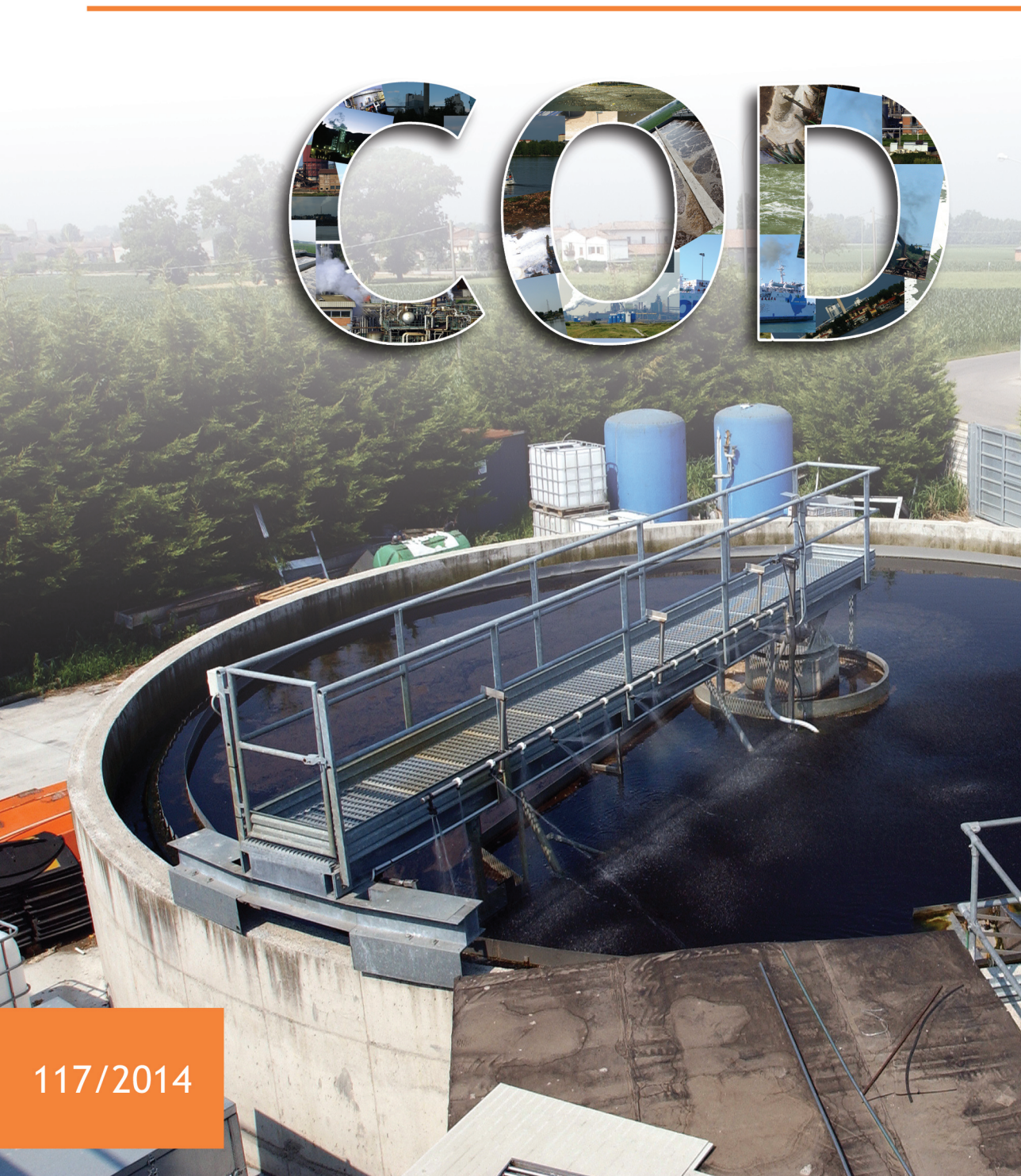




**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Procedura di misurazione per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) mediante test in cuvetta: Metodo 5135



MANUALI E LINEE GUIDA



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# **Procedura di misurazione per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) mediante test in cuvetta: Metodo 5135**

---

## **Informazioni legali**

L'istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

**ISPRA** - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma  
[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

ISPRA, Manuali e Linee Guida 117/2014  
ISBN 978-88-448-0678-1

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Franco Iozzoli

*Foto di copertina:* Paolo Orlandi

## **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** – Settore Editoria

**Settembre 2014**

---

## **Autori**

Paolo de Zorzi (ISPRA), Stefania Balzamo (ISPRA), Sabrina Barbizzi (ISPRA), Elisa Calabretta (ISPRA), Monica Potalivo (ISPRA), Silvia Rosamilia (ISPRA)

## **Ringraziamenti**

Questa pubblicazione è stata possibile per l'impegno profuso negli anni dalla Dott.ssa Maria Belli che ha costituito e guidato il Laboratorio del Servizio Metrologia Ambientale ISPRA a Castel Romano (Roma), promuovendone in ambito nazionale ed internazionale le sue attività.

Si ringraziano Vanessa Bellaria, Teresa Guagnini, Alessandra Pati e Vanessa Ubaldi del Servizio Metrologia Ambientale per il supporto fornito durante lo svolgimento degli studi collaborativi ISPRA SC004 e ISPRA SC005.

Un ringraziamento alla ditte HACH LANGE s.r.l., Italscientifica s.p.a. - Gruppo Italinvest e VWR International PBI s.r.l. che fornendo gratuitamente i materiali per l'esecuzione dei test in cuvetta e partecipando alle discussioni tecniche hanno contribuito alla realizzazione degli studi collaborativi propedeutici alla pubblicazione del metodo 5135.

Si ringraziano altresì i laboratori delle ARPA/APPA che hanno partecipato volontariamente agli studi collaborativi.

---

# INDICE

<b>PREMESSA .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>2</b>
<b>METODO 5135 - RICHIESTA CHIMICA DI OSSIGENO (COD) IN MATRICE ACQUOSA MEDIANTE TEST IN CUVETTA .....</b>	<b>3</b>
<b>RIFERIMENTI.....</b>	<b>7</b>
<b>ALLEGATO A - Studio Collaborativo ISPRA-SC004</b>	
<b>ALLEGATO B - Studio Collaborativo ISPRA-SC005</b>	

## PREMESSA

Nell'ambito delle attività istituzionali di ISPRA, finalizzate a garantire la confrontabilità dei dati di monitoraggio ambientale prodotti sul territorio nazionale dal Sistema delle Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA), sono da anni organizzati confronti interlaboratorio:

- per la valutazione delle prestazioni dei laboratori (prove valutative);
- per la convalida di procedure di misurazione elaborati dal Sistema (studi collaborativi).

Le attività sono annualmente pianificate in accordo alla Rete dei Referenti ARPA/APPA, coordinata dal Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA, a cui partecipano rappresentanti delle agenzie con funzione di supporto all'organizzazione dei confronti interlaboratorio. La pianificazione annuale deriva *i*) dagli obblighi conseguenti all'implementazione di direttive comunitarie (ad esempio in tema di qualità delle acque, con riferimento alle sostanze prioritarie, o dell'aria ambiente), *ii*) dalle attività già in essere nei diversi Gruppi di Lavoro istituiti nel quadro delle attività del Sistema, *iii*), da richieste avanzate dalle agenzie in relazione a specifici problemi analitici (emergenti o meno). Il Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA garantisce la disponibilità e produzione di materiali di riferimento.<sup>1</sup>

In tale contesto, tra il 2010 e il 2013 sono stati organizzati due studi collaborativi volti alla convalida di una procedura di misurazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta, a cui hanno partecipato volontariamente sia laboratori del Sistema ARPA/APPA che laboratori privati e che si è avvalso della collaborazione delle ditte HACH LANGE s.r.l., Italscientifica s.p.a. - Gruppo Italinvest e VWR International PBI s.r.l. che si sono rese disponibili a fornire gratuitamente ai laboratori partecipanti il materiale (kit) per l'esecuzione dei metodi in cuvetta.

---

<sup>1</sup> Il Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA (Centro LAT n. 211) ha ottenuto, per alcune tipologie di matrici e proprietà d'interesse ([http://www.sit-italia.it/SIT/CENTRI/Accreditamenti/Pdf/211/211\\_ISPRA.pdf](http://www.sit-italia.it/SIT/CENTRI/Accreditamenti/Pdf/211/211_ISPRA.pdf)) l'accreditamento per la produzione di Materiali di Riferimento, ai sensi della ISO Guide 34:2009 e per le attività analitiche, ai sensi della UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, rilasciato in accordo ai decreti attuativi della legge n. 273/1991 che ha istituito il Sistema Nazionale di Taratura (SNT).



---

## INTRODUZIONE

Il Manuale e Linea Guida APAT-IRSA N°29/2003 “Metodi analitici per le acque” riporta un metodo ufficiale per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD). Il metodo 5130 è basato sull’ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche presenti nelle acque, mediante una soluzione di bicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento; l’eccesso di bicromato è titolato con solfato di ammonio e ferro. Il metodo, in funzione della concentrazione di COD ( $> 50 \text{ mg L}^{-1}$  e compresa tra  $20$  e  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), nonché della presenza di cloruri (in concentrazioni  $\text{Cl}^- > 1000 \text{ mg L}^{-1}$  e rapporto in peso  $\text{COD}/\text{Cl}^- < 0,1$ ), prevede diversi procedimenti. Il metodo è largamente in uso presso i laboratori pubblici e privati ed è richiamato quale metodo di riferimento in diversi contesti delle attività di monitoraggio e controllo ambientale, quale ad esempio i controlli nell’ambito delle Autorizzazioni Ambientale Integrate (Allegato G, Nota Ispra 1 giugno 2011 - <http://www.isprambiente.gov.it/files/ipcc/ispra-18712-01-06-11-mod-att-pmc-ii-em-all-g-metodi.pdf>).

Da anni sono altresì disponibili procedure di misurazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa basati sul metodo in cuvetta. Il principio del metodo, che presenta maggiore rapidità di esecuzione rispetto al metodo APAT-IRSA 5130, si basa anch’esso su ossidazione del campione con bicromato di potassio e acido solforico e successiva lettura spettrofotometrica, in analogia ad esempio al metodo ISO 15705:2002. In commercio sono reperibili i materiali (cosiddetti kit) per l’applicazione del metodo in cuvetta.

ISPRA, con la collaborazione di CNR-IRSA e delle aziende produttrici dei kit per il metodo in cuvetta (HACH LANGE s.r.l., Italscientifica s.p.a. - Gruppo Italinvest e VWR International PBI s.r.l.) ha promosso un’iniziativa volta a definire e convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta già utilizzato, in alternativa al metodo APAT-IRSA 5130, nelle analisi di routine da molti laboratori pubblici e privati. A tal fine, il Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA ha organizzato in sequenza due distinti studi collaborativi:

- anno 2010: studio collaborativo ISPRA SC004;
- anno 2012: studio collaborativo ISPRA SC005.

Il primo studio (ISPRA SC004), a cui hanno partecipato sia laboratori delle ARPA/APPA che laboratori privati, è stato condotto su un campione di acqua ultrapura con aggiunta di ftalato di potassio e acidificata con acido solforico. I risultati dello studio ISPRA SC004 e la discussione che ne è seguita con i laboratori partecipanti e con le ditte fornitrici e produttrici dei test in cuvetta hanno suggerito di procedere ad un secondo studio collaborativo (ISPRA SC005). Il secondo studio collaborativo, in questo caso, è stato condotto su campioni reali a diversi livelli di concentrazione di COD, costituiti da acque reflue urbane e acque reflue industriali caratterizzate da un’intrinseca maggiore eterogeneità dovuta alla presenza di solidi sospesi.

Il Metodo 5135 per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) mediante il metodo in cuvetta, di seguito riportato, segue la numerazione già adottata dal Manuale e Linea Guida APAT-IRSA N°29/2003 “Metodi analitici per le acque”.

In Appendice 1 e Appendice 2 sono riportati per esteso i Rapporti conclusivi relativi ai due studi collaborativi.

---

# METODO 5135 - RICHIESTA CHIMICA DI OSSIGENO (COD) IN MATRICE ACQUOSA MEDIANTE TEST IN CUVETTA

## 1. SCOPO E CAMPO D'APPLICABILITA'

La presente procedura si applica per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno su campioni di acque naturali e di scarico (urbane ed industriali), mediante test in cuvetta.

La Richiesta Chimica di Ossigeno è un parametro che permette di valutare in modo indiretto la concentrazione delle sostanze organiche e inorganiche chimicamente ossidabili presenti in un'acqua, naturale, industriale o di scarico. La Richiesta Chimica di Ossigeno viene espressa in  $\text{mg L}^{-1}$  COD, definiti come milligrammi di  $\text{O}_2$  consumati per litro di campione ( $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$ ). Il campo applicazione è definito dalle specifiche tecniche dei test commerciali utilizzati.

## 2. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

COD: Richiesta Chimica di Ossigeno

CRM: Materiale di riferimento certificato

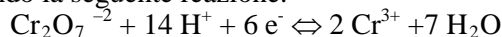
## 3. PRINCIPIO DEL METODO

La determinazione del COD mediante test in cuvetta prevede una fase di digestione in termostati, di norma per un tempo pari a 2 ore, alla temperatura di 148 °C ed una successiva determinazione spettrofotometrica.

All'interno della cuvetta sono presenti:

- ✓ un eccesso di bicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) in ambiente acido per acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),
- ✓ solfato di argento ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ), come catalizzatore della reazione,
- ✓ solfato di mercurio ( $\text{HgSO}_4$ ), necessario per l'eliminazione di eventuali cloruri interferenti.

Il bicromato di potassio in ambiente acido ed ad alta temperatura (fase di digestione) ossida la sostanza organica secondo la seguente reazione:



Al termine della digestione, la cuvetta viene lasciata raffreddare e la soluzione in essa contenuta viene letta allo spettrofotometro.

A seconda del campo di applicazione del test, la lettura allo spettrofotometro (assorbanza) avviene a lunghezza d'onda diverse, così come riportate nei manuali d'uso dei test in cuvetta utilizzati.

## 4. APPARECCHIATURE

### 4.1 Materiale (kit) per test in cuvetta

### 4.2 Termostato

### 4.3 Spettrofotometro

### 4.4 Cuvette (di dimensioni variabili in funzione del kit utilizzato)

### 4.5 Adattatori per eventuale alloggiamento di diversi tipi di cuvette

### 4.6 Vetreria di laboratorio (ad esempio matracci di vetro da 50 mL, 100 mL e 200 mL per la preparazione delle soluzioni di riferimento madre e di taratura del COD per la retta di taratura allo spettrofotometro)



---

#### 4.7 Agitatore magnetico o meccanico

Occorre garantire un'adeguata manutenzione e pulizia di tutte le apparecchiature utilizzate (spettrofotometro, digestore, termostato, cuvette, etc.).

### 5. REAGENTI E SOLUZIONI

#### 5.1 Bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) o Triossido di Cromo ( $CrO_3$ ),

#### 5.2 Solfato di argento ( $Ag_2SO_4$ )

#### 5.3 Solfato di mercurio ( $HgSO_4$ )

#### 5.4 Acido solforico ( $H_2SO_4$ )

#### 5.5 Idrogeno ftalato di potassio ( $KC_8H_5O_4$ )

#### 5.6 Idrogeno ftalato di potassio ( $KC_8H_5O_4$ ) - CRM (ad es. NIST SRM 84)

#### 5.7 Acqua milliQ: acqua distillata *nanopura* (conducibilità elettrica <0,1 $\mu S/cm$ )

I reagenti da 5.1 a 5.4 sono contenuti nella cuvetta stessa nelle giuste proporzioni secondo l'intervallo di applicabilità del kit commerciale.

#### 5.8 Conservazione dei reagenti

Le cuvette devono essere conservate negli appositi contenitori forniti dalla Ditta e chiusi per evitare l'esposizione alla luce. L'idrogeno ftalato di potassio deve essere anidro pertanto deve essere essiccato in stufa a 105 °C, almeno per una notte, e successivamente portato a temperatura ambiente in essiccatore, prima di essere utilizzato per la preparazione delle soluzioni..

### 6. PROCEDURA DI ANALISI

#### 6.1 Preparazione delle soluzioni di riferimento di COD per la taratura allo spettrofotometro

Eseguire e verificare la retta di taratura dello spettrofotometro prima di ogni serie di analisi strumentale.

