in ICP-MS (7800 Agilent Technologies) senza pretrattamento di complessazione con EDTA, è stata invece eseguita acidificazione mediante aggiunta di 100 µL (in 10 mL di campione) di acido nitrico SUPRAPUR (67-69% Carlo Erba).

A destra invece si possono trovare i dati raccolti dalla speciazione del cromo trivalente ed esavalente ottenuti mediante separazione in cromatografia liquida per scambio anionico e successiva analisi in ICP-MS dei campioni di acqua trattati con EDTA 0.1 M per 3 ore a 90 °C.

Tabella 8. Concentrazione di cromo totale ottenuto con analisi ICP-MS in azzurro e in blu quella di Cr(III) e Cr(VI) ottenuta mediante speciazione con HPLC accoppiato a ICP-MS.

Codice	Tipologia di acqua	Cr Totale ICP-MS	Speciazione HPLC-ICP-MS	
		52 Cr [He]	52 Cr III	52 Cr VI
		Conc (µg/L)	Conc (µg/L)	Conc (µg/L)
1738	Acqua superficiale	0,55	0,35	0,11
1742	Acqua sotterranea	1,10	1,69	1,20
1743	Acqua sotterranea	1,04	0,04	1,29
1744	Acqua sotterranea	1,67	0,02	2,14
1746	Acqua sotterranea	1,56	0,05	1,80
1773	Acqua potabile	0,31	0,30	0,41
1890	Impianto Capaccio	0,44	0,04	0,12
2059	Impianto Standiana	0,30	0,72	0,14
2061	Impianto Standiana	0,35	0,80	0,13
2064	Impianto Standiana	0,32	0,52	0,22
2066	Impianto Capaccio	0,58	0,22	0,36
2135	Acqua superficiale	0,56	0,25	0,10
2138	Acqua sotterranea	1,11	1,14	1,87
2254	Impianto Capaccio	0,55	0,86	0,30
2292	Impianto Standiana	0,69	0,11	0,21
2320	Acqua sotterranea	0,41	0,19	0,13
2419	Impianto Capaccio	0,35	0,21	0,27
2475	Acqua superficiale	0,42	0,21	0,33
2495	Acqua potabile	0,31	0,08	0,54
2640	Impianto Capaccio	0,38	1,00	0,26
2674	Impianto Standiana	2,52	0,94	0,17
2675	Impianto Capaccio	0,65	5,04	0,25
2683	Acqua sotterranea	2,41	1,02	3,62
2702	Acqua sotterranea	0,44	0,89	0,65
2703	Acqua sotterranea	1,57	1,07	2,36
2704	Acqua sotterranea	1,20	0,83	2,09
2768	Impianto Standiana	0,50	0,82	0,15
2892	Impianto Standiana	0,43	0,40	0,14
2898	Acqua superficiale	0,41	0,52	0,28
2925	Impianto Standiana	0,34	0,25	0,10
2926	Impianto Capaccio	0,41	0,32	0,11
2961	Impianto Capaccio	0,39	0,16	0,15
2990	Impianto Capaccio	0,68	0,11	0,21

Analizzando i dati relativi al cromo totale, tabella 8, per l'isotopo 52 si nota che le sue concentrazioni sono molto basse e mai superiori a 2.5 µg/L, si tratta in tutti i casi di campioni di acque sotterranee che presentano cromo naturalmente o derivante da fenomeni antropici di inquinamento. Sono solo due i campioni (1773 e 2495) di acque potabili nei quali si è trovato del cromo totale e in ambedue i casi risulta essere di molto inferiore al limite di legge di 10 µg/L, con valore pari a 0.31 µg/L. ^(DLgs 31/2001)

Nella tabella 8, in rosso sono indicati i campioni (1744, 2683, 2703 e 2704), nei quali si è riscontrata la maggior concentrazione di cromo esavalente,

visibili anche in tabella 9 dove si può osservare che si tratta di tutte acque sotterranee aventi come limite di legge rispettivamente 50 e 5 µg/L di cromo totale ed esavalente. (DLgs 152/2006)