- ✓ Pesare una quantità di idrogeno ftalato di potassio (5.5) tale da avere la concentrazione della soluzione madre di COD desiderata. Ad esempio, per una soluzione di COD pari a 3000 mg  $L^{-1}$  pesare 0.12764 g di idrogeno ftalato di potassio (5.5) e solubilizzare in acqua nanopura (5.7) in un matraccio da 50 mL.
- ✓ Per diluizione della soluzione madre, preparare un numero di soluzioni di riferimento di lavoro le cui concentrazioni di COD coprano tutto l'intervallo di applicabilità del kit.
- ✓ Agitare il contenuto della cuvetta assicurandosi che tutto il precipitato depositatosi sul fondo della cuvetta sia portato in soluzione.
- ✓ Aggiungere 2ml di soluzione di riferimento di lavoro, chiudere ed agitare vigorosamente.

L'operatore deve effettuare tutte le operazioni sotto cappa chimica per alti aggressivi, provvisto di idonei dispositivi di protezione individuale.

#### 6.2 Preparazione del bianco strumentale

Eseguire almeno un bianco procedurale per ogni serie di misure relativa ai campioni prova e valutare l'eventuale contaminazione.

- ✓ Agitare il contenuto della cuvetta assicurandosi che tutto il precipitato depositatosi sul fondo della cuvetta sia portato in soluzione.

- 
- ✓ Aggiungere 2 mL di acqua nanopura (bianco strumentale) alla cuvetta, chiudere ed agitare vigorosamente.

L'operatore deve effettuare tutte le operazioni sotto cappa chimica per alti aggressivi, provvisto di idonei dispositivi di protezione individuale.

### 6.3 Preparazione del campione di prova

Omogeneizzare il campione di laboratorio seguendo la seguente procedura:

- ✓ Agitare manualmente per 30 secondi la bottiglia contenente il campione di laboratorio.
- ✓ Eseguire l'avvinamento di un beaker (o contenitore simile) con un volume adeguato del campione di laboratorio.
- ✓ Trasferire circa 50 mL del campione di laboratorio all'interno del contenitore precedentemente avvinato.
- ✓ Agitare il contenuto nel beaker mediante agitatore magnetico per un minuto.
- ✓ Agitare il contenuto della cuvetta assicurandosi che tutto il precipitato depositatosi sul fondo della cuvetta sia portato in soluzione.
- ✓ Aggiungere 2ml di del campione di prova alla cuvetta, prelevato dal beaker sempre sotto agitazione, chiudere ed agitare vigorosamente.

### 6.4 Fase di digestione

Dopo vigorosa agitazione, disporre le cuvette all'interno del digestore ed avviare la digestione alla temperatura di 148°C per 2 ore.

Nota: Possono essere adottati minori tempi di digestione e temperature più alte purché i risultati delle misure siano equivalenti. Seguire, a tal proposito, le indicazioni del fornitore del kit commerciale utilizzato.

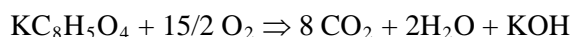
Conclusa la digestione, nella fase di raffreddamento quando la temperatura del termostato ha raggiunto valori da consentire la manipolazione delle cuvette in sicurezza, agitare le cuvette, trasferirle in un porta provette e completare il loro raffreddamento a temperatura ambiente.

### 6.5 Misura spettrofotometrica

Eseguire la serie di prove per verificare il corretto funzionamento dei principali componenti del sistema spettrofotometrico (lampade, regolazione dei filtri, lunghezza d'onda, tensione, etc.).

La retta di taratura per il COD allo spettrofotometro viene ottenuta mediante soluzioni di riferimento di idrogeno ftalato di potassio (sostanza madre).

Una concentrazione di idrogeno ftalato di potassio pari a 4.251 g L<sup>-1</sup> equivale ad una concentrazione di COD pari a 5000 mg L<sup>-1</sup> secondo la seguente reazione:



Analogamente per il calcolo dei grammi di idrogeno ftalato di potassio da pesare si usa la seguente equivalenza:

$$1 \text{ mole di KC}_8\text{H}_5\text{O}_4 \text{ (PM=204,23)} : 15/2 \text{ moli di O}_2 \text{ (PM=32)} = \text{g pesati di KC}_8\text{H}_5\text{O}_4 : \text{g di O}_2 \\ 204,23 : 240 = \text{g pesati di KC}_8\text{H}_5\text{O}_4 : \text{g di O}_2$$

Procedere in sequenza alla lettura spettrofotometrica delle cuvette contenenti il bianco strumentale, le soluzioni di riferimento di lavoro e i campioni di prova.

Riportare i risultati delle misure (C) espressi in mg L<sup>-1</sup> di O<sub>2</sub>.

### 6.6 Condizioni di sicurezza

Le operazioni di preparazione dei campioni devono essere effettuate utilizzando dispositivi di protezione collettiva (cappa chimica per alti aggressivi) ed indossando idonei dispositivi di protezione individuale (guanti, camici, etc.).

## 7. PRESTAZIONI DEL METODO DI MISURA

Di seguito sono riportati i dati di scarto tipo di ripetibilità ( $S_r$ ) e riproducibilità ( $S_R$ ) in termini percentuali ottenuti, in accordo a UNI ISO 5725-2:2004, da due studi collaborativi condotti rispettivamente su materiali di riferimento sintetici e su materiali di riferimento prodotti da acque reflue industriali e urbane (Tabella 1) a concentrazioni diverse. Con  $n$  è indicato il numero di risultati delle misure dei laboratori partecipanti agli studi collaborativi ed utilizzati per le valutazioni statistiche.

**Tabella 1** – Ripetibilità e Riproducibilità

	$n$	Valore medio $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$	$S_r$ % Scarto tipo di ripetibilità percentuale	$S_R$ % Scarto tipo di riproducibilità percentuale
Acque sintetiche	30	39,1	3,4	6,0
Acque sintetiche	30	167,1	1,7	4,1
Acque sintetiche	30	459,9	1,0	2,8
Acque reflue urbane	32	545,3	0,6	5,5
Acque reflue urbane	35	947,9	0,4	4,0
Acque reflue industriali	34	547,9	2,4	3,7

### 7.1 Calcolo dell'incertezza

Dai valori di ripetibilità ( $S_r$ ) e riproducibilità ( $S_R$ ) di Tabella 1 è possibile procedere, in accordo a ISO 21748:2010, al calcolo dell'incertezza da associare al risultato della misura. I laboratori possono valutare l'incertezza estesa ( $U$ ) della propria misurazione applicando l'Equazione 1 (per  $k=2$ , intervallo di fiducia del 95%).

$$U = k \times S_R \quad \text{Equazione 1}$$

Tuttavia, i laboratori, ad eccezione di quelli che hanno partecipato agli studi collaborativi con esito positivo, devono dimostrare a priori che:

- ✓ il proprio scarto tipo di ripetibilità sia uguale o inferiore a quelli riportati in Tabella 1,
- ✓ che lo scostamento, rispetto ad un CRM idoneo allo scopo, sia trascurabile.

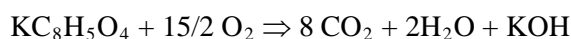
Come CRM utilizzare un sale di ftalato di potassio "primario" con valore certificato (5.5) da cui ottenere una soluzione di riferimento del sale stesso.

#### Scostamento dal CRM

Per la soluzione di ftalato di potassio ottenuta a partire dal CRM (5.6), il corrispondente valore di riferimento del COD ( $C_{COD}$ ), espresso come  $\text{mg L}^{-1}$  di  $\text{O}_2$ , è dato da:

$$C_{COD} = \frac{\text{mgO}_2}{V_{\text{soluzione}}} = \frac{\left( \frac{\text{mg}_{CRM} \times 240}{204,23} \right)}{V_{\text{soluzione}}} \quad \text{Equazione 2}$$

In base alla reazione di ossido riduzione ed ai relativi rapporti stechiometrici indicati di seguito:



1 mole di  $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$  (PM=204,23):15/2 moli di  $\text{O}_2$  (PM=32) = g pesati di  $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$ :g di  $\text{O}_2$   
 $204,23:240 = \text{g pesati di } \text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4:\text{g di } \text{O}_2$

L'incertezza tipo composta relativa associata è la seguente:

$$\frac{u_{COD}}{C_{COD}} = \sqrt{\left(\frac{u_{purezzaCRM}}{Purezza_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_{pesata}}{peso_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_{Volume}}{Volume_{soluzione}}\right)^2} \quad \text{Equazione 3}$$

dove:

$$\frac{u_{purezzaCRM}}{Purezza_{CRM}} = \text{incertezza tipo relativa della purezza del CRM (5.6),}$$

$$\frac{u_{pesata}}{Peso_{CRM}} = \text{incertezza tipo relativa della pesata del CRM (5.6),}$$

$$\frac{u_{volume}}{Volume_{soluzione}} = \text{incertezza tipo relativa del Volume della soluzione del CRM (5.6)}$$

L'incertezza estesa da utilizzare per la verifica dello scostamento, è data dalla Equazione 4 (per  $k=2$ , intervallo di fiducia del 95%):

$$U_{COD} = u_{COD} \times k \quad \text{Equazione 4}$$

Nel caso in cui lo scostamento rispetto al CRM non sia trascurabile, per il calcolo dell'incertezza tipo relativa deve essere usata la seguente formula:

$$\frac{u(C)}{C} = \sqrt{S_R^2 + \left(\frac{u_{CRM}}{C_{CRM}}\right)^2} \quad \text{Equazione 5}$$

dove:

$$\frac{u_{CRM}}{C_{CRM}} = \sqrt{\left(\frac{u_{COD}}{C_{COD}}\right)^2 + \left(\frac{S_r}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad \text{Equazione 6}$$

$$\frac{S_r}{\sqrt{n}} = \text{scarto tipo della media delle misure sulla soluzione di riferimento da CRM (5.6)}$$

$$\frac{u_{COD}}{C_{COD}} = \text{incertezza tipo composta relativa della soluzione di riferimento da CRM (5.6)}$$

## 8. RIFERIMENTI

APAT/IRSA-CNR, "Metodi analitici per le acque. 5130 - Richiesta chimica di ossigeno (COD)". Manuale e Linea Guida N°29/2003, Volume secondo, Sezione 5000 – Organici

EURACHEM, "The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics", LGC (Teddington) Ltd, 1998

---

ISO 21748:2010, “Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation”

UNI ISO 5725-2:2004, “Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato”



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

*Studio Collaborativo*  
*ISPRA-SC004*  
*per la convalida del procedimento di*  
*misurazione del COD con il metodo in*  
*cuvetta*

*Rapporto Conclusivo*

Dicembre 2010

ISPRA, Servizio Metrologia Ambientale – Via Castel Romano, 100 – 00128 Roma

a cura di :

**Paolo de Zorzi, Stefania Balzamo, Sabrina Barbizzi, Maria Belli, Vanessa Bellaria,  
Alessandra Pati, Silvia Rosamilia, Vanessa Ubaldi**





---

## INDICE

#	CAPITOLI	PAGINA
	Indice	3
1	Introduzione	4
2	Destinatari	4
3	Acronimi e abbreviazioni	4
4	Materiale di prova	4
4.1	ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM029	4
4.2	Prove di omogeneità dei materiali di prova	5
4.3	Prove di stabilità dei materiali di prova	5
5	Modalità di esecuzione dello studio collaborativo	5
6	Elaborazione statistica dei risultati	6
7	Risultati	7
8	Conclusioni	9
9	Riferimenti	10
	Appendici	
	Appendice A Elenco dei laboratori partecipanti	12
	Appendice B Protocollo dello studio collaborativo	17
	Appendice C Protocolli dei test in cuvetta forniti dalle Ditte	27
	Appendice D Prove di stabilità	29
	Appendice E Risultati delle misure ISPRA RM027, ISPRA RM028, ISPRA RM029	33

---

## 1. INTRODUZIONE

Il Rapporto APAT-IRSA N°29/2003 “Metodi analitici per le acque” riporta un metodo ufficiale per la determinazione della richiesta chimica di ossigeno (COD). Il metodo 5130 è basato sull’ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche presenti nelle acque, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento; l’eccesso di dicromato è titolato con solfato di ammonio e ferro. Il metodo, in funzione della concentrazione presumibile di COD (> 50 mg L-1 e compresa tra 20 e 50 mg L-1), nonché della presenza di cloruri in concentrazioni > 1000 mg L-1, prevede diversi procedimenti e/o modifiche.

ISPRA, con la collaborazione di CNR-IRSA, Hach Lange, Italscientifica SpA - Gruppo Italinvest e VWR International s.r.l., ha promosso un’iniziativa mirata a definire e convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta già utilizzato, in alternativa al metodo APAT-IRSA, nelle analisi di routine da molte Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell’Ambiente (ARPA/APPa). A tal fine Il Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA ha organizzato uno specifico studio collaborativo.

In prospettiva, si intende proporre, sulla base delle norme esistenti e delle esperienze maturate a livello nazionale, un metodo ufficiale per la determinazione del COD per la matrice acquosa più speditivo ma con idonei requisiti di qualità delle prestazioni (ripetibilità, riproducibilità, etc.).

## 2. DESTINATARI

Allo studio hanno partecipato i laboratori esperti nella misura di COD individuati, in accordo ad ISPRA, dalle Ditte fornitrici dei materiali per il test in cuvetta ed appartenenti alle ARPA/APPa nonché a strutture private.

Il presente documento illustra i risultati dello studio collaborativo, denominato ISPRA SC004.

Lo studio ha avuto inizio il 15 marzo 2010 e si è concluso il 30 marzo 2010 con la consegna dei risultati da parte dei laboratori partecipanti. Il presente rapporto è redatto a valle di una riunione di valutazione dei risultati delle misure con la partecipazione delle Ditte fornitrici dei materiali per le prove in cuvetta e gli organizzatori dello studio stesso.

Allo studio collaborativo hanno partecipato 32 laboratori, ognuno dei quali ha ricevuto i materiali di prova da ISPRA e il materiale per la conduzione delle prove in cuvetta dalle Ditte produttrici. In APPENDICE A è riportato l’elenco dei laboratori partecipanti.

## 3. ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

<b>ISPRA</b>	<b>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale</b>
<b>ARPA/APPa</b>	<b>Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale – Agenzia Provinciale per la Protezione dell’Ambiente</b>
<b>SC</b>	<b>Studio Collaborativo</b>

## 4. MATERIALI DI RIFERIMENTO

### 4.1. ISPRA RM027, ISPRA RM028 E ISPRA RM029

Il procedimento di convalida è eseguito su tre materiali di prova caratterizzati da diversi livelli di concentrazione. I materiali di riferimento oggetto della prova, denominati ISPRA –RM027, ISPRA-RM028 e ISPRA RM029, prodotti presso il Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA, sono costituiti da acqua ultrapura acidificata con acido solforico a pH 1-2. Per ciascun materiale di riferimento è stata prodotta un quantitativo di circa 10 L, da cui sono state prodotte, senza soluzione di continuità, 100 bottiglie contenenti ognuna circa 90 mL di soluzione. Il materiale è stato

---

confezionato in bottiglie di vetro scuro da 100 mL con tappo a vite. Dalla totalità delle bottiglie ne è stato prelevato un numero statisticamente significativo per l'esecuzione delle successive prove di omogeneità e stabilità (Paragrafi 4.2 e 4.3). I materiali di prova sono caratterizzati da livelli di COD compresi tra 6 e 1000 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.2. PROVE DI OMOGENEITÀ DEI MATERIALI DI PROVA

E' stata condotta la valutazione dell'omogeneità dei materiali preparati dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA (ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM029) e utilizzati per lo studio collaborativo. Sui tre materiali di prova sono state effettuate prove per la valutazione dell'omogeneità tra-bottiglie effettuando misure di COD con il metodo in cuvetta. Le Ditte che hanno collaborato allo svolgimento dello studio collaborativo hanno fornito i materiali per la esecuzione del metodo in cuvetta.

Il metodo per la valutazione segue la procedura interna del Servizio che prevede, per ogni materiale di prova, l'analisi in condizioni di ripetibilità (in una singola sessione analitica) di 10 unità analizzate in triplicato.

L'omogeneità tra-bottiglie è stata quindi valutata tramite l'Analisi della Varianza (ANOVA) dopo aver verificato la normalità delle misure utilizzando i test di Shapiro Wilk e di Kolmogorov Smirnov. I materiali prodotti sono risultati omogenei e idonei allo svolgimento dello studio collaborativo.

#### 4.3. PROVE DI STABILITÀ DEI MATERIALI DI PROVA

Le prove di stabilità sono state effettuate sui materiali di prova ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM029 in condizioni isocrone (A.M.H. Van der Veen, et al, 2001) nell'arco di un periodo di 8 giorni alla temperatura di 20°C e controllando il parametro COD oggetto dello studio collaborativo.

Tale metodo prevede l'esecuzione, in un'unica soluzione, di tutte le misure di COD sulle bottiglie di ciascun materiale selezionate: cinque unità per ogni intervallo di tempo (per un totale di 15 per 3 intervalli di tempo) e cinque unità appartenenti al gruppo di riferimento). Le misure eseguite sulle unità mantenute alla temperatura di 20°C, per la durata dello studio collaborativo sono poste a confronto con i risultati delle misure ottenuti sulle bottiglie mantenute a -20°C per tutto il tempo della prova di stabilità (gruppo di riferimento). La temperatura di -20°C rappresenta la temperatura di conservazione del campione alla quale si assume non si possano manifestare fenomeni degradativi.

Il dettaglio dello studio è riportato in Appendice D, ove sono riportati i grafici delle prove di stabilità nel tempo. I singoli punti di ogni grafico rappresentano il rapporto fra il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti allo stesso intervallo di tempo (Tn) e il valore medio delle bottiglie appartenenti al gruppo di riferimento (T0). I materiali sono risultati stabili ed idonei allo svolgimento dello studio collaborativo.

### 5. MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLO STUDIO COLLABORATIVO

Ai partecipanti è stato chiesto di effettuare su tutti i materiali di prova consegnati cinque determinazioni individuali indipendenti operando in condizioni di ripetibilità ristretta, esprimendo i risultati delle singole misure indipendenti e la migliore stima derivante dalle misure eseguite per il parametro COD (espresso in mg L<sup>-1</sup>) come da Tabella 1.

*Tabella 1 – Parametri ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM023*

PARAMETRO	UNITÀ DI MISURA	N° di cifre decimali
COD	mg L <sup>-1</sup>	1

Nel protocollo dello studio collaborativo sono state fornite specifiche indicazioni circa le modalità di conduzione della prova (APPENDICE B). I laboratori hanno eseguito le misure seguendo, inoltre, le istruzioni di accompagnamento al

---

materiale consegnato dalle ditte produttrici necessario per lo svolgimento delle prove in cuvetta (APPENDICE C). In particolare, le prove sono state condotte con i seguenti test in cuvetta:

- LCK414, 514 e 614 prodotto e fornito da Hache Lange;
- Spectroquant 114540, 114895 e 114541, fornito da WVR International;
- Lovibond LR, MR e HR, fornito da Italscientifica.

Tutti i test forniti dalle ditte, per i diversi livelli di concentrazione, appartengono allo stesso di lotto di produzione. Alcuni laboratori (4), dietro specifica richiesta degli stessi, hanno ricevuto una doppia aliquota di materiale di prova affinché potessero eseguire le misure utilizzando test forniti da diverse ditte o metodi alternativi. L'esiguità delle misure relative ai metodi alternativi al metodo in cuvetta in convalida (APAT/IRSA, etc.) non ha consentito di eseguire successive valutazioni per tali metodi.

I dati sperimentali, unitamente ad informazioni riguardanti il procedimento di misurazione adottato, sono stati restituiti dai laboratori partecipanti all'organizzatore mediante la "Scheda Raccolta Risultati".

## **6. ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI**

L'insieme dei risultati forniti dai laboratori hanno costituito la base su cui calcolare, ai sensi della ISO 5725-2, lo scarto tipo di ripetibilità e di riproducibilità per il metodo applicato ai tre diversi materiali di prova.

I dati dei laboratori partecipanti allo studio sono stati sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica ha riguardato la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori, relativamente al procedimento di misurazione eseguito, e quanto previsto dal protocollo dello studio.

E' stata avviata una fase di verifica con i singoli laboratori al fine di acquisire integrazioni e/o correzioni ai dati ricevuti con il conseguente invio da parte dei laboratori, in taluni casi, di revisioni delle schede dei risultati. A seguito di questa prima fase di valutazione delle risposte dei laboratori ed in accordo alle finalità dello studio si è proceduto all'esclusione di alcuni laboratori. Specificatamente:

- Lab-18 e Lab-26: per le misure eseguite in accordo al metodo APAT-IRSA 5130,
- Lab-27: per le misure eseguite in accordo al metodo APHA Standard Methods for the Examination of water and waste water, 21ST ed. 2005 5220 AB,
- Lab-28: per le misure eseguite con test già disponibile in laboratorio e non fornito dal produttore per questo SC.

Tuttavia, tali laboratori, avendo ricevuto una doppia aliquota di materiale su cui poter eseguire le misure con il metodo in cuvetta, hanno restituito i risultati che sono rientrati nella successiva elaborazione statistica.

I valori di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione sono stati calcolati in accordo alla norma ISO-5725-parte 2, previa applicazione dei test di Grubb e Cochran per la verifica di valori dubbi (straggler) e anomali (outlier) sia per le medie che per le varianze (intra-laboratorio). Sono stati inoltre eseguiti i test secondo la statistica  $h$  e  $k$  (Mandel), per valutare graficamente la consistenza statistica dei risultati dei laboratori (intra e tra laboratorio). La procedura di calcolo di ripetibilità e riproducibilità si basa su un processo iterativo che mira ad escludere dal calcolo finale degli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità i risultati dei laboratori che siano considerati, sulla base dei test suddetti, dubbi e/o anomali. Tale processo ha escluso dalle valutazioni finali:

- Lab-22 e Lab-27 per il materiale ISPRA RM027;
- Lab-22 e Lab-31 per il materiale ISPRA RM028;
- Lab-31 e Lab-32 per il materiale ISPRA RM029.

Complessivamente, al termine di tale processo, il numero di laboratori sui cui risultati sono stati calcolati ripetibilità e riproducibilità del metodo è stato pari a 30.

## 7. RISULTATI

In Tabella 2 sono riportati i risultati delle misure (migliori stime) dei laboratori partecipanti allo studio così come comunicati dai laboratori ad ISPRA. In APPENDICE E sono riportati i valori delle singole misure indipendenti. Nelle Figura 1, 2 e 3 sono riportati in forma grafica i dati delle misure dei laboratori partecipanti allo studio. I grafici riportano per ciascun laboratorio i valori delle migliori stime del contenuto di COD, espresso in  $\text{mg L}^{-1}$  di  $\text{O}_2$ , con associata l'incertezza riportata dai laboratori. Benchè i risultati dei laboratori siano stati valutati cumulativamente ai fini del calcolo della ripetibilità e riproducibilità, ovvero costituendo un'unica base di dati, i grafici evidenziano le migliori stime raggruppate in ordine crescente e per produttore del test in cuvetta.

**Tabella 2** Risultati delle misure dei laboratori (migliori stime).

	<b>ISPRA RM027</b>	<b>ISPRA RM028</b>	<b>ISPRA RM029</b>
	COD ( $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$ )		
<b>1</b>	40,1	162,8	465,6
<b>2</b>	39,8 ±0,6	170,3 ±1,4	446,5 ±1,7
<b>3</b>	38,5	161,4	461,8
<b>4</b>	40,3	173,0	453,2
<b>5</b>	38,8	164,6	456,0
<b>6</b>	39,2 ±7,2	173,0 ±35,4	458,0 ±58,2
<b>7</b>	39,7 ±14,3	166,0 ±23,0	454,0 ±64,0
<b>8</b>	40,9 ±2,5	172,4 ±11,0	453,2 ±28,0
<b>9</b>	40,6 ±0,8	174,0 ±3,9	456,0 ±9,3
<b>10</b>	40,7 ±2,1	169,4 ±6,5	459,8 ±10,1
<b>11</b>	39,0 ±12,6	166,0 ±24,1	466,0 ±67,6
<b>12</b>	38,8 ±12,5	171,0 ±24,8	457,0 ±66,3
<b>13</b>	38,5	175,4	450,2
<b>14</b>	37,1 ±0,7	160,0 ±3,9	475,0 ±9,3
<b>15</b>	38,6 ±7,2	157,6 ±23,5	452,8 ±57,7
<b>16</b>	39,1 ±0,8	159,0 ±6,9	456,0 ±10,9
<b>17</b>	42,2 ±3,0	174,8 ±8,0	464,4 ±19,0
<b>18</b>	41,5 ±1,7	171,0 ±3,1	464,2 ±7,9
<b>19</b>	41,5 ±4,0	174,0 ±13,0	427,0 ±20,0
<b>21</b>	39,6 ±5,9	166,4 ±8,3	467,0 ±23,3
<b>22</b>	31,0 ±4,0	273,0 ±7,0	465,0 ±16,0
<b>23</b>	38,8 ±7,2	164,2 ±24,4	454,6 ±57,9

(1) Alle miglior stime sono associate le incertezze estese ( $k=2$ , pari a circa il 95% dell'intervallo di fiducia), ove dichiarate

**Tabella 2** Risultati delle misure dei laboratori (migliori stime) - continua

	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
COD (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )						
<b>24</b>	40,2	±8,6	169,0	±12,0	474,0	±20,0
<b>25</b>	37,0		163,0		482,0	
<b>26</b>	38,3	±2,7	150,6	±12,5	454,3	±24,8
<b>27</b>	45,0	±14,0	165,0	±24,0	467,0	±68,0
<b>28</b>	36,0		163,8		439,4	
<b>29</b>	39,0	±7,2	167,0	±24,7	455,6	±58,2
<b>31</b>	35,4	±1,8	113,6	±10,0	334,0	±52,0
<b>32</b>	35,9		171,8		2826,0	
<b>33-lange</b>	38,3	±0,5	168,0	±1,8	469,4	±2,6
<b>33-spec</b>	41,6	±2,2	169,2	±1,0	446,0	±12,8

(2) Alle migliori stime sono associate le incertezze estese (k=2, pari a circa il 95% dell'intervallo di fiducia), ove dichiarate

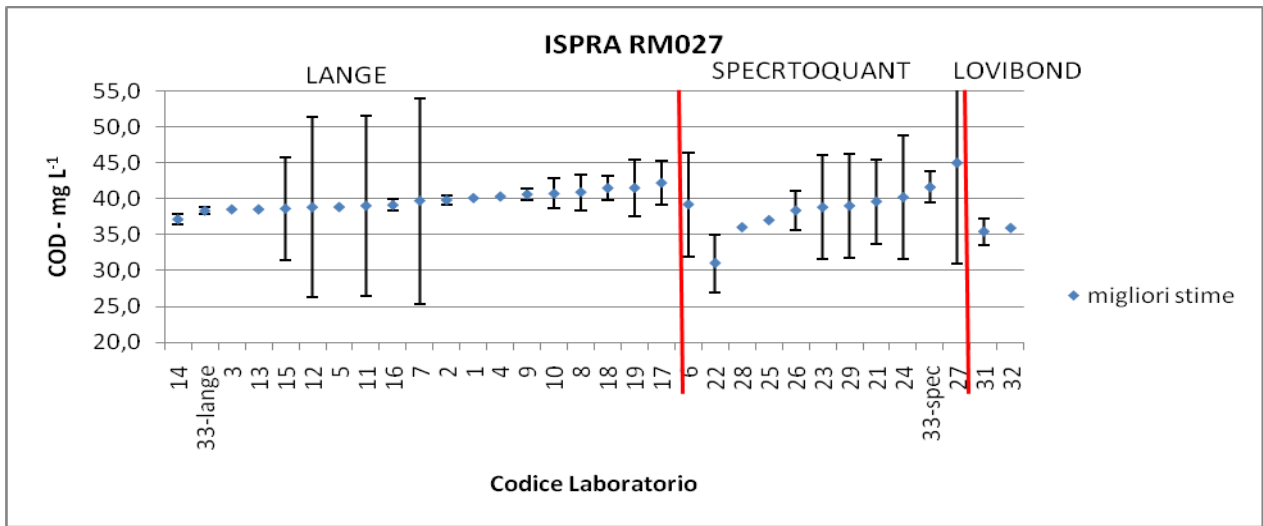
Sulla base dei dati dei laboratori (misure indipendenti e migliori stime) sono stati stimati per ciascun materiale (Tabella 3):

- il valore medio;
- lo scarto tipo percentuale di ripetibilità;
- lo scarto tipo percentuale di riproducibilità.

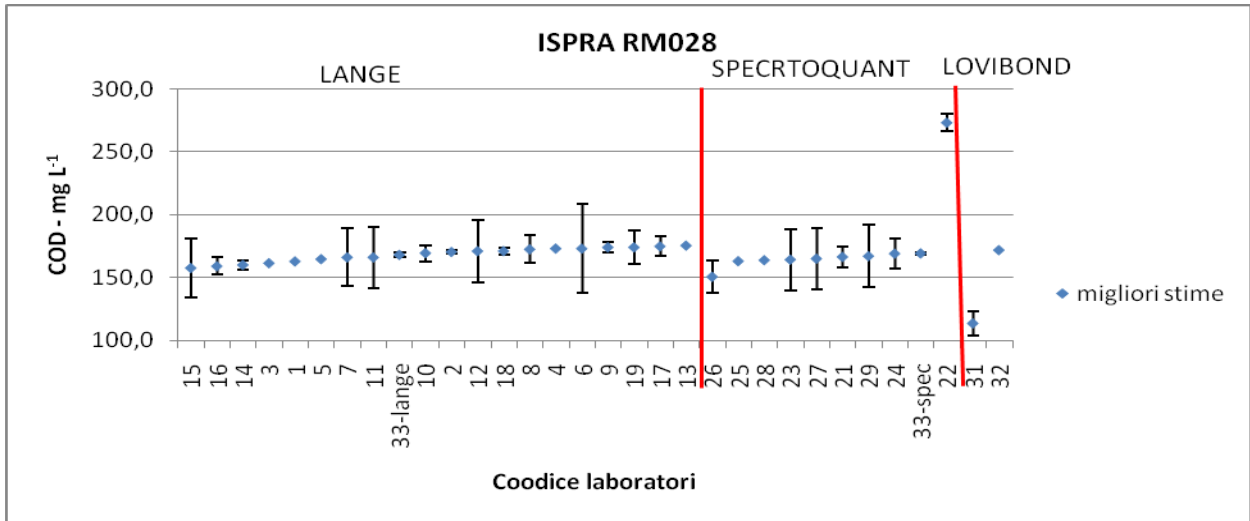
**Tabella 3** – Ripetibilità e Riproducibilità

	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
<b>Valore medio</b> mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	39,1		167,1		459,9	
<b>Sr %</b> Scarto tipo di ripetibilità percentuale	3,4 %	n=30	1,7 %	n=30	1,0 %	n=30
<b>SR %</b> Scarto tipo di riproducibilità percentuale	6,0 %		4,1 %		2,8 %	

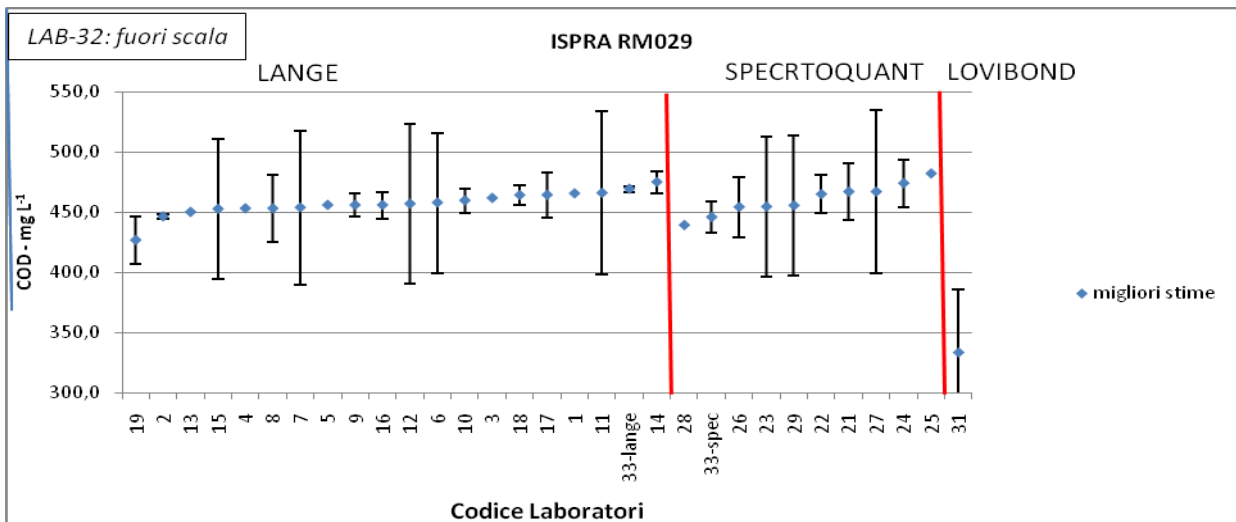
**Figura 1** - Migliori stime dei laboratori per il materiale ISPRA RM027



**Figura 2** - Migliori stime dei laboratori per il materiale ISPRM RM028



**Figura 3** - Migliori stime dei laboratori per il materiale ISPRM RM029





---

## 8. CONCLUSIONI

Lo studio collaborativo si inserisce nell'ambito delle iniziative volte a convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta già utilizzato, in alternativa al metodo APAT-IRSA (5130), nelle analisi di routine da molte Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA).