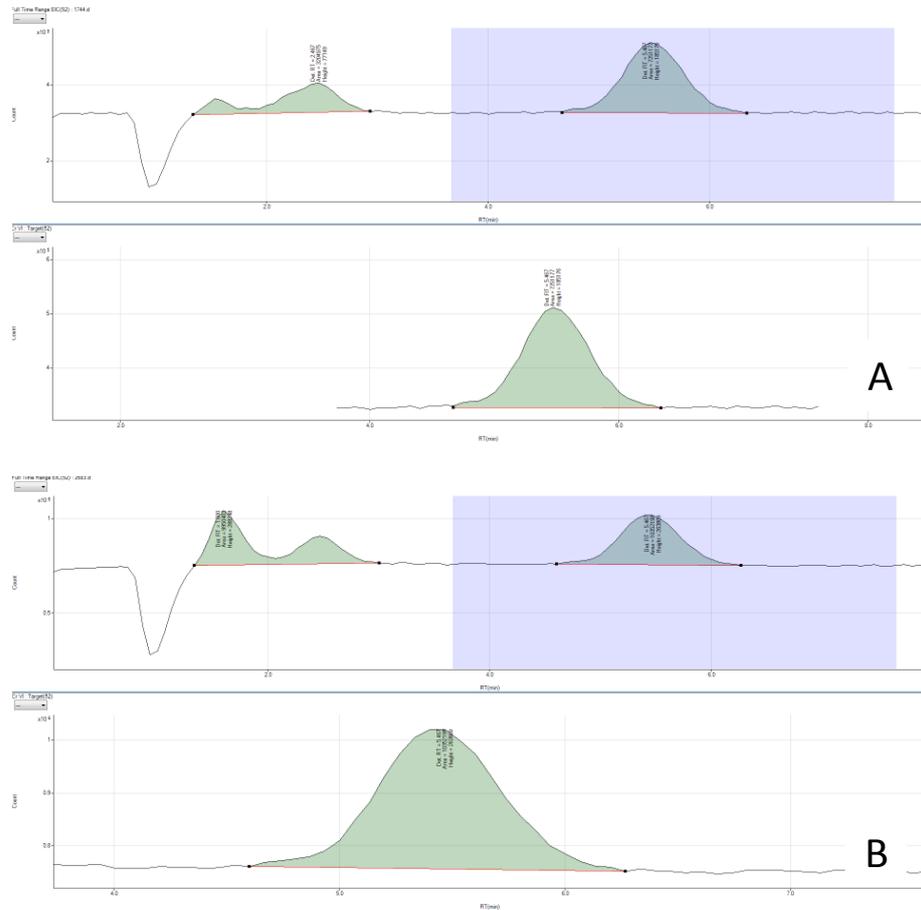
Tabella 9. Campioni nei quali è presente il cromo totale e il cromo esavalente.

Codice	Parametro quantificato	Conc. (µg/L)	Tipologia dell'acqua	Limite di legge (µg/L)	DLgs
1742	Cromo totale	≤2,50	Sotterranea	50	152/2006, Parte IV, Titolo V, Allegato V
1743					
1744					
1746					
2138					
2683					
2703					
2704					
1773					
2495	0,31	Potabile	10	31/2001, Allegato II (modifica 2016)	
1744	Cromo VI	2,14	Sotterranea	5	152/2006, Parte IV, Titolo V, Allegato V
2683		3,62			
2703		2,36			
2704		2,09			

In figura 3 sono mostrati i cromatogrammi relativi ai campioni 1744 (A), 2683 (B), 2703 (C) e 2704 (D) nei quali è stato trovato Cr (VI), ottenuti mediante analisi HPLC-ICP-MS, previo condizionamento della colonna per 3 ore al fine di stabilizzare la linea di base e migliorare la qualità delle analisi, considerando le basse concentrazioni alle quali si lavora. I tempi di ritenzione sono tutti pari a 2.0 e 5.5 min rispettivamente per Cr (III) e Cr (VI). Osservando tutti i cromatogrammi si nota un riquadro viola che rappresenta l'ingrandimento sul picco del cromo esavalente. A 2.0 min vi è la presenza di un picco relativo al Cr (III), non da attribuirsi alla reazione di complessazione incompleta Cr (III)-EDTA, bensì ad altre forme intermedie di cromo che si complessano con l'EDTA. Il cromo trivalente risulta difficile da quantificare correttamente; la sua quantificazione sottraendo il bianco, è risultata essere insoddisfacente perché la linea di base è particolarmente instabile. Per tale motivo si è preferito non quantificare il trivalente e volgere l'attenzione al picco del cromo esavalente il quale risulta essere il più preoccupante per la salute umana visti gli effetti di cancerogenicità. Il picco del Cr (VI) risulta

avere una buona separazione e altezza del picco cromatografico rispetto al Cr (III).

Le concentrazioni di Cr (VI) riscontrate nei campioni 1744, 2683, 2703 e 2704 sono rispettivamente pari a 2.14, 3.62, 2.36 e 2.09 µg/L.