I risultati dello studio hanno evidenziato, con riferimento a tre materiali di prova costituiti da una matrice acquosa preparata ad-hoc con aggiunta di idrogeno ftalato e livelli di COD differenti, bassi valori di ripetibilità e riproducibilità del metodo (1-3 % per la ripetibilità e 3-6 % per la riproducibilità). Tali valori sono altresì interessanti se confrontati anche con i valori di CV riportati nel Rapporto APAT-IRSA N°29/2003 "Metodi analitici per le acque" per il metodo APAT-IRSA 5130 (< 11%), ottenuti per altro sulla base di 5 misurazioni replicate da un unico laboratorio su una soluzione salina.

In prospettiva appare interessante, verificata l'idoneità dei dati prodotti nell'ambito del presente studio e relativi all'applicazione dei metodi APAT-IRSA e/o degli APHA Standard per la determinazione del contenuto di COD, studiare la possibile equivalenza di tali metodi con i metodi alternativi in cuvetta.

E' stato rilevato, sulla base anche delle esperienze riportate da alcuni laboratori partecipanti, che i valori di ripetibilità e riproducibilità emersi dal circuito, se confrontati con quanto verificabile con campioni reali, potrebbero essere sottostimati. Su tale aspetto, tuttavia, non è emersa una univocità di opinioni tanto tra i laboratori partecipanti che con le ditte produttrici dei metodi in cuvetta. Aspetti quali l'omogenizzazione del campione reale prima della misura, che di prassi dovrebbe essere eseguita nella procedura di misurazione, sono altresì considerati fondamentali e ineludibili per la corretta esecuzione del metodo e per raggiungere valori di ripetibilità accettabili. I campioni reali, infatti, diversamente da una soluzione di riferimento preparata per aggiunte saline, presentano comunemente una intrinseca eterogeneità dovuta alla presenza di interferenti (ad esempio la presenza di solidi sospesi) che, se non adeguatamente tenuta in conto nel processo di misurazione, possono influenzare il risultato della misurazione.

Pertanto, sia da parte di alcuni produttori dei metodi in cuvetta che da parte dei laboratori partecipanti al presente studio collaborativo, è ritenuto utile procedere in futuro con studi collaborativi su campioni reali, possibilmente caratterizzati dalla presenza di solidi sospesi. La fattibilità di tale studio, con particolare riferimento alla preparazione di materiali di prova caratterizzati da diversi ed idonei livelli di concentrazione, nonché in possesso dei necessari requisiti di stabilità, potrà essere verificata dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA.

## 9. RIFERIMENTI

1. M.H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels; "Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study", Accreditation Quality Assurance 6, 257-263, 2001.
2. ISO 5725-2:1994 "Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method".
3. UNICHIM Manuale n.201 Guida per l'utilizzo di test in cuvetta nei controlli della qualità delle acque



## **APPENDICE A**

### **Elenco dei laboratori partecipanti**



## APPENDICE A

<b>Istituzione-Servizio-Laboratorio</b>	<b>Nominativo Referente</b>
AMAP SPA - Reparto Analisi e Controlli	<b>Pietro Mercurio</b>
ARPA Emilia Romagna Sezione Provinciale di Bologna - Laboratorio Acque di Scarico	<b>Cristina Barbieri</b>
ARPA Emilia Romagna - Laboratorio Integrato Area analitica ambientale FERRARA	<b>Ascanelli</b>
ARPA LAZIO Dipartimento di Frosinone - Laboratorio Chimica	<b>Adelina Ruscio</b>
ARPA Liguria U.O. Laboratorio Settore Chimico - Savona	<b>Mara Del Monte</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Bergamo	<b>Augusto Galli</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Cremona	<b>Nicola Gandini</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Mantova	<b>Loredano Fusari</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Milano sede di Parabiago	<b>Laura Clerici</b>
ARPA MARCHE Dipartimento Provinciale di PESARO - U.O. Scarichi Fiumi/Servizio Acque	<b>Cristina Reggiani</b>
ARPA MARCHE Dipartimento Provinciale di Ancona, Servizio Acque	<b>Paola Tombolesi</b>
ARPA Piemonte Attività strumentali di laboratorio - Sede di Cuneo	<b>Cristina Chiorra</b>
ARPA Pimenonte Dipartimento di Torino - S.S. 06.05 - Laboratorio di Grugliasco	<b>Marina Fiorito Gerardo Melchionna</b>
ARPA PIEMONTE Dipartimento Provinciale di Novara Laboratorio Chimico	<b>Nicoletta Pozzi</b>
ARPA Umbria U.O.L.M. Sito PERUGIA	<b>Silvia Cassieri Sandra Luigi Quondam</b>
ARPA Umbria U.O.L.M. Sito TERNI	<b>Alberto Delle Piane</b>
ARPAT Dipartimento di Lucca	<b>Cristina Martines</b>

## APPENDICE A

<b>Istituzione-Servizio-Laboratorio</b>	<b>Nominativo Referente</b>
ARPAT Dipartimento di Pistoia	<b>Nicoletta Vincenzi Andrea Cappelli</b>
ARPAT Dipartimento di Livorno	<b>Lucia Rocchi Francesca Tumminia</b>
ARPAT Dipartimento di Arezzo	<b>Patrizia Bolletti</b>
ARPAT Dipartimento di Firenze, Unità Operativa Attività di Laboratorio	<b>Roberto Signorini Fabrizio Lo Galbo</b>
ARPAV - Dipartimento Laboratori Servizio Provinciale di Verona	<b>Alberto Ogheri</b>
ARPAV - Dipartimento Regionale Laboratori - Laboratorio Provinciale di Venezia	<b>Francesca Zanon</b>
ARTA ABRUZZO Dipartimento Provinciale di Teramo	<b>Daniela Cicconetti</b>
ARTA ABRUZZO Dipartimento Provinciale Chieti	<b>Fabrizio Cornacchia</b>
Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) - Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA)	<b>Silvio Capri</b>
ECAM srl - Laboratorio Chimico	<b>Daniele Funcis</b>
HERA SPA - Direzione Ciclo Idrico-Laboratori, Unità di Forlì	<b>Beatrice Montanari</b>
ITALGELATINE SpA	<b>Chafic Abou Mrad</b>
LIAG srl - Laboratorio analisi Imperia	<b>Simona Martino</b>
TECNOLOGIE D'IMPRESA Srl	<b>Rosi Cermenati</b>





**APPENDICE B**  
**Protocollo dello studio collaborativo**



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# **PROTOCOLLO ISPRA SC004**

## **STUDIO COLLABORATIVO PER LA CONVALIDA DEL PROCEDIMENTO DI MISURAZIONE DEL COD CON IL METODO IN CUVETTA**

**Febbraio 2010**

*Lo studio collaborativo ISPRA-SC004 è organizzato in collaborazione con  
CNR-IRSA, Hach Lange, ITALSCIENTIFICA SpA - GRUPPO ITALINVEST e VWR International s.r.l.*





## INDICE:

<b>Sezione</b>	<b>TITOLO</b>	<b>pagina</b>
1	Descrizione	3
2	Scopo	3
3	Destinatari	4
4	Regole generali	4
5	Calendario attività	4
6	Materiale di Prova	5
6.1	Oggetti di prova - ISPRA RM027 - ISPRA RM028 - ISPRA RM029	5
6.2	Parametri	6
6.3	Modalità di esecuzione	6
7	Scheda dei Risultati	7
8	Elaborazione statistica	8
9	Rapporto conclusivo	8
10	Informazioni sulla riservatezza	8
11	Costi	8
12	Riferimenti	9

### 1) DESCRIZIONE

ISPRA, con la collaborazione di CNR-IRSA, Hach Lange, ITALSCIENTIFICA SpA - GRUPPO ITALINVEST e VWR International s.r.l., ha promosso un'iniziativa mirata a definire e convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta. Tale iniziativa nasce nell'ambito di una collaborazione con le Ditte sopracitate per convalidare il metodo già utilizzato nelle analisi di routine da molte Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA).

Lo studio prevede l'invio di tre diversi tipi di Materiale di Prova prodotti dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA (ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM029) ciascuno caratterizzato da livelli diversi di contaminazione da sostanza organica.

Il presente Protocollo disciplina le modalità di esecuzione dello studio collaborativo.

### 2) SCOPO

Il presente studio collaborativo (SC) è finalizzato alla convalida del metodo per la determinazione del COD con il metodo in cuvetta. Si intende proporre, sulla base delle norme esistenti e delle esperienze maturate a livello nazionale, un metodo ufficiale per la determinazione del COD per la matrice acquosa più speditivo ma con idonei requisiti di qualità delle prestazioni (ripetibilità, riproducibilità, etc.).

### 3) DESTINATARI

Allo studio partecipano i laboratori esperti nella misura di COD individuati, in accordo ad ISPRA, dalle Ditte fornitrici dei materiali per il test in cuvetta ed appartenenti alle ARPA/APPA nonché a strutture private.

### 4) REGOLE GENERALI

I laboratori interessati alla partecipazione trasmettono direttamente ad ISPRA la Scheda di Adesione che è loro inviata unitamente al presente Protocollo.

L'adesione allo studio collaborativo implica che le strutture partecipanti allo studio garantiscano l'analisi di tutti i materiali di prova.

I materiali di prova sono costituiti da soluzioni acquose denominate specificatamente:

- ISPRA RM027;
- ISPRA RM028;
- ISPRA RM029.

Dettagli circa le caratteristiche dei materiali di prova sono riportati nel Paragrafo 6.1.

Ad ogni laboratorio partecipante viene attribuito un codice identificativo a cui saranno associati i propri risultati.

I partecipanti effettueranno le misure e restituiranno i dati sperimentali, unitamente ad informazioni riguardanti la procedura di misura utilizzata, attraverso la Scheda Risultati da restituire ad ISPRA entro i termini temporali fissati nel calendario delle attività (Sezione 5).

Prima dell'elaborazione dei dati sperimentali, l'organizzatore dello studio collaborativo può chiedere eventualmente ai laboratori partecipanti conferma dei dati trasmessi.

Ad ogni partecipante sarà inviata, dopo l'elaborazione dei dati sperimentali, una Bozza del Rapporto Conclusivo con le valutazioni statistiche.

### 5) CALENDARIO ATTIVITA'

Lo SC si svolge secondo la tempistica sotto riportata:

<b>entro 20 febbraio 2010:</b> ISPRA invia tramite e-mail ai laboratori partecipanti allo studio collaborativo: a) Protocollo dello studio collaborativo; b) Scheda di adesione
<b>27 febbraio 2010:</b> data ultima di restituzione delle Schede di Adesione compilate dai laboratori ad ISPRA ( <a href="mailto:sc004@isprambiente.it">sc004@isprambiente.it</a> )
<b>Entro 15 marzo 2010:</b> Spedizione tramite corriere, in accordo con le Ditte fornitrici del materiale per l'esecuzione del test in cuvetta, dei Materiali di Prova ai laboratori partecipanti
<b>30 marzo 2010:</b> Trasmissione ad ISPRA ( <a href="mailto:sc004@isprambiente.it">sc004@isprambiente.it</a> ) da parte dei laboratori partecipanti della Scheda Risultati contenente i risultati delle misure effettuate sui materiali di prova.

**Entro settembre 2010:** Invio della Bozza del Rapporto Conclusivo ai laboratori partecipanti.

**Entro ottobre 2010:** Presentazione dell'elaborazione statistica e discussione dei risultati tra tutti i partecipanti allo studio collaborativo in una riunione organizzata da ISPRA.

## **6) MATERIALE DI PROVA**

Per eseguire la convalida del metodo per la determinazione del COD ciascun laboratorio partecipante riceverà:

- 1 unità di ISPRA RM027;
- 1 unità di ISPRA RM028;
- 1 unità di ISPRA RM029;
- materiale per l'esecuzione del test del COD in cuvetta.

Ogni unità contiene circa 100 mL di soluzione acquosa acidificata con acido solforico a pH 1-2.

### **6.1 Oggetti di prova - ISPRA RM027 - ISPRA RM028 - ISPRA RM029**

Il materiale di prova è stato prodotto dal Servizio Metrologia Ambientale e preparato presso i laboratori di Castel Romano. Il materiale è contenuto in bottiglie di vetro scuro con un volume di circa 100 mL.

Sono state condotte prove finalizzate a valutare il grado di omogeneità delle unità prodotte e saranno condotte prove di stabilità in condizioni isocrone a diverse temperature durante tutto il periodo di svolgimento dello studio collaborativo.

*Una volta ricevuto il materiale e prima dell'esecuzione della determinazione del COD, è cura del laboratorio partecipante provvedere a conservare tale materiale nel suo contenitore di origine, sigillato, al buio e ad una temperatura di circa +4°C ed analizzarlo il prima possibile e comunque entro 48h dal ricevimento.*

### **6.2 Parametri**

In tutti i materiali di prova deve essere quantificato il contenuto di COD come riportato nella Tabella 1.

**Tabella 1**

Parametro	UNITÀ DI MISURA	N° di cifre decimali
COD	mg L <sup>-1</sup>	1

Le concentrazioni in massa attese sono da intendersi comprese tra:

- 6 - 40 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM027);
- 60-300 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM028);
- 400 - 1000 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM029).

### 6.3 Modalità di esecuzione della prova

I Laboratori partecipanti allo studio collaborativo devono condurre le analisi seguendo scrupolosamente tutte le fasi della procedura di prova che sarà fornita dalla Ditta unitamente al materiale per l'esecuzione del test in cuvetta.

Riportare sulla Scheda Risultati (Sezione 7) la data di ricevimento, quella di analisi ed il numero della bottiglia ricevuta di cui si sta eseguendo l'analisi.

*Per una corretta elaborazione statistica e analisi dei risultati è necessario che i laboratori eseguano la prova seguendo scrupolosamente la procedura allegata al materiale per l'esecuzione del test in cuvetta fornito dalle Ditte nonché le ulteriori indicazioni riportate di seguito:*

- omogeneizzare il materiale di prova per circa un minuto prima di utilizzarlo
- eseguire **cinque (5) misure indipendenti** per ogni materiale di prova;
- da ogni materiale di prova prelevare la **quantità** definita all'interno delle procedure per l'esecuzione del test in cuvetta;
- l'analisi delle **5 misure indipendenti** per ogni materiale di prova deve avvenire in condizioni di ripetibilità ristretta (stesso operatore, stessa sequenza analitica, senza alcuna ritaratura intermedia dello strumento);
- la digestione deve essere condotta alla temperatura di **148°C per 2 ore**;
- eseguire **almeno un bianco procedurale** per ogni materiale di prova;
- valutare l'eventuale contaminazione del bianco **prima** di eseguire l'analisi di tutto il gruppo di prove relativo a ciascun materiale di prova.

L'espressione dei risultati sperimentali (unità di misura, numero di cifre decimali) deve essere effettuata secondo le indicazioni riportate nella Tabella 1 al paragrafo 6.1.

Riportare la determinazione del [LOQ] come valore numerico del Limite di Quantificazione e riportare le modalità di calcolo all'interno delle note.

Per i laboratori che vogliono provare contemporaneamente al metodo in cuvetta, anche il metodo APAT-IRSA 5130 (Manuale APAT-IRSA, Vol 29/2003), questi dovranno richiedere anticipatamente ad ISPRA ([sc004sprambiente.it](http://sc004sprambiente.it)), contestualmente alla adesione allo studio collaborativo, una quantità doppia dei materiali di prova e



condurre le prove, sempre seguendo le indicazioni del presente protocollo. Nel caso dovranno essere riempite due diverse Schede Risultati.

## **7) SCHEDA DEI RISULTATI**

La scheda dei risultati sottoforma di file Excel (ad esempio LAB-02.xls) sarà resa disponibile in un'area riservata del web ISPRA, con accesso limitato tramite username e password. Le istruzioni circa le modalità di accesso e di utilizzo dell'area riservata saranno fornite ai laboratori prima dell'avvio dello studio collaborativo.