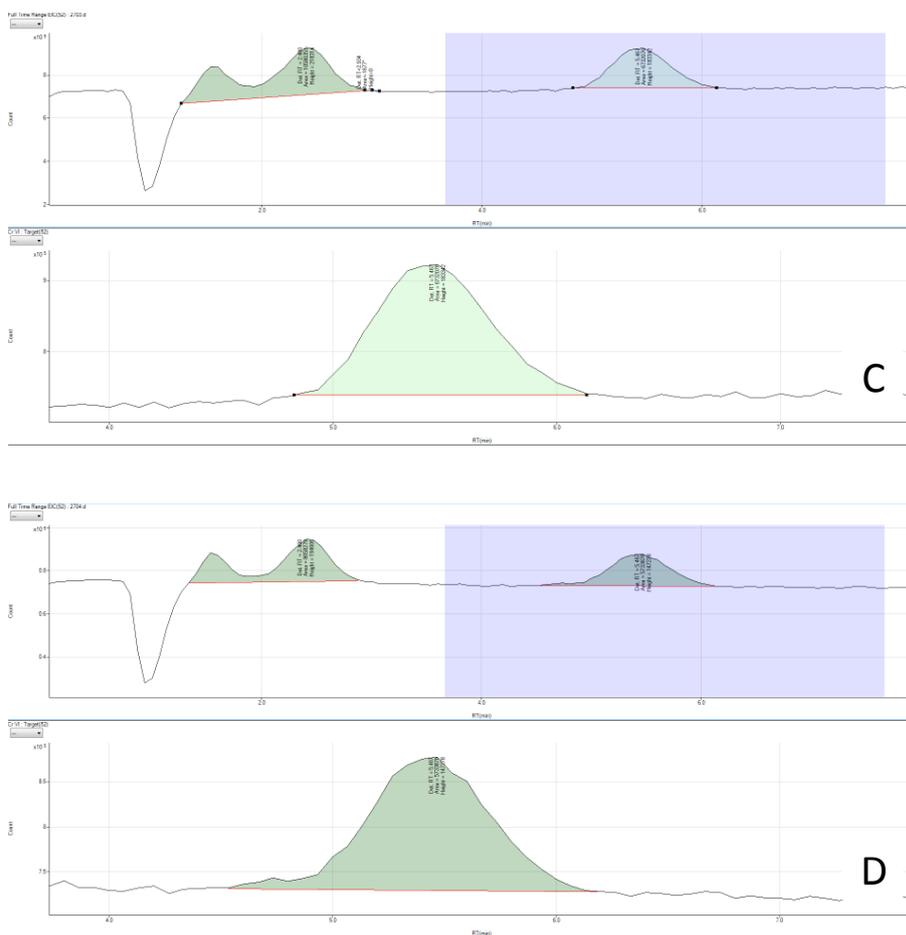


Figura 3. Cromatogrammi ottenuti mediante analisi HPLC-ICP-MS relativi ai campioni 1744 (A), 2683 (B), 2703 (C) e 2704 (D). Il primo pannello di ciascuna figura mostra l'intera corsa cromatografica con i picchi di Cr(III) e Cr(VI) rispettivamente a 2.0 e 5.5 min, mentre il secondo è un ingrandimento relativo al picco del cromo esavalente.

Andando a confrontare i dati ottenuti da due metodi diversi come quello che ha permesso di quantificare il cromo totale (isotopo 52) e quello che ha permesso di separare il Cr (III) e il Cr (VI) si è ottenuta la tabella 10 che racchiude le informazioni riguardanti la concentrazione di cromo totale, la somma delle due forme distinte, e la differenza percentuale relativa alla concentrazione di cromo totale e delle due forme di ossidazione del cromo. Confrontando i campioni evidenziati in giallo, nei quali si sono trovate le maggiori concentrazioni di cromo esavalente, se si osservano le colonne relative al cromo totale e alla somma delle due specie separate si vede come le concentrazioni del cromo totale siano sottostimate, probabilmente a causa del fatto che si considera solo il cromo 52 e non gli altri suoi isotopi,

e che si lavora a concentrazioni in prossimità del LOQ (Limite di Quantificazione).

Tabella 10. Confronto tra due metodi di quantificazione del cromo: ICP-MS e HPLC accoppiato a ICP-MS con deviazioni standard rispettivamente pari a 0.01 e 0.1 µg/L.