Il file Excel è composto da sette (7) fogli in cui la parte di colore verde viene compilata dall'organizzatore e la parte in colore giallo/arancione viene compilata dal laboratorio partecipante. La struttura della scheda è la seguente:

- **Foglio 1** - "Generalità" del Laboratorio partecipante: viene compilato principalmente dall'organizzatore, per un riscontro sull'esattezza dei dati inviati; i partecipanti possono apportare eventuali correzioni se necessario. Viene inoltre assegnato il codice identificativo del Laboratorio partecipante;
- **Foglio 2** - "RM027" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- **Foglio 3** - "RM028" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- **Foglio 4** - "RM029" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- **Foglio 5** - "Procedure di Misura": il partecipante deve fornire, compilando i campi disponibili:
  - a. informazioni sulla strumentazione utilizzata;
  - b. eventuali commenti sulla procedura di misura utilizzata;
  - c. le informazioni riguardo irregolarità o problemi avvenuti durante le analisi (da riportare nelle note);
- **Foglio 6** - "Bianco": specificare il tipo di bianco analizzato, riportare il dato sulla contaminazione e se tale dato è stato sottratto alla misura del campione;
- **Foglio 7** - "Incertezza": contiene un campo da compilare a cura del laboratorio con informazioni circa la modalità di calcolo dell'incertezza di misura (metodo, fattore di copertura, etc.).

Le Schede Risultati vanno restituite compilate ad ISPRA entro e non oltre il 30 MARZO 2010 al seguente indirizzo e-mail: [sc004sprambiente.it](mailto:sc004sprambiente.it).

Le schede dovranno inoltre essere caricate sull'area web riservata seguendo le istruzioni che saranno fornite ai laboratori da ISPRA.

### **8) ELABORAZIONE STATISTICA**

I dati analitici forniti dai Laboratori partecipanti saranno analizzati secondo la norma ISO 5725-2:1994 .

I risultati sperimentali saranno evidenziati anche per via grafica:

- Range Bar-graph;
- Youden plot.

### **9) RAPPORTO CONCLUSIVO**

Bozza del Rapporto Conclusivo, che contiene i risultati dell'elaborazione statistica sarà inviata per commenti ai laboratori partecipanti e alle Ditte produttrici dei test in cuvetta entro settembre 2010.

### **10) INFORMAZIONI SULLA RISERVATEZZA**

E' garantita la confidenzialità dei risultati in quanto ogni partecipante sarà registrato con un codice noto ad ISPRA e al Referente del laboratorio partecipante.

### **11) COSTI**

Nessun costo di iscrizione e spedizione dei materiali di prova.

### **12) RIFERIMENTI**

1. ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method;
2. UNICHIM Manuale n.201 Guida per l'utilizzo di test in cuvetta nei controlli della qualità delle acque.

Per ogni ulteriore chiarimento, fare riferimento a:

ISPRA- Servizio Metrologia Ambientale  
Via di Castel Romano, 100 - 00128 ROMA  
Tel: 06/5007.3228/3211 - Fax: 06/5050519  
e-mail:

[sc004@isprambiente.it](mailto:sc004@isprambiente.it)

[stefania.balzamo@isprambiente.it](mailto:stefania.balzamo@isprambiente.it)

[paolo.dezorzi@isprambiente.it](mailto:paolo.dezorzi@isprambiente.it)



## **APPENDICE C**

**Protocolli dei test in cuvetta forniti dalle Ditte:**

**LCK414, 515, 614**

**Spectroquant 11450, 114895, 114541**

**Lovibond LR, MR e HR**

[VEDERE FILE ALLEGATI]

**APPENDICE D**  
**Prove di stabilità**

## VALUTAZIONE DELLA STABILITA' A BREVE TERMINE

Le prove di stabilità nel breve termine sono effettuate per un periodo di 8 giorni. Lo studio di stabilità mediante prova "isocrona", in cui tutte le unità sono misurate in condizioni di ripetibilità, copre il trasporto, la conservazione del materiale in laboratorio ed il tempo di esecuzione delle misure. Il tempo di inizio delle prove di stabilità coincide con l'invio/consegna dei materiali di prova ai laboratori partecipanti. Per ciascun materiale di riferimento, la procedura isocrona seguita è la seguente:

1. selezionare 20 unità in modo casuale.
2. selezionare, in modo casuale, 15 unità e riportarle alla temperatura di riferimento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) – gruppo di riferimento.
3. mettere 5 unità a  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$
4. dopo 2 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$
5. dopo 5 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$
6. dopo 8 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a temperatura ambiente insieme a tutte le unità che si trovano a  $+20^{\circ}\text{C}$  e lasciare che le unità raggiungano la temperatura ambiente.

A conclusione della prova si avranno 4 gruppi di unità:

- gruppo A: 5 unità mantenute a temperatura costante di  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 3 giorni
- gruppo B: 5 unità mantenute a temperatura costante di  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 6 giorni
- gruppo C: 5 unità mantenute a temperatura costante di  $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 8 giorni
- gruppo D: 5 unità mantenute a temperatura costante di riferimento per 8 giorni (gruppo di riferimento)

Eeguire le misurazioni in condizioni di ripetibilità. Per ogni tempo  $t$  abbiamo 5 risultati delle misurazioni effettuate su 5 unità. Utilizzando la regressione lineare delle frazioni (o concentrazioni) in massa del valore della proprietà d'interesse ( $Y_i$ =valore medio delle 5 unità) in funzione del tempo si ricava la stima del coefficiente angolare della retta dato da:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})^2}$$

Dove  $X_i$  = tempo  $i$ -simo. La stima dell'intercetta è:

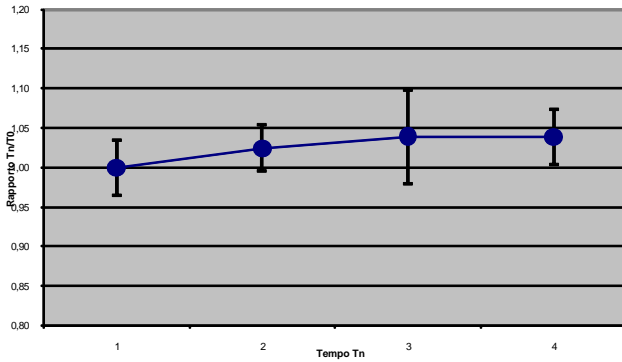
$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^3 (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad \text{ed} \quad s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})^2}}$$

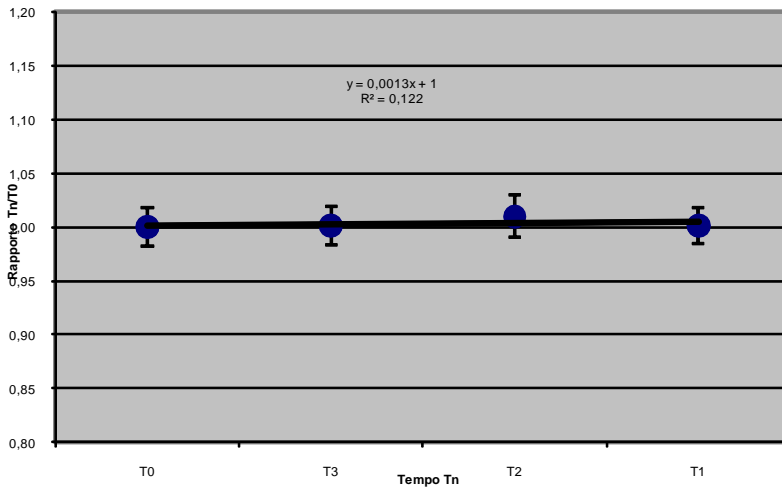
Confrontando il fattore  $t$  di Student per  $n-2$  gradi di libertà e  $\alpha=0,05$  (con un livello di confidenza del 95%) con la pendenza si verifica la presenza di eventuali decomposizioni del materiale. Quando:

$$|b_1| \leq t_{0,95;n-2} \cdot s(b_1) \quad \text{il materiale si considera stabile.}$$

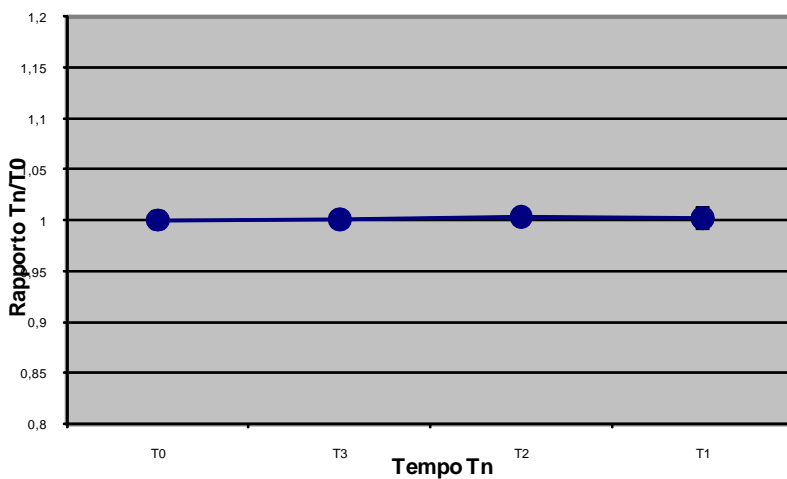
**Figura 1. Stabilità - RM027**



**Figura 2. Stabilità - RM028**



**Figura 3. Stabilità - ISPRA RM029**



I singoli punti di ogni grafico rappresentano il rapporto Tn/T0 fra il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti allo stesso intervallo di tempo (T1, T2 e T3) e il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti al gruppo di riferimento (T0).





## **APPENDICE E**

### **Risultati delle misure dei laboratori**

**ISPRA RM027**

**ISPRA RM028**

**ISPRA RM029**

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE**

LAB	Unità di misura	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
		COD		COD		COD	
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
		Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc
1	misura 1	39,0		169,0		463,0	
	misura 2	40,4		161,0		460,0	
	misura 3	39,4		164,0		458,0	
	misura 4	40,0		155,0		476,0	
	misura 5	41,6		165,0		472,0	
2	misura 1	39,6		167,7		448,7	
	misura 2	40,8		170,7		447,7	
	misura 3	40,1		171,7		446,7	
	misura 4	39,2		170,7		444,7	
	misura 5	39,5		170,7		444,7	
3	misura 1	39,2		166,0		460,0	
	misura 2	38,3		161,0		461,0	
	misura 3	38,5		163,0		463,0	
	misura 4	38,0		159,0		465,0	
	misura 5	38,5		158,0		460,0	
4	misura 1	40,3		172,0		452,0	
	misura 2	40,1		173,0		455,0	
	misura 3	40,5		173,0		451,0	
	misura 4	41,2		173,0		453,0	
	misura 5	39,6		174,0		455,0	
5	misura 1	38,7		165,0		454,0	
	misura 2	38,8		167,0		458,0	
	misura 3	38,4		161,0		456,0	
	misura 4	38,8		163,0		454,0	
	misura 5	39,4		167,0		458,0	
6	misura 1	39,6	7,2	176,0	25,8	458,0	58,2
	misura 2	39,1	7,2	174,0	25,6	458,0	58,2
	misura 3	39,1	7,2	175,0	25,6	459,0	58,4
	misura 4	38,6	7,0	172,0	25,2	458,0	58,2
	misura 5	39,7	7,2	168,0	24,8	458,0	58,2

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE (CONTINUA)**

LAB	Unità di misura	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
		COD		COD		COD	
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
		Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc
7	misura 1	39,7	14,3	165,0	23	457,0	64
	misura 2	39,2	14,1	169,0	24	451,0	63
	misura 3	39,7	14,3	164,0	23	453,0	63
	misura 4	39,8	14,3	164,0	23	454,0	64
	misura 5	39,7	14,3	167,0	23	455,0	64
8	misura 1	41,4	2,9	170,0	14,0	453,0	32,3
	misura 2	41,0	2,9	170,0	14,0	455,0	32,3
	misura 3	40,8	2,9	174,0	14,4	454,0	32,3
	misura 4	40,6	2,9	173,0	14,0	448,0	32,3
	misura 5	40,7	2,9	175,0	14,0	456,0	32,3
9	misura 1	39,9	0,8	173,0	3,9	451,0	9,3
	misura 2	41,2	0,8	170,0	3,9	453,0	9,3
	misura 3	40,2	0,8	174,0	3,9	457,0	9,3
	misura 4	41,0	0,8	173,0	3,9	450,0	9,3
	misura 5	40,8	0,8	174,0	3,9	456,0	9,3
10	misura 1	41,0	2,1	169,0	6,4	461,0	10,1
	misura 2	40,0	2,0	168,0	6,4	462,0	10,2
	misura 3	41,4	2,1	169,0	6,4	459,0	10,1
	misura 4	40,6	2,1	171,0	6,5	459,0	10,1
	misura 5	40,7	2,1	170,0	6,5	458,0	10,1
11	misura 1	39,4	12,7	170,0	24,6	463,0	67,1
	misura 2	39,0	12,6	167,0	24,2	472,0	68,4
	misura 3	38,8	12,5	162,0	23,5	466,0	67,6
	misura 4	39,0	12,6	165,0	23,9	467,0	67,7
	misura 5	38,8	12,5	164,0	23,8	461,0	66,8
12	misura 1	38,6	12,5	173,0	25,1	457,0	66,3
	misura 2	38,0	12,3	172,0	24,9	462,0	67,0
	misura 3	38,6	12,5	172,0	24,9	452,0	65,5
	misura 4	40,2	13,0	171,0	24,8	458,0	66,4
	misura 5	38,8	12,5	169,0	24,5	456,0	66,1

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE (CONTINUA)**

LAB	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029		
	COD		COD		COD		
	Unità di misura	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
	Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc	
13	misura 1	38,7		177,8		451,7	
	misura 2	39,1		180,3		455,4	
	misura 3	38,2		180,0		455,0	
	misura 4	38,5		172,5		442,6	
	misura 5	37,9		166,5		446,2	
14	misura 1	36,1	0,7	162,0	3,9	477,0	9,3
	misura 2	36,9	0,7	160,0	3,9	475,0	9,3
	misura 3	38,8	0,7	164,0	3,9	474,0	9,3
	misura 4	37,2	0,7	157,0	3,9	474,0	9,3
	misura 5	36,3	0,7	157,0	3,9	475,0	9,3
15	misura 1	38	7,0	150,0	22,6	453,0	57,7
	misura 2	39,2	7,2	157,0	23,5	453,0	57,7
	misura 3	38	7,0	160,0	23,8	459,0	58,4
	misura 4	38,9	7,2	162,0	24,1	445,0	56,9
	misura 5	39	7,2	159,0	23,7	454,0	57,8
16	misura 1	38,7	0,8	161,0	6,9	462,0	10,9
	misura 2	39,2	0,8	161,0	6,9	458,0	10,9
	misura 3	39,0	0,8	156,0	6,9	453,0	10,9
	misura 4	39,4	0,8	157,0	6,9	454,0	10,9
	misura 5	39,3	0,8	161,0	6,9	453,0	10,9
17	misura 1	42,0	3,0	173,0	8,0	471,0	19,0
	misura 2	41,7	3,0	171,0	8,0	466,0	19,0
	misura 3	42,8	3,0	177,0	8,0	463,0	19,0
	misura 4	42,4	3,0	176,0	8,0	458,0	19,0
	misura 5	42,0	3,0	177,0	8,0	464,0	19,0
18	misura 1	41,4	1,7	171,0	3,1	468,0	8,0
	misura 2	41,1	1,6	171,0	3,1	460,0	7,8
	misura 3	41,6	1,7	169,0	3,0	467,0	7,9
	misura 4	41,4	1,7	171,0	3,1	462,0	7,9
	misura 5	41,9	1,7	173,0	3,1	464,0	7,9

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE (CONTINUA)**

LAB	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029		
	COD		COD		COD		
	Unità di misura	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
	Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc	
19	misura 1	42,0	4,0	173,0	13,0	427,0	20,0
	misura 2	41,7	4,0	177,0	13,0	424,0	20,0
	misura 3	41,3	4,0	174,0	13,0	429,0	20,0
	misura 4	41,5	4,0	176,0	13,0	425,0	20,0
	misura 5	40,9	4,0	174,0	13,0	427,0	20,0
21	misura 1	40,0	6,0	169,0	8,5	463,0	23,2
	misura 2	40,0	6,0	166,0	8,3	470,0	23,5
	misura 3	37,0	5,6	165,0	8,3	464,0	23,2
	misura 4	42,0	6,3	166,0	8,3	468,0	23,4
	misura 5	39,0	5,9	166,0	8,3	470,0	23,5
22	misura 1	28,0	4,0	272,0	7,0	462,0	16,0
	misura 2	28,0	4,0	273,0	7,0	472,0	16,0
	misura 3	31,0	4,0	272,0	7,0	464,0	16,0
	misura 4	36,0	4,0	277,0	7,0	468,0	16,0
	misura 5	31,0	4,0	269,0	7,0	464,0	16,0
23	misura 1	40,0	7,3	163,0	24,2	456,0	58,0
	misura 2	37,0	6,9	163,0	24,2	460,0	58,5
	misura 3	40,0	7,3	163,0	24,2	449,0	57,3
	misura 4	38,0	7,0	164,0	24,3	461,0	58,6
	misura 5	39,0	7,2	168,0	24,9	447,0	57,1
24	misura 1	40,2	8,6	174,0	12	475,0	20
	misura 2	40,3	8,6	168,0	12	482,0	20
	misura 3	40,8	8,6	170,0	12	480,0	20
	misura 4	39,6	8,6	168,0	±12	468,0	20
	misura 5	40,3	8,6	167,0	12	467,0	20
25	misura 1	30,0		165,0		487,0	
	misura 2	38,0		165,0		478,0	
	misura 3	32,0		163,0		482,0	
	misura 4	37,0		158,0		486,0	
	misura 5	37,0		163,0		478,0	

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE (CONTINUA)**

LAB	Unità di misura	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
		COD		COD		COD	
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
		Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc
26	misura 1	38,3		152,2		457,4	
	misura 2	36,0		147,7		451,7	
	misura 3	41,2		151,1		453,2	
	misura 4	37,3		147,9		454,4	
	misura 5	39,0		154,1		454,8	
27	misura 1	45,0	14,0	164,0	24,0	465,0	67,0
	misura 2	45,0	14,0	163,0	24,0	465,0	67,0
	misura 3	44,0	14,0	165,0	24,0	465,0	67,0
	misura 4	45,0	14,0	165,0	24,0	472,0	68,0
	misura 5	46,0	15,0	166,0	24,0	466,0	68,0
28	misura 1	36,0		162,0		438,0	
	misura 2	38,0		161,0		455,0	
	misura 3	38,0		168,0		432,0	
	misura 4	35,0		163,0		439,0	
	misura 5	33,0		165,0		433,0	
29	misura 1	38,1		163,2		455,3	
	misura 2	32,0		165,4		457,5	
	misura 3	41,2		173,0		453,0	
	misura 4	42,0		165,2		457,5	
	misura 5	38,8		168,1		452,2	
31	misura 1	35,0	1,8	114,0	10,0	320,0	52,0
	misura 2	35,0	1,8	120,0	10,0	360,0	52,0
	misura 3	35,0	1,8	106,0	10,0	360,0	52,0
	misura 4	35,0	1,8	114,0	10,0	330,0	52,0
	misura 5	37,0	1,8	114,0	10,0	300,0	52,0
32	misura 1	39,2		167,0		2880,0	
	misura 2	35,8		178,0		2840,0	
	misura 3	34,8		169,0		2810,0	
	misura 4	35,9		173,0		2820,0	
	misura 5	33,9		172,0		2780,0	

**TABELLA 1 – RISULTATI DELLE MISURE (CONTINUA)**

LAB	Unità di misura	ISPRA RM027		ISPRA RM028		ISPRA RM029	
		COD		COD		COD	
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	
		Valore	Inc	Valore	Inc	Valore	Inc
33-1 (1)	misura 1	38,8		169,0		471,0	
	misura 2	37,8		169,0		472,0	
	misura 3	38,3		169,0		468,0	
	misura 4	38,4		166,0		467,0	
	misura 5	38,4		167,0		469,0	
33-2 (2)	misura 1	43,0		168,0		438,0	
	misura 2	41,0		169,0		454,0	
	misura 3	40,0		169,0		440,0	
	misura 4	41,0		170,0		460,0	
	misura 5	43,0		170,0		438,0	

(1) Misure eseguite con test Lange

(2) Misure eseguite con test Spectroquant





**ISPRA**  
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

*Studio Collaborativo*  
*ISPRA-SC005*  
*per la convalida del procedimento di*  
*misurazione del COD con il metodo in*  
*cuvetta in acque reflue*

*Rapporto Conclusivo*

Settembre 2012

ISPRA, Servizio Metrologia Ambientale – Via Castel Romano, 100 – 00128 Roma

a cura di :

**Paolo de Zorzi, Stefania Balzamo, Sabrina Barbizzi, Maria Belli, Elisa Calabretta, Teresa Guagnini, Monica Potalivo, Silvia Rosamilia, Vanessa Ubaldi**

## INDICE

#	CAPITOLI	PAGINA
	Indice	2
1	Introduzione	3
2	Destinatari	3
3	Acronimi e abbreviazioni	3
4	Materiale di prova	4
4.1	ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM029	4
4.2	Prove di omogeneità dei materiali di riferimento	4
4.3	Prove di stabilità dei materiali di riferimento	4
5	Modalità di esecuzione dello studio collaborativo	5
6	Elaborazione statistica dei risultati	5
6.1	Test di equivalenza con metodo APAT-IRSA 5130	6
7	Risultati	7
8	Conclusioni	10
9	Riferimenti	11
	Appendici	
	Appendice A Elenco dei laboratori partecipanti	12
	Appendice B Prove di stabilità	15
	Appendice C Protocollo dello studio collaborativo	18
	Appendice D Risultati delle misure ISPRA RM036, ISPRA RM037, ISPRA RM038	28

## 1. INTRODUZIONE

Il Rapporto APAT-IRSA N°29/2003 “Metodi analitici per le acque” riporta un metodo ufficiale per la determinazione della richiesta chimica di ossigeno (COD). Il metodo 5130 è basato sull’ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche presenti nelle acque, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento; l’eccesso di dicromato è titolato con solfato di ammonio e ferro. Il metodo, in funzione della concentrazione presumibile di COD (> 50 mg L-1 e compresa tra 20 e 50 mg L-1), nonché della presenza di cloruri in concentrazioni > 1000 mg L-1, prevede diversi procedimenti e/o modifiche.

Nel 2010 ISPRA, con la collaborazione di HACH LANGE s.r.l., Italscientifica s.p.a. - Gruppo Italinvest e VWR International PBI s.r.l., ha condotto un primo studio collaborativo (ISPRA SC004) mirato a definire e convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta già utilizzato. Lo studio, a cui hanno partecipato laboratori delle ARPA/APPA normalmente utilizzatrici dei test in cuvetta in alternativa al metodo APAT-IRSA 5130, è stato condotto su un campione di acqua ultrapura acidificata con acido solforico e con aggiunta di ftalato di potassio. I risultati dello studio ISPRA SC004 e la discussione che ne è seguita con i laboratori e con le ditte fornitrici e produttrici dei test in cuvetta hanno suggerito di procedere ad un nuovo studio collaborativo su campioni reali, caratterizzati dalla presenza di solidi sospesi e diversi livelli di concentrazione di COD. Le caratteristiche intrinseche di maggiore eterogeneità dei campioni reali in presenza di solidi sospesi rispetto a quelli sintetici, con la conseguente necessità di operare per ridurla preliminarmente alla misura, possono determinare variazioni dei valori di ripetibilità e riproducibilità. La prospettiva generale è di proporre, sulla base delle norme esistenti e delle esperienze maturate a livello nazionale, un metodo ufficiale per la determinazione del COD per la matrice acquosa più speditivo ma con idonei requisiti di qualità delle prestazioni (ripetibilità, riproducibilità), in vista anche della revisione in corso del Rapporto APAT-IRSA N°29/2003 “Metodi analitici per le acque”. Il presente studio collaborativo si è avvalso della collaborazione delle ditte HACH LANGE s.r.l., Italscientifica s.p.a. - Gruppo Italinvest e VWR International PBI s.r.l. che si sono rese disponibili a fornire gratuitamente ai laboratori partecipanti il materiale (kit) per l’esecuzione dei metodi in cuvetta.

## 2. DESTINATARI

Allo studio hanno partecipato i laboratori esperti nella misura di COD individuati, in accordo ad ISPRA, dalle Ditte fornitrici dei materiali per il test in cuvetta ed appartenenti alle ARPA/APPA nonché a strutture private.

Il presente documento illustra i risultati dello studio collaborativo, denominato ISPRA SC005.

Lo studio ha avuto inizio il 21 marzo 2012 e si è concluso il 30 aprile 2012 con la consegna dei risultati da parte dei laboratori partecipanti. Il presente rapporto è redatto a valle di una riunione di valutazione dei risultati delle misure con la partecipazione delle Ditte fornitrici dei materiali per le prove in cuvetta e gli organizzatori dello studio stesso.

Allo studio collaborativo hanno partecipato 39 laboratori, ognuno dei quali ha ricevuto i materiali di prova da ISPRA e il materiale per la conduzione delle prove in cuvetta dalle Ditte produttrici. In APPENDICE A è riportato l’elenco dei laboratori partecipanti.

## 3. ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

<b>ISPRA</b>	<b>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale</b>
<b>ARPA/APPA</b>	<b>Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale – Agenzia Provinciale per la Protezione dell’Ambiente</b>
<b>SC</b>	<b>Studio Collaborativo</b>

#### 4. MATERIALI DI RIFERIMENTO

##### 4.1. ISPRA RM036, ISPRA RM037 E ISPRA RM038

Il procedimento di convalida è eseguito su tre materiali di prova caratterizzati da diversi livelli di concentrazione. I materiali di riferimento oggetto della prova, denominati ISPRA RM036, ISPRA RM037 e ISPRA RM038, prodotti presso il Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA, sono costituiti rispettivamente da campioni reali acidificati con acido solforico a pH 1-2:

- ISPRA RM036: acque reflue urbane;
- ISPRA RM037: acque reflue urbane;
- ISPRA RM038: acque reflue industriali

Per ciascun materiale di riferimento è stato prodotto un quantitativo di circa 15 L, da cui sono state prodotte, senza soluzione di continuità, 90 bottiglie contenenti ognuna circa 150 mL di campione. Il materiale è stato confezionato in bottiglie di vetro scuro da 200 mL con tappo a vite. Dalla totalità delle bottiglie ne è stato prelevato un numero statisticamente significativo per l'esecuzione delle successive prove di omogeneità e stabilità (Paragrafi 4.2 e 4.3). I materiali di prova sono caratterizzati dai seguenti livelli di COD:

- 500 – 1500 mg L<sup>-1</sup> ISPRA RM036;
- 200 – 600 mg L<sup>-1</sup> ISPRA RM037
- 300 – 1000 mg L<sup>-1</sup> ISPRA RM038

##### 4.2. PROVE DI OMOGENEITÀ DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO

E' stata condotta la valutazione dell'omogeneità dei materiali preparati dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA (ISPRA RM036, ISPRA RM037 e ISPRA RM038) e utilizzati per lo studio collaborativo. Sui tre materiali sono state effettuate prove per la valutazione dell'omogeneità tra-bottiglie effettuando misure di COD con il metodo in cuvetta. Le Ditte che hanno collaborato allo svolgimento dello studio collaborativo hanno fornito i materiali (kit) per la esecuzione del metodo in cuvetta con medesimo numero di lotto rispetto a quello consegnato ai laboratori.

Il metodo per la valutazione segue la procedura interna del Servizio che prevede, per ogni materiale di prova, l'analisi in condizioni di ripetibilità (in una singola sessione analitica) di 10 unità analizzate in triplicato.

L'omogeneità tra-bottiglie è stata quindi valutata tramite l'Analisi della Varianza (ANOVA) dopo aver verificato la normalità delle misure utilizzando i test di Shapiro Wilk e di Kolmogorov Smirnov. I materiali prodotti sono risultati omogenei e idonei allo svolgimento dello studio collaborativo.

##### 4.3. PROVE DI STABILITÀ DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO

Le prove di stabilità sono state effettuate sui materiali di riferimento ISPRA RM036, ISPRA RM037 e ISPRA RM038 in condizioni isocrone (A.M.H. Van der Veen, et al, 2001) nell'arco di un periodo di 8 giorni alla temperatura di 20°C controllando il parametro COD oggetto dello studio collaborativo. Tale metodo prevede l'esecuzione, in un'unica soluzione, di tutte le misure di COD sulle bottiglie selezionate di ciascun materiale: cinque unità per ogni intervallo di tempo (per un totale di 15 per 3 intervalli di tempo) e cinque unità appartenenti al gruppo di riferimento. Le misure eseguite sulle unità mantenute alla temperatura di 20°C, per la durata dello studio collaborativo sono poste a confronto con i risultati delle misure ottenute sulle bottiglie mantenute a -30°C per tutto il tempo della prova di stabilità (gruppo di riferimento). La temperatura di -30°C rappresenta la temperatura di conservazione del campione alla quale si assume non si possano manifestare fenomeni degradativi.

Il dettaglio dello studio è riportato in APPENDICE B, ove sono riportati i grafici delle prove di stabilità nel tempo. I singoli punti di ogni grafico rappresentano il rapporto fra il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti allo stesso intervallo di tempo ( $T_n$ ) e il valore medio delle bottiglie appartenenti al gruppo di riferimento ( $T_0$ ). I materiali sono risultati stabili ed idonei allo svolgimento dello studio collaborativo.

## 5. MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLO STUDIO COLLABORATIVO

Ai partecipanti è stato chiesto di effettuare su tutti i materiali di prova consegnati cinque determinazioni individuali indipendenti operando in condizioni di ripetibilità ristretta entro 48 ore dal ricevimento del materiale, esprimendo i risultati delle singole misure indipendenti e la migliore stima derivante dalle misure eseguite per il parametro COD (espresso in  $\text{mg L}^{-1}$ ) come da Tabella 1.

*Tabella 1 – Parametri ISPRA RM027, ISPRA RM028 e ISPRA RM023*

PARAMETRO	UNITÀ DI MISURA	N° di cifre decimali
COD	$\text{mg L}^{-1}$	1

Nel protocollo dello studio collaborativo sono state fornite specifiche indicazioni circa le modalità di conduzione della prova (APPENDICE C). I laboratori hanno eseguito le misure seguendo, inoltre, le istruzioni di accompagnamento al materiale consegnato dalle ditte produttrici necessario per lo svolgimento dei test in cuvetta. In particolare, le prove sono state condotte con i seguenti test in cuvetta:

- LCK514 e 714 prodotto e fornito da HACH LANGE s.r.l.;
- Spectroquant 114541, 114960 fornito da VWR International PBI s.r.l.;

Tutti i test forniti dalle ditte, per i diversi livelli di concentrazione, appartengono allo stesso lotto di produzione.

Tutti i dati sperimentali, unitamente ad informazioni riguardanti il procedimento di misurazione adottato, sono stati restituiti dai laboratori partecipanti all'organizzatore mediante la "Scheda Raccolta Risultati".

## 6. ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

L'insieme dei risultati forniti dai laboratori hanno costituito la base su cui calcolare, ai sensi della ISO 5725-2, lo scarto tipo di ripetibilità e di riproducibilità per il metodo applicato ai tre diversi materiali di prova.

I dati dei laboratori partecipanti allo studio sono stati sottoposti ad una accurata verifica preliminare. La verifica ha riguardato la completezza delle informazioni inviate, propedeutiche all'elaborazione statistica, e la corrispondenza tra quanto dichiarato dai laboratori, relativamente al procedimento di misurazione eseguito, e quanto previsto dal protocollo dello studio.

E' stata avviata una fase di verifica con i singoli laboratori al fine di acquisire integrazioni e/o correzioni ai dati ricevuti con il conseguente invio da parte dei laboratori, in taluni casi, di revisioni delle schede dei risultati. A seguito di questa prima fase di valutazione delle risposte dei laboratori ed in accordo alle finalità dello studio si è proceduto all'esclusione di alcuni laboratori. Specificatamente:

- ISPRA RM036:
  - Lab-6: per misure eseguite con test in cuvetta HACH-LANGE diversi,
  - Lab-19 per misure eseguite al di fuori del periodo di stabilità (> 8 giorni);
- ISPRA RM037:

- Lab-1 per misure eseguite contemporaneamente (nella stessa serie di ripetizioni) con test in cuvetta diversi (Spectroquant 114541 e 114690),
- Lab-6: per misure eseguite con test in cuvetta HACH-LANGE diversi,
- Lab-19 per misure eseguite al di fuori del periodo di stabilità (> 8 giorni);
- ISPRA RM038:
  - Lab-6: per misure eseguite con test in cuvetta HACH-LANGE diversi,
  - Lab-19 per misure eseguite al di fuori del periodo di stabilità (> 8 giorni).