Codice	Cr tot	Somma Cr(III) e Cr(VI)	diff % Cr tot	52 Cr III	52 Cr VI
	Conc (µg/L)	Conc (µg/L)	%	Conc (µg/L)	Conc (µg/L)
1738	0,55	0,46	16,2%	0,35	0,11
1742	1,10	2,88	-162,1%	1,69	1,20
1743	1,04	1,33	-27,9%	0,04	1,29
1744	1,67	2,16	-29,1%	0,02	2,14
1746	1,56	1,85	-18,8%	0,05	1,80
1773	0,31	0,71	-126,6%	0,30	0,41
1890	0,44	0,16	62,4%	0,04	0,12
2059	0,30	0,86	-181,8%	0,72	0,14
2061	0,35	0,93	-164,9%	0,80	0,13
2064	0,32	0,74	-134,2%	0,52	0,22
2066	0,58	0,58	0,1%	0,22	0,36
2135	0,56	0,35	37,8%	0,25	0,10
2138	1,11	3,01	-172,5%	1,14	1,87
2254	0,55	1,17	-112,7%	0,86	0,30
2292	0,69	0,32	54,0%	0,11	0,21
2320	0,41	0,31	23,3%	0,19	0,13
2419	0,35	0,48	-37,2%	0,21	0,27
2475	0,42	0,54	-29,8%	0,21	0,33
2495	0,31	0,62	-97,7%	0,08	0,54
2640	0,38	1,26	-228,2%	1,00	0,26
2674	2,52	1,10	56,1%	0,94	0,17
2675	0,65	5,29	-715,6%	5,04	0,25
2683	2,41	4,65	-92,6%	1,02	3,62
2702	0,44	1,53	-251,8%	0,89	0,65
2703	1,57	3,43	-118,3%	1,07	2,36
2704	1,20	2,92	-144,4%	0,83	2,09
2768	0,50	0,97	-95,9%	0,82	0,15
2892	0,43	0,54	-25,4%	0,40	0,14
2898	0,41	0,80	-98,2%	0,52	0,28
2925	0,34	0,35	-3,3%	0,25	0,10
2926	0,41	0,44	-7,2%	0,32	0,11
2961	0,39	0,30	22,2%	0,16	0,15
2990	0,68	0,32	53,1%	0,11	0,21

Nel campione 1744 si ha 1.67 µg/L di cromo totale rispetto ai 2.16 µg/L dati dalla somma in cromatografia liquida. La differenza percentuale di -29.1% indica di quanto i due dati sono diversi e si ottiene attraverso la seguente formula:

$$\text{differenza \% cromo totale} = \frac{[(\text{Cr totale} - \text{somma Cr (III) e Cr (VI)}) / \text{Cr totale}] \%}{}$$

Nei campioni 2683, 2703 e 2704 si hanno rispettivamente 2.41, 1.57 e 1.20 $\mu\text{g/L}$ di cromo totale rispetto ai 4.65, 3.43 e 2.92 $\mu\text{g/L}$ dati dalla somma in cromatografia liquida. La differenza percentuale risulta negativa in quanto la concentrazione data dalla speciazione è maggiore di quella fornita dall'analisi del cromo totale, e vale rispettivamente -92.6, -118.3 e -144.4%. L'utilizzo di cromatografia riesce a quantificare in modo significativo solo il Cr (VI) in quanto il Cr (III) è presente in più forme di complessazione creando un picco non definito e quantificabile.

10 CONSIDERAZIONI

Le principali problematiche riscontrate riguardano l'impossibilità di quantificare il Cr(III) in HPLC-ICP-M perché vi sono due picchi cromatografici allo stesso tempo di ritenzione e la linea di base non risulta stabile nel tempo.

11 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi si pone come obiettivo quello di separare analiticamente le due forme di cromo più comuni in campioni di acqua, il cromo trivalente ed il cromo esavalente.

Le motivazioni sono diverse, principalmente perché la qualità dell'acqua è uno dei fattori determinanti per la salute pubblica e, secondariamente, perché nel D.M. 14/11/16 è stato introdotto come nuovo parametro il cromo esavalente la cui concentrazione limite è fissata a 10 µg/L, limite che sarà in vigore a partire dal 31 dicembre 2018. (G.U. n. 164 del 15.7.2017).

La situazione normativa precedente è schematizzata in tabella 1. (DLgs 31/2001), (DLgs 152/2006)

Tabella 1. Normative relative ai limiti di cromo nelle acque.

Normativa	Parametro	Limiti di riferimento (µg/L)		
		Cr(III)	Cr(VI)	Cromo totale
D.Lgs 31/2001	Acque destinate al consumo umano	assente	assente	50
D.Lgs 152/2006	Acque superficiali	assente	assente	50
	Acque superficiali destinate alla potabilizzazione	assente	assente	50
	Acque idonee alla vita dei pesci	assente	assente	20 salmonidi; 100 ciprinidi
	Acque sotterranee	da seguire in caso di criticità (non c'è un limite)		
D.Lgs 152/2006 (Parte IV, titolo V, ex DM 471/99)	Qualità delle acque sotterranee ai fini della valutazione della bonifica di siti contaminati	assente	50	50

La speciazione viene quindi usata per separare e quantificare diverse forme chimiche (specie) di un determinato elemento. Poiché Cr (III) non è tossico e Cr (VI) è altamente tossico, l'analisi della speciazione di cromo può fornire dati relativi alla percentuale di Cr (VI) in un dato campione d'acqua.

Le metodiche ufficiali per la determinazione del cromo esavalente si rifanno tutti all'uso della difenilcarbazide (UNI EN ISO 18412:2006; APAT-IRSA 3150 C determinazione spettrofotometrica del Cromo (VI) mediante difenilcarbazide). Il metodo UNI contempla la determinazione del cromo (VI) nell'acqua potabile in concentrazioni di massa comprese tra 2 µg/l e 50

$\mu\text{g/l}$; può anche essere applicato ad acque di falda poco contaminate e ad acque di superficie, purché non contenenti agenti riducenti interferenti. Il metodo APAT-IRSA invece, si riferisce sia alle acque naturali che di scarico, nell'intervallo di concentrazione compreso 0,1 e 1 mg/L , concentrazioni comunque fuori range per un'adeguata analisi delle acque potabili.

Si è quindi pensato di utilizzare una delle tecniche più potenti per la determinazione del cromo: HPLC-ICP-MS al fine di verificare una maggiore sensibilità rispetto a quelle dichiarate nelle metodiche alla difenilcarbazide.

Le analisi condotte in HPLC accoppiato a ICP-MS evidenziano come le due forme di cromo trivalente ed esavalente siano state quantificate e separate con successo con tempi di ritenzione rispettivamente pari a 2.0 e 5.5 min, mediante modalità di lavoro in isocratico e previo condizionamento della colonna anionica con un flusso di fase mobile pari a 0.4 mL/min per un tempo compreso tra i 30 e i 60 minuti prima delle analisi. Dall'integrazione dei picchi cromatografici il Cr (VI) è stato quantificato fino a concentrazione pari a 0.5 $\mu\text{g/L}$ pur presentando un'incertezza associata del 33.8%, mentre la cromatografia del Cr (III) è risultata essere interferita. Perciò, i dati ottenuti per il Cr (III) non risultano essere attendibili né ripetibili, pertanto il calcolo dell'incertezza estesa non è stato applicato.

Il cromo totale è stato analizzato in ICP-MS come isotopo 52 in quanto gli isotopi minori del cromo (50, 53 e 54) risultano essere molto interferiti dalle forme poliatomiche BAr, MgMg, AlAl, FCl, CrH, Pd++, OCl e ClO ed esclusi per il seguente motivo dalle analisi. Complessivamente le concentrazioni di cromo trivalente nei campioni di acqua presentano concentrazioni $\leq 1 \mu\text{g/L}$, di gran lunga inferiore al limite di 10 $\mu\text{g/L}$ imposto dal D.lgs. 31/2001. Le rette di taratura ottenute per cromo totale, trivalente ed esavalente presentano buona linearità con R prossimo a 1.

I campioni (1744, 2683, 2703 e 2704) contenenti Cr(VI) sono tutti relativi ad acque sotterranee, presentando concentrazione inferiore a 3.6 $\mu\text{g/L}$ e al limite di legge 5 $\mu\text{g/L}$. Il cromo totale si è riscontrato in campioni sia di acqua sotterranea che potabile ed è risultato essere inferiore a 2.5 e 0.3

$\mu\text{g/L}$ riflettono acque di ottima qualità se confrontata con la normativa vigente che richiede concentrazioni inferiori a 50 e 10 $\mu\text{g/L}$.