E' stata eseguita una verifica statistica delle popolazioni di dati (t-test, ANOVA) ottenuti con i diversi test in cuvetta e si è costituito un unico insieme di dati senza distinzione di produttore test sulla base delle seguenti assunzioni:

- i test in cuvetta utilizzati fanno riferimento al metodo ISO 15705, benchè non ci sia perfetta analogia di formulazione;;
- i test in cuvetta utilizzano fotometri operanti a stesse lunghezze d'onda.

Sulla base di dati così costituita, i valori di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione sono stati calcolati in accordo alla norma ISO-5725-parte 2, previa applicazione dei test di Grubb e Cochran per la verifica di valori dubbi (struggler) e anomali (outlier) sia per le medie che per le varianze (intra-laboratorio). Sono stati inoltre eseguiti i test secondo la statistica h e k (Mandel), per valutare graficamente la consistenza statistica dei risultati dei laboratori (intra e tra laboratorio). La procedura di calcolo di ripetibilità e riproducibilità si basa su un processo iterativo che mira ad escludere dal calcolo finale degli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità i risultati dei laboratori che siano considerati, sulla base dei test suddetti, dubbi e/o anomali. Tale processo ha escluso dalle valutazioni finali:

- Lab-36 per il materiale ISPRA RM036;
- Lab-5 e Lab-36 per il materiale ISPRA RM037;
- Lab-13 per il materiale ISPRA RM038.

Complessivamente, al termine di tale processo, il numero di laboratori sui cui risultati sono stati calcolati ripetibilità e riproducibilità del metodo è stato pari a:

- 35 per il materiale ISPRA RM036;
- 32 per il materiale ISPRA RM037;
- 34 per il materiale ISPRA RM038.

#### *6.1. TEST DI EQUIVALENZA CON METODO APAT-IRSA 5130*

Alcuni laboratori (11), dietro specifica richiesta degli stessi, hanno ricevuto aliquote aggiuntive di materiale di riferimento predisposte ad-hoc dal Servizio Metrologia Ambientale ISPRA affinché potessero eseguire le misure utilizzando metodi alternativi al test in cuvetta. Tuttavia, pur a fronte del dichiarato interesse dei laboratori, solo una parte ha restituito i risultati delle misure eseguite con il metodo APAT-IRSA 5130. Della maggior parte di questi, inoltre, a causa della mancata osservanza delle indicazioni tecniche del protocollo dello studio (non esecuzione di 5 misure indipendenti, superamento del tempo massimo intercorrente tra ricezione del campione e misure), non è stato possibile considerare i risultati idonei alle successive valutazioni statistiche. Pertanto, l'esiguità delle misure disponibili non ha consentito di fornire, come era intendimento degli organizzatori e concordato con i laboratori stessi, indicazioni generalizzate circa l'equivalenza del metodo in cuvetta con il metodo APAT-IRSA.

I laboratori che intendessero autonomamente procedere alla dimostrazione di equivalenza tra il proprio metodo in cuvetta e quello ufficiale APAT-IRSA devono impostare le prove sperimentali su un materiale di prova con almeno due intervalli di concentrazione differenti, ripetendo per ciascun metodo di misurazione e per livello di concentrazione, 5 misure indipendenti in condizioni di ripetibilità. I risultati del metodo per il quale si vuole valutare l'equivalenza (cuvetta) sono confrontati con quelli del metodo di riferimento (APAT-IRSA 5130) utilizzando test statistici di significatività. I valori di scarto tipo ottenuti per le due serie di 5 ripetizioni sono cumulati per dare uno scarto tipo "cumulativo", secondo la formula:

$$s_c = \frac{\sqrt{s_a^2(n-1) + s_b^2(n-1)}}{n_a + n_b - 2}$$

Dove:

$s_c$  = scarto tipo cumulativo;

$s_a$  = scarto tipo delle misure ottenute con metodo di riferimento (APAT-IRSA);

$s_b$  = scarto tipo delle misure ottenute con metodo di cui valutare equivalenza (test in cuvetta);

$n$  = numero misure

Dal valore ottenuto si calcola secondo l'equazione di seguito riportata il valore di  $t$  da porre a confronto con il valore di  $t_{critico}$  tabellato (2,8 per 8 gradi di libertà):

$$t = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{s_c \left( \frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b} \right)}$$

Dove:

$\bar{x}_a$  e  $\bar{x}_b$  = valore medio delle 5 ripetizioni ottenute rispettivamente dal metodo APAT-IRSA e dal metodo in cuvetta.

Se  $t < t_{critico}$  allora non c'è differenza significativa tra le medie dei risultati ottenuti con i due metodi che risultano pertanto equivalenti.

## 7. RISULTATI

In Tabella 2 sono riportati i risultati delle misure (migliori stime) dei laboratori partecipanti allo studio così come comunicati dai laboratori ad ISPRA. In APPENDICE E sono riportati i valori delle singole misure indipendenti. Nelle Figure 1, 2 e 3 sono riportati in forma grafica i dati delle misure dei laboratori partecipanti allo studio. I grafici riportano per ciascun laboratorio i valori delle migliori stime del contenuto di COD, espresso in mg L<sup>-1</sup> di O<sub>2</sub>, con associata l'incertezza riportata dai laboratori. Benché i risultati dei laboratori siano stati valutati cumulativamente ai fini del calcolo della ripetibilità e riproducibilità, ovvero costituendo un'unica base di dati, i grafici evidenziano le migliori stime raggruppate in ordine crescente e per produttore del test in cuvetta.

**Tabella 2** Risultati delle misure dei laboratori (migliori stime) con le relative incertezze estese (k=2, pari a circa il 95% dell'intervallo di fiducia).

	ISPRA RM036		ISPRA RM037		ISPRA RM038	
	COD (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )					
<b>1</b>	921,5	±1,7	<b>(3)</b>		<b>(3)</b>	
<b>2</b>	889,4	±52,0	523,4	±37,2	528,6	±37,4
<b>3</b>	841,3	±65,8	474,2	±43,0	498,0	±44,5
<b>4</b>	878,0	±13,0	505,0	±8,0	559,0	±9,0
<b>5</b>	900,0	±126,0	420,0	±59,0	510,0	±71,0
<b>6-A<sup>(1)</sup></b>	903,1	±29,7	505,1	±78,0	528,8	±78,0
<b>6-B<sup>(2)</sup></b>	<b>(3)</b>		<b>(3)</b>		<b>(3)</b>	
<b>7</b>	894,8	±78,0	534,4	±78,0	551,2	±78,0
<b>8</b>	875,6	±101,0	501,6	±63,1	513,0	±64,3
<b>10</b>	907,8	±42,4	520,9	±25,9	535,2	±26,5
<b>12-A<sup>(1)</sup></b>	886,8	±113,4	553,4	±70,4	571,4	±72,7
<b>12-B<sup>(2)</sup></b>	1007,0	±128,9	653,2	±83,3	579,4	±73,7
<b>13</b>	987,6		563,2		655,8	
<b>14</b>	933,0	±131,0	559,0	±78,0	551,0	±77,0
<b>15</b>	977,4	±110,9	554,2	±68,5	564,4	±69,6
<b>16</b>	990,4	±112,0	609,6	±74,0	570,8	±70,0
<b>17</b>	1018,2		Non disponibile		591,4	
<b>18</b>	977,8		553,8		519,4	
<b>19</b>	<b>(3)</b>		<b>(3)</b>		<b>(3)</b>	
<b>20</b>	940,0	±107,0	567,0	±70,0	592,0	±72,5
<b>21</b>	944,0	±108,0	555,0	±69,0	537,0	±67,0
<b>22</b>	984,0		556,2		558,8	
<b>23</b>	934,2	±5,2	519,0	±3,4	527,4	±11,3
<b>24</b>	926,6	±15,9	529,2	±19,0	521,2	±19,0
<b>25</b>	941,0		519,0		493,6	
<b>26</b>	945,8	±118,5	515,0	±64,1	590,2	±72,8
<b>27</b>	934,6	±106,7	528,6	±65,9	539,2	±66,8
<b>28</b>	1018,4	±147,7	570,0	±82,6	543,4	±78,9
<b>29</b>	969,8	±140,6	541,6	±78,5	502,0	±72,8
<b>30</b>	987,0	±111,9	541,0	±67,1	556,2	±68,7
<b>31</b>	984,4	±120,3	555,0	±68,8	559,8	±69,4

- (1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant  
(2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE  
(3) Misure escluse dalla valutazione statistica



**Tabella 2** Risultati delle misure dei laboratori (migliori stime) con le relative incertezze estese ( $k=2$ , pari a circa il 95% dell'intervallo di fiducia). - continua

	ISPRA RM036		ISPRA RM037		ISPRA RM038	
	COD ( $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$ )					
<b>32</b>	1012,0	$\pm 114,2$	591,2	$\pm 72,4$	553,6	$\pm 68,4$
<b>33</b>	994,9		549,9		559,5	
<b>34</b>	947,0		515,0	$\pm 65,0$	566,0	
<b>35</b>	953,0		539,8		584,0	
<b>36</b>	1178,2	$\pm 135,2$	799,2	$\pm 243,4$	546,4	$\pm 109,9$
<b>37</b>	1030,0	$\pm 51,5$	582,0	$\pm 29,1$	566,0	$\pm 28,3$
<b>38</b>	985,4		560,0		550,2	

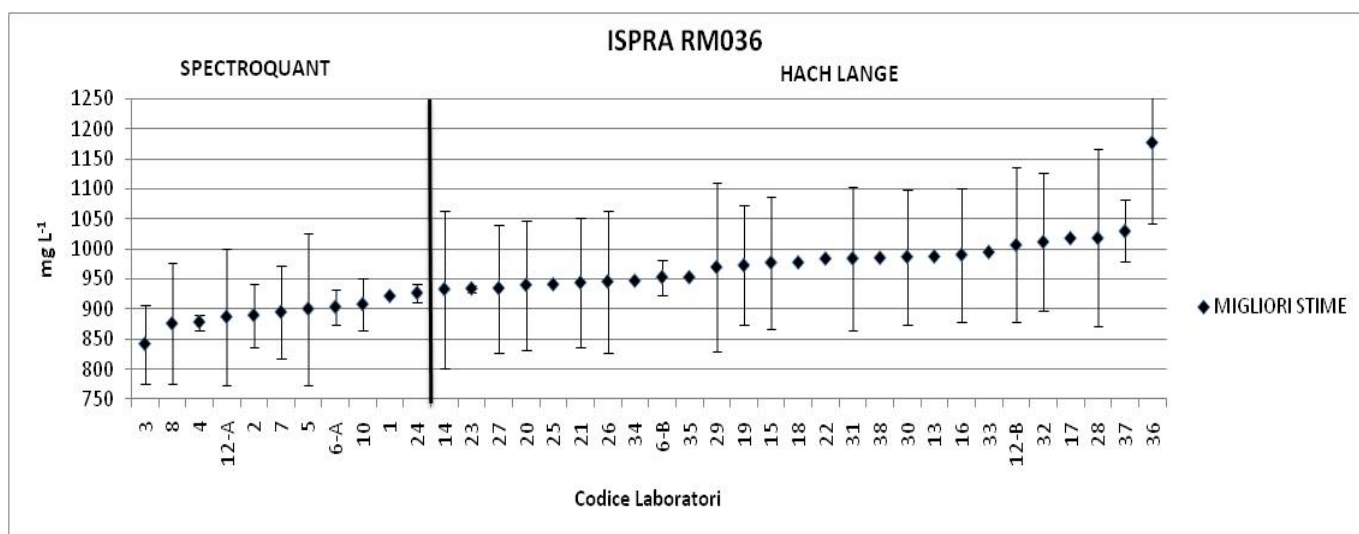
Sulla base dei dati dei laboratori (misure indipendenti e migliori stime) sono stati stimati per ciascun materiale (Tabella 3):

- il valore medio;
- lo scarto tipo percentuale di ripetibilità;
- lo scarto tipo percentuale di riproducibilità.

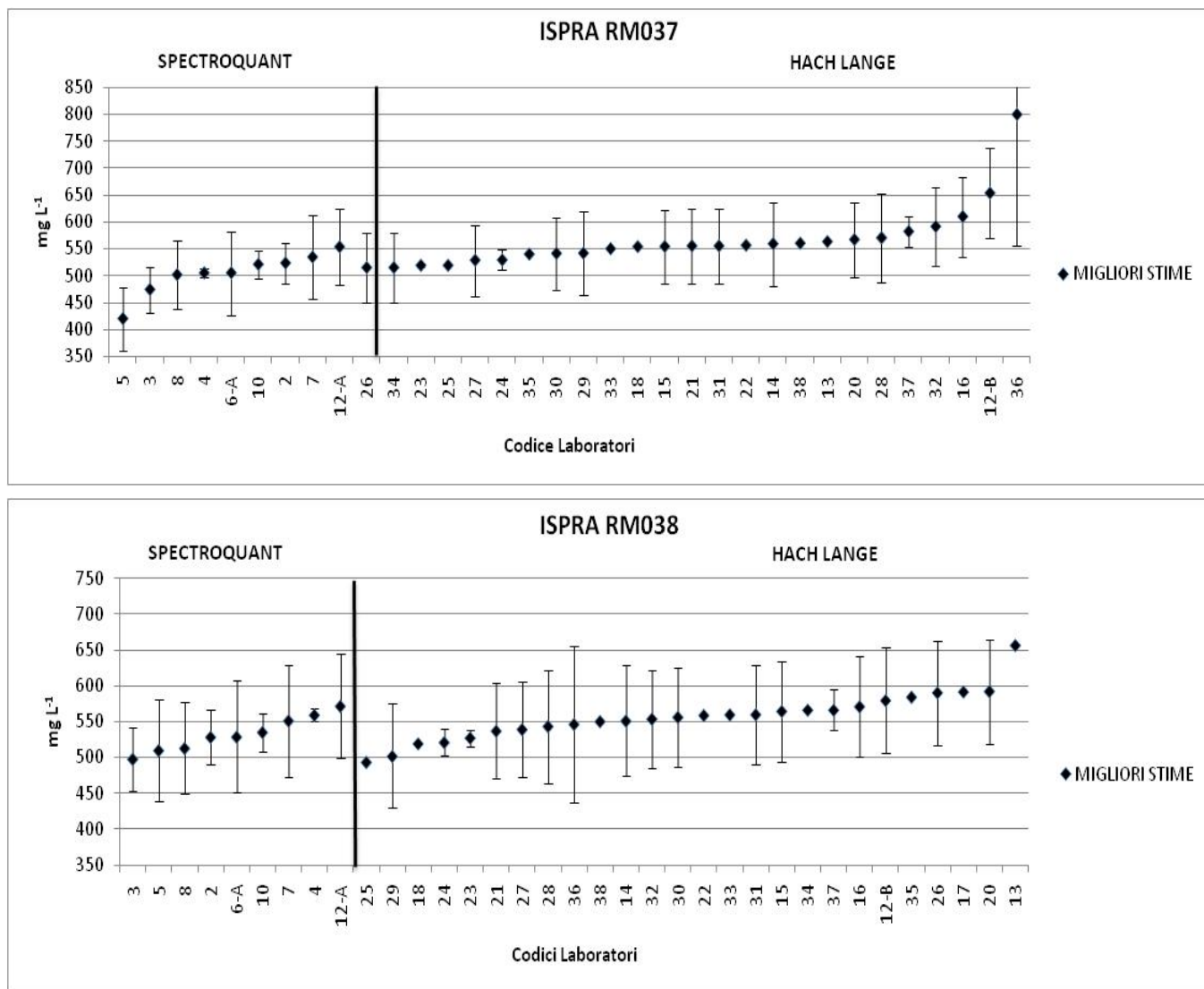
**Tabella 3** – Ripetibilità e Riproducibilità

	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
<b>Valore medio</b> $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$	947,9	545,3	547,9
<b>Sr %</b> Scarto tipo di ripetibilità percentuale	0,4 %    n=35	0,6 %    n=32	2,4 %    n=34
<b>SR %</b> Scarto tipo di riproducibilità percentuale	4,0 %	5,5 %	3,7 %

**Figura 1** - Migliori stime dei laboratori per il materiale ISPRA RM036



**Figura 2** - Migliori stime dei laboratori per il materiale ISPRA RM037



Lo studio collaborativo si inserisce nell'ambito delle iniziative volte a convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in matrice acquosa mediante il metodo in cuvetta già utilizzato, in alternativa al metodo APAT-IRSA (5130), adottato nelle analisi di routine da molte Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA).