Per il calcolo dell'incertezza di taratura è necessaria la determinazione della tipologia di regressione, nel nostro caso lineare, calcolata insieme allo scarto tipo dei residui e verificata utilizzando il test di Mendel. L'incertezza associata agli standard del cromo totale è risultata avere un andamento inversamente proporzionale alla loro concentrazione con valori pari a 0.3 e 0.008 a 0.1 e 10.0 $\mu\text{g/L}$, motivo che riflette quantificazioni accettabili di cromo sopra a 0.5 $\mu\text{g/L}$.

L'incertezza di misura viene calcolata utilizzando lo scarto di riproducibilità del metodo con successiva verifica del rapporto tra scarto tipo di ripetibilità strumentale e quello normato, cosa che in questo lavoro di tesi non è stato fatto perché il metodo riportava il coefficiente di variazione percentuale (CV%) come parametro di riferimento. Il confronto è stato eseguito quindi mediante CV%, il quale è risultato essere migliore di quello previsto dalla metodica, fenomeno da attribuirsi allo strumento analitico avanzato acquistato di recente.

Per il calcolo dell'incertezza estesa (U) si è deciso di utilizzare il Metodo Metrologico ("*Bottom-Up*") che tiene conto di tutti i contributi che concorrono all'incertezza. U per il cromo totale è risultata essere pari a 7.1% a 0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.8% a 1 $\mu\text{g/L}$ e 1.3% a 5 $\mu\text{g/L}$ mentre per il Cr (VI) è 33.8% a 0.5 $\mu\text{g/L}$, 7.2% a 1.5 $\mu\text{g/L}$ e 4.8% a 3.0 μg . L'incertezza legata al Cr(III) invece non è stata calcolata perché i risultati non erano né attendibili né ripetibili.

I risultati relativi alle quantificazioni del cromo totale in ICP-MS sono stati confermati attraverso la partecipazione del laboratorio di Capaccio (Forlì-Cesena) di Romagna Acque a circuiti inter-laboratorio (*provider LGC-Standards*; protocollo *Aquacheck*) dal quale ne è conseguito una buona performance ottenendo valori di z-score sempre accettabili ($|z| \leq 2.00$).

Il confronto dei dati ottenuti con le due metodiche (ICP-MS e HPLC-ICP-MS) non è stato possibile perché richiede l'uso della deviazione standard che per i campioni analizzati in ICP-MS risulta essere un dato disponibile in quanto lo strumento effettua tre misure fornendo come risultato il valore medio,

mentre per i campioni analizzati in HPLC-ICP-MS il dato non risulta disponibile non essendo stato impostato nel metodo.

Complessivamente i risultati ottenuti dal presente lavoro di tesi risultano essere del tutto soddisfacenti in merito agli obiettivi preposti. L'attività svolta ha infatti permesso di conoscere la concentrazione del cromo esavalente sulle acque del territorio romagnolo con una buona precisione, grazie all'impiego di strumentazione di ultima generazione. Al contempo, nonostante la presenza di piccoli valori di cromo esavalente soprattutto nei campioni di acque sotterranea, il presente lavoro di tesi ha consentito la valutazione dell'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione nei confronti degli analiti ricercati, sempre prossimi ai limiti di rilevabilità strumentali in tutti i campioni di acqua distribuita in rete.

Gli esiti delle analisi chimiche hanno effettivamente dimostrato l'efficacia degli impianti di potabilizzazione (Capaccio, Standiana e Bassette) nell'abbattimento della maggior parte delle specie chimiche indagate, anche in quei campionamenti in cui si sono registrati i valori di concentrazione maggiori.

Le concentrazioni di cromo esavalente rilevate risultano, in ogni caso, del tutto in linea con il range di valori riportati a livello europeo nelle acque superficiali e comunque inferiori ai valori rilevanti dal punto di vista tossicologico.

Nel complesso le analisi chimiche usate in questo lavoro di tesi hanno permesso di dare prova del buono stato di qualità dell'acqua da destinare ad uso potabile, sia in ingresso che in uscita dai tre diversi impianti di potabilizzazione esaminati.

BIBLIOGRAFIA

1. (ACQUACHECK) "Water and Environmental Chemistry", 2017, ACQUACHECK Report, Ukas Proficiency Testing;
2. (Agilent Handbook) Agilent 7700/7500 Series ICP-MS Cr Speciation Analysis (for Drinking Water) Handbook;
3. (Beaumont, 2008) Beaumont J.J., Sedam R.M., Reynolds S.D., Sherman C.D., Li L.-H., Howd R.A., Sandy M.S., Zeise L., Alexeeff G.V., 2008, "Cancer Mortality in a Chinese Population Exposed to Hexavalent Chromium in Drinking Water", *Epidemiology*;
4. (Cerar J.) Cerar J., 2015, "Reaction between chromium (III) and EDTA ions: an overlooked mechanism of case study reaction of chemical kinetics", *Acta Chim. Slov.*;
5. (De Flora, 2016) De Flora S, Camoirano A., Micale R.T., La Maestra S., Savarino V., Zentilin P., Marabotto E., Suh M., M. Proctor D., 2016, "Reduction of hexavalent chromium by fasted and fed human gastric fluid. I. Chemical reduction and mitigation mutagenicity", *Toxicology and applied Pharmacology*;
6. (De Vivo, 2004) De Vivo B., Lima A., Siegel F.R., 2004, "Geochimica Ambientale. Metalli Potenzialmente Tossici", Liguori;
7. (DLgs 31/2001) Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano, G.U. n. 52 del 3 marzo 2001 - s.o. n. 41.
8. (DLgs 152/2006) Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152, 2006 "Norme in materia ambientale", *Gazzetta Ufficiale*, (n. 88);
9. (ISO 17294-2:2003) "Precision data for the matrix surface water", ISO 17294-2, Tab. 5, 2003.
10. (Gomez, 2016) Gomez V., Callao M.P., 2006, Chromium determination and speciation since 2000, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.25, No.10;

11. (Hill, 1990) Hill, S.J., 1990, "ICP-MS Spectrometry and its Applications", Sheffield Academic Press; (Hoffmann E.) Hoffmann E., Stroobant V., 2007, "Mass Spectrometry, Principles and Applications", Third Edition, Wiley;
12. (incertezza) Linee guida per il calcolo dell'incertezza di misura UNI ENV 13005;
13. (Kerger, 2009) Kerger B.D., Butler W.J, Paustenbach D.J., Zhang J.D., Li S.K., 2009, "Cancer Mortality in Chinese Populations Surrounding an Alloy Plant with Chromium Smelting Operations", Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A;
14. (Kopec, 2012) Kopec A. K., Kim S., Forgacs A.L., Zacharewski T.R., Proctor D.M., Harris M.A., Haws L.C., Thompson C.M., 2012, "Genome-Wide Gene Expression Effects in B6C3F1 Mouse Intestinal Epithelia Following 7 and 90 Days Exposure to hexavalent Chromium in Drinking Water", Toxicology and Applied Pharmacology;
15. (Krebs, 2006) Krebs R. E., 2006, "The History and Use of Our Earth's Chemical Elements", A Reference Guide, Second Edition, Greenwood Press;
16. (Gray, 1985) Gray, A.L., 1985 "Spectrochim. Acta Part B-At. Spectrosc.";
17. (Linos, 2011) Linos A., Petralias A., Christophi C.A., Kouroutou P., Stolidis M., Veloudaki A., Tezla E., Makris K.C., Karagas M.R., 2011, "Oral Ingestion of Hexavalent Chromium through Drinking Water and Cancer Mortality in an Industrial Area of Greece- an Ecological Study", Environmental Health: A Global Access Science Source;
18. (Ma, 2008) Ma H.L., Tanner P.A., 2008, "Speciated isotope dilution analysis of Cr(III) and Cr(VI) in water by ICP-DRC-MS", Elsevier;
19. (McCarroll, 2010) McCarroll N., Keshava N., Chen J., Akerman G., Kligerman A., Rinde E., 2010, "An Evaluation of the Mode of Action Framework for Mutagenic Carcinogens Case Study II: Chromium (VI)", Environmental and Molecular Mutagenesis;

20. (McNeil, 2012) McNeil L., McLean J., Edwards M, Parks J., 2012, "State of the Science of Hexavalent Chromium in Drinking Water", Water Research Foundation;
21. (McNeill, 2013) McNeill L., McLean J., Edwards M., Parks J., 2013, "Trace Level Hexavalent Chromium Occurrence and Analysis", Water Reserch Foundation", USA;
22. (Mertz, 1969) Mertz W, 1969, Chromium occurence and function in biological system. *Physiol. Rev.*, 49: 163-239;
23. (OEHHA, 2011) "Final Technical Support Document of Public Health Goal for Hexavalent Chromium in Drinking Water", 2011, California Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA);
24. (Ottaviani, 2007) Ottaviani M., Bonadonna L., 2007, "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.lgs. 31/2001. Metodi chimici" - Prelievo e conservazione dei campioni; Rapporti Istisan 07/31, Roma;
25. (Phillips, 2009) Phillips D.H., Arlt VM, 2009, "Genotoxicity: damage to DNA and its consequences", *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Springer;
26. (Thompson, 2011) Thompson C.M., Haws L.C., Harris M.A., Gatto N.M., Proctor D.M., 2011, "Application of the U.S. EPA Mode of Action Framework for Purposes of Guiding Future Research: A Case Study Involving the Oral Carcinogenicity of Hexavalent Chromium", *Toxicological Sciences*;
27. (Tomasoni, 2014) Tomasoni M., Brignoli G, 2014, "Il cromo nelle acque potabili: aspetti di sanità pubblica- Interventi adottati nel processo di approvvigionamento idrico per il miglioramento della qualità delle acque potabili", ciclo idrico a2a;
28. (rapporti, 2001) Rapporti Istisan 07/31 "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici - Prelievo e conservazione dei campioni ISS.PGA.901. rev00;

29. (APAT CNR-IRSA) APAT CNR-IRSA "Metodi analitici per le acque" Manuali e Linee Guida 20/2003 – 1030 metodi di Campionamento;
30. (Unichim) Manuale Unichim n°157 "Metodi di campionamento per le acque destinate al consumo umano";
31. (APHA) APHA, AWWA, WEF, 1998, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed. (Washington, APHA);
32. (Schwarzenbach, 2015) Schwarzenbach G., 2015 "1957 Complexometric titrations", London, UK, Chapman & Hall;
33. (Spezia, 2011) Spezia S., Bettinelli Claudio, 2011, "Applicazione del concetto di conferma metrologica nel laboratorio chimico alla luce della UNI 10012:2004 e delle richieste dei metodi di prova ufficiali: esempio dell'ICP-MS nell'analisi di metalli in tracce", Kosmosnet;
34. (Stoppini, 2012) Stoppini M., Bellotti V., 2012, "Biochimica Applicata", EdiSES, pp. 99-109;
35. (Zang, 1987) Zang J.D., Li X., 1987, "Chromium Pollution of Soil and Water in Jinzhou", Chinese Journal of Preventive Medicine;
36. (Zhitkovich, 2011) Zhitkovich A., 2011, "Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks", Chemical Research in Toxicology;
37. (Zorob, 1998) Zorob, G.K., McKiernan, J.W. and Caruso, J.A., 1998, "ICP-MS for elemental speciation studies. Mikrochim. Acta;

SITOGRAFIA

1. (bosettiegalli) http://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2001_0031.htm
2. (camera) <http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl1.htm>
3. (chromacademy)
http://www.chromacademy.com/lms/sco36/Fundamental_LC-ms_Mass_Analysers.pdf
4. (EPA 218.7)
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100GH3E.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2011+Thru+2015&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C11thru15%5CTxt%5C00000007%5CP100GH3E.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>
5. (Gazzetta)
<http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/01/16/17A00347/sg>
6. (HPLC Basics)
polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536
7. (ISO 23913:2009) <http://store.uni.com/magento-1.4.0.1/index.php/uni-en-iso-23913-2009.html>
8. (ISO 18412:2006) <http://store.uni.com/magento-1.4.0.1/index.php/uni-en-iso-18412-2006.html>
9. (treccani) www.treccani.it/enciclopedia/epidemiologia/

10. (normativa)<http://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2006-04-03;152!vig=>
11. (romagna qualità) <http://www.romagnacque.it/acqua/qualita>
12. (impianti)
http://bs.romagnacque.it/bilancio_2016/default.asp?id=26&t=Fonti+idriche+e+Impianti+potabilizzazione
13. (fonti)http://bs.romagnacque.it/bilancio_2016/default.asp?id=10&t=Fonti+di+approvvigionamento
14. (rete)http://bs.romagnacque.it/bilancio_2016/default.asp?id=108&t=La+rete+adduttrice+principale
15. (distribuzione) <http://www.romagnacque.it/acqua/distribuzione>
16. (capaccio)http://www.romagnacque.it/fonti_idriche/forlicesena/potabilizzatore_di_capaccio
17. (standiana)http://www.romagnacque.it/fonti_idriche/ravenna/potabilizzatore_della_standiana
18. (bassette) http://www.romagnacque.it/fonti_idriche/ravenna/nip

SOFTWARE UTILIZZATI

1. "Agilent MassHunter Workstation", Qualitative Analysis, Agilent Technologies, Rev. Novembre 2012;
2. "Prolab.Q" con sistema LIMS (Laboratory Information Management System) e interfacciamento con la strumentazione I-Gateway, Open.Co S.r.l., 2017.