I risultati dello studio hanno positivamente evidenziato, con riferimento a tre materiali di riferimento costituiti da campioni reali (refluo urbano e industriale) e livelli di COD differenti, bassi valori di scarto tipo di ripetibilità e riproducibilità del metodo (< 2,5 % per la ripetibilità e 3,7-5,5 % per la riproducibilità). Tali valori sono dello stesso ordine di grandezza di quelli osservati nello studio precedente ISPRA SC004, eseguito su campioni sintetici e privi di interferenti come i solidi sospesi, benchè con livelli di COD inferiori. In tale caso la ripetibilità era nell'intervallo 1,0-3,4 %, mentre la riproducibilità tra il 2,8% e il 6,0 %. Si confermano, quindi, buone prestazioni del metodo e migliori anche rispetto ai valori di CV riportati nel Rapporto APAT-IRSA N°29/2003 "Metodi analitici per le acque" per il metodo APAT-IRSA 5130 (< 11%), ottenuti sulla base di misure ripetute da un solo laboratorio su una soluzione salina.

L'applicazione corretta di operazioni di omogeneizzazione del campione di prova sembrano garantire una ottima ripetibilità e riproducibilità del metodo, in linea con gli scopi delle misurazioni, siano esse di controllo o monitoraggio.

L'obiettivo di studiare la possibile e generalizzata equivalenza di metodi in cuvetta con i metodi APAT-IRSA non è raggiunto conseguentemente alla insufficiente base statistica dei dati disponibili. E' comunque fornita l'indicazione procedurale affinché ciascun laboratorio, in autonomia, possa studiare l'equivalenza tra il metodo ufficiale APAT-IRSA e quello in cuvetta prescelto.

## **9. RIFERIMENTI**

4. M.H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels; "Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study", Accreditation Quality Assurance 6, 257-263, 2001.
5. ISO 5725-2:1994 "Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method".
6. UNICHIM Manuale n.201 Guida per l'utilizzo di test in cuvetta nei controlli della qualità delle acque

## **APPENDICE A**

### **Elenco dei laboratori partecipanti**

**APPENDICE A**

<b>Istituzione-Servizio-Laboratorio</b>	<b>Nominativo Referente</b>
ACDA SPA AZI.CUNEESE DELL'ACQUA, Cuneo	<b>Erika Ambrogio</b>
ACQUE VERONESI Scarl, Verona	<b>Francesco Icarelli</b>
ARPA Calabria - Dipartimento di Cosenza	<b>Giuliana Spadafora</b>
ARPAC Napoli - Unità Operativa Acque Interne	<b>Maria Niola</b>
ARPA Emilia Romagna Sezione Provinciale di Bologna, Laboratorio Acque di Scarico	<b>Cecilia Bergamini</b>
ARPA Emilia Romagna -Sezione Provinciale di Ravenna - Laboratorio Acque di Scarico	<b>Laura Billi</b>
ARPA Emilia Romagna - Sezione Provinciale di Reggio Emilia - Laboratorio Integrato	<b>Antonia Incerti</b>
ARPA Friuli Venezia Giulia - Dipartimento Udine	<b>Ivan Martinuzzi</b>
ARPA Lazio Sezione provinciale di Latina - Laboratorio Chimico/Risorse Idriche	<b>Salvatore Di Giorgi</b>
ARPA Lazio sezione provinciale di Viterbo – Laboratorio Chimico, Servizio Risorse Idriche, suolo, rifiuti, bonifiche – unità risorse idriche	<b>Flavia Fioravanti</b>
ARPA Liguria U.O. Laboratorio Settore Chimico - Savona	<b>Pier Paolo Toso</b>
ARPA Liguria U.O. Laboratorio Settore Chimico - Genova	<b>Carla Devia</b>
ARPA Liguria U.O. Laboratorio Settore Chimico - La Spezia	<b>Stefano Lottici</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Bergamo	<b>Daniela Rizzo</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Brescia	<b>Marco Volante</b>
ARPA Lombardia Dipartimento di Mantova	<b>L. Nizzola</b>
ARPA Lombardia Settore Laboratori, Laboratorio di Monza	<b>Daniela Daverio</b>

**APPENDICE A**

<b>Istituzione-Servizio-Laboratorio</b>	<b>Nominativo Referente</b>
ARPA Marche Dipartimento Provinciale di Ancona, Servizio Acque	<b>Marco Bruciati</b>
ARPA Molise – Dipartimento Provinciale di Isernia AREA ATTIVITA' LABORATORISTICHE, LABORATORIO CHIMICO	<b>Antonio Gianni</b>
ARPA Piemonte Attività strumentali di laboratorio - Sede di Cuneo	<b>Cristina Chiorra</b>
ARPA Pimenonte Dipartimento di Torino - S.S. 06.05 - Laboratorio di Grugliasco	<b>Marina Fiorito Gerardo Melchionna</b>
ARPA Piemonte Dipartimento Provinciale di Novara Laboratorio Chimico	<b>Nicoletta Pozzi</b>
ARPA Puglia - Dipartimento di Bari - UO Chimica delle acque	<b>Stefano Spinelli</b>
ARPAT Dipartimento di Siena	<b>Patrizia Bolletti</b>
ARPAT Area Vasta Toscana Costa Settore Laboratorio, Livorno	<b>Carlo Cini</b>
ARPAT Dipartimento Provinciale di Arezzo	<b>Anna Gilardoni</b>
ARPAT Dipartimento di Firenze - Laboratorio Area Vasta Centro	<b>Francesco Mantelli</b>
ARPAV- Dipartimento Regionale Laboratori – Servizio Laboratori di Verona, U.O. Chimica di Base	<b>Alberto Ogheri</b>
ARPAV- Dipartimento Regionale Laboratori – Servizio Laboratori di Venezia	<b>Francesca Zanon</b>
ARTA Abruzzo - Distretto Provinciale de L' Aquila	<b>Patrizia De Paulis</b>
ARTA Abruzzo – Laboratorio Chimico Dipartimento Provinciale di Chieti	<b>Fabrizio Cornacchia</b>
ARTA Abruzzo - Dipartimento Provinciale di Teramo - Settore Chimico Ambientale	<b>Daniela Cicconetti</b>
GRUPPO CSA Spa, Rimini	<b>Roberto Giani</b>
SAVI Srl, Mantova	<b>Omar Spoladori</b>

**APPENDICE B**  
**Prove di stabilità**

## VALUTAZIONE DELLA STABILITA' A BREVE TERMINE

Le prove di stabilità nel breve termine sono effettuate per un periodo di 8 giorni. Lo studio di stabilità mediante prova "isocrona", in cui tutte le unità sono misurate in condizioni di ripetibilità, copre il trasporto, la conservazione del materiale in laboratorio ed il tempo di esecuzione delle misure. Il tempo di inizio delle prove di stabilità coincide con l'invio/consegna dei materiali di prova ai laboratori partecipanti. Per ciascun materiale di riferimento, la procedura isocrona seguita è la seguente:

7. selezionare 20 unità in modo casuale.
8. selezionare, in modo casuale, 15 unità e riporle alla temperatura di riferimento (-30°C) – gruppo di riferimento.
9. mettere 5 unità a +20±2°C
10. dopo 2 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a +20±2°C
11. dopo 5 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a +20±2°C
12. dopo 8 giorni dalla data in cui è iniziata la prova di stabilità, prelevare 5 unità dal gruppo di riferimento e metterle a temperatura ambiente insieme a tutte le unità che si trovano a +20 ° C e lasciare che le unità raggiungano la temperatura ambiente.

A conclusione della prova si avranno 5 gruppi di unità:

- gruppo A: 5 unità mantenute a temperatura costante di + 20±2°C per 3 giorni
- gruppo B: 5 unità mantenute a temperatura costante di + 20±2°C per 6 giorni
- gruppo C: 5 unità mantenute a temperatura costante di + 20±2°C per 8 giorni
- gruppo D: 5 unità mantenute a temperatura costante di riferimento (-30°C) per 8 giorni (gruppo di riferimento)

Eseguire le misurazioni in condizioni di ripetibilità. Per ogni tempo t abbiamo 5 risultati delle misurazioni effettuate su 5 unità. Utilizzando la regressione lineare delle frazioni (o concentrazioni) in massa del valore della proprietà d'interesse ( $Y_i$ =valore medio delle 5 unità) in funzione del tempo si ricava la stima del coefficiente angolare della retta dato da:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})^2}$$

Dove  $X_i$  = tempo i-simo. La stima dell'intercetta è:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

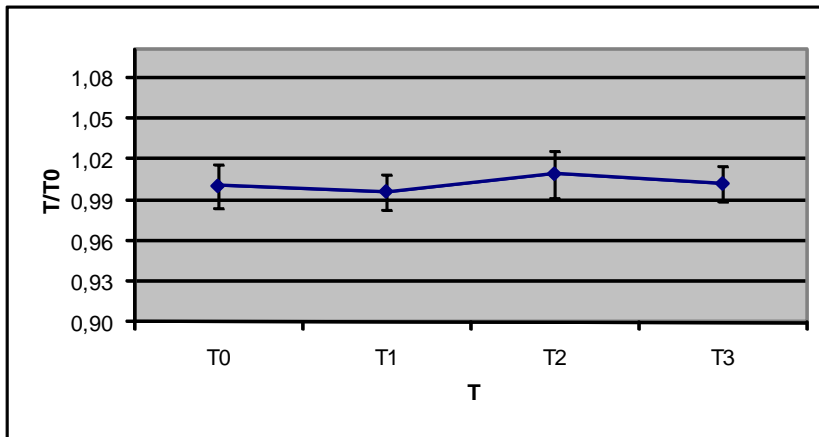
$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^3 (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} \quad \text{ed} \quad s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^3 (X_i - \bar{X})^2}}$$

Confrontando il fattore t di Student per n-2 gradi di libertà e  $\alpha=0,05$  (con un livello di confidenza del 95%) con la pendenza si verifica la presenza di eventuali decomposizioni del materiale. Quando:

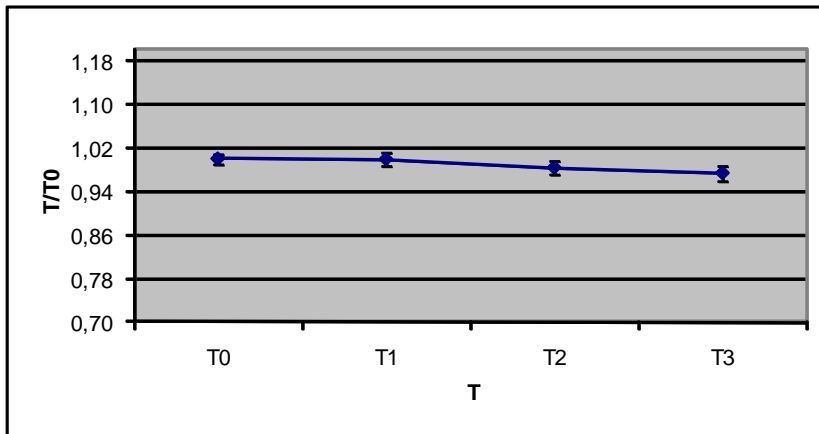
$$|b_1| \leq t_{0,95;n-2} \cdot s(b_1) \quad \text{il materiale si considera stabile.}$$



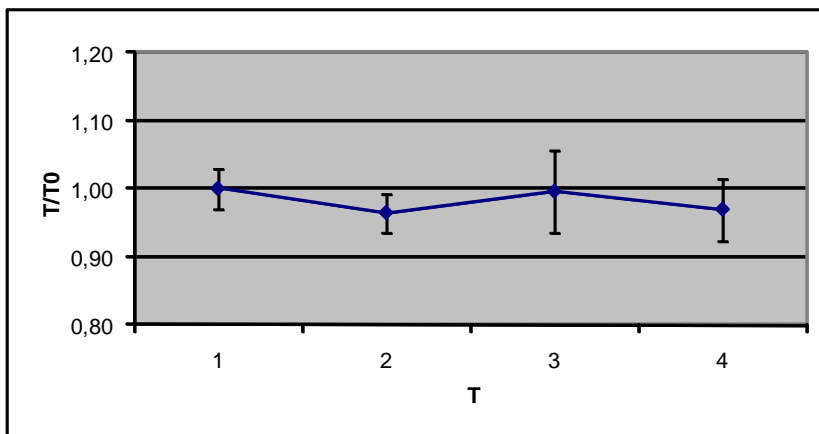
**Figura 1.** Stabilità – ISPRA RM036



**Figura 2.** Stabilità - ISPRA RM037



**Figura 3.** Stabilità - ISPRA RM038



I singoli punti di ogni grafico rappresentano il rapporto  $T_n/T_0$  fra il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti allo stesso intervallo di tempo (T1, T2 e T3) e il valore medio delle misure di COD eseguite sulle bottiglie appartenenti al gruppo di riferimento (T0).

**APPENDICE C**  
**Protocollo dello studio collaborativo**



**ISPRA**  
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# PROTOCOLLO

## ISPRA SC005

### STUDIO COLLABORATIVO PER LA CONVALIDA DEL PROCEDIMENTO DI MISURAZIONE DEL COD IN ACQUE DI SCARICO CON IL METODO IN CUVETTA

**Febbraio 2012**

*Lo studio collaborativo ISPRA-SC005 è organizzato in collaborazione con  
HACH-LANGE s.r.l., ITALSCIENTIFICA SpA - GRUPPO ITALINVEST e VWR International PBI  
s.r.l.*

## INDICE:

Sezione	TITOLO	pagina
1	Descrizione	3
2	Scopo	3
3	Destinatari	4
4	Regole generali	4
5	Calendario attività	4
6	Materiale di Prova	5
6.1	Parametri	5
6.2	Modalità di esecuzione	6
7	Scheda dei Risultati	7
8	Elaborazione statistica	8
9	Rapporto conclusivo	8
10	Informazioni sulla riservatezza	8
11	Costi	8
12	Riferimenti	8

### 1) DESCRIZIONE

ISPRA, con la collaborazione di Hach Lange, ITALSCIENTIFICA SpA - GRUPPO ITALINVEST e VWR International s.r.l., ha promosso un'iniziativa mirata a definire e convalidare il metodo di misura della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) in acque di scarico mediante il metodo in cuvetta. Tale iniziativa prende spunto dagli esiti del precedente circuito ISPRA SC004 che fu svolto, anziché su matrice reale, su una soluzione acquosa preparata ad hoc (ftalato di potassio e acidificata con acido solforico). Lo studio è il frutto di una collaborazione con le Ditte sopracitate per convalidare il metodo già utilizzato nelle analisi di routine da molte Agenzie Regionali e Provinciali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA). Lo studio prevede l'invio di tre diversi tipi di Materiale di Prova prodotti dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA ciascuno caratterizzato da livelli diversi di contaminazione da sostanza organica e dalla presenza di solidi sospesi.

**Il presente Protocollo disciplina le modalità di esecuzione dello studio collaborativo.**

### 2) SCOPO

Il presente studio collaborativo (SC) è finalizzato alla convalida del metodo per la determinazione del COD con il metodo in cuvetta su acque di scarico in presenza di solidi sospesi. Si intende proporre, sulla base delle norme esistenti e delle esperienze maturate a livello nazionale, un metodo ufficiale per la determinazione del COD per la matrice acquosa più speditivo ma con idonei requisiti di qualità delle prestazioni (ripetibilità, riproducibilità, etc.).

### 3) DESTINATARI

Allo studio partecipano i laboratori esperti nella misura di COD individuati, in accordo ad ISPRA, dalle Ditte fornitrici dei materiali per il test in cuvetta, ed appartenenti alle ARPA/APPA, nonché a strutture private.

### 4) REGOLE GENERALI

I laboratori interessati alla partecipazione trasmettono direttamente ad ISPRA la Scheda di Adesione che è loro inviata unitamente al presente Protocollo.

L'adesione allo studio collaborativo implica che le strutture partecipanti allo studio garantiscano l'analisi di tutti i materiali di prova.

I materiali di prova sono costituiti da soluzioni acquose denominate specificatamente:

- ISPRA RM036 (refluo urbano);
- ISPRA RM037 (refluo industriale);
- ISPRA RM038 (refluo industriale).

Dettagli circa le caratteristiche dei materiali di prova sono riportati nella Sezione 6.

Ad ogni laboratorio partecipante viene attribuito un codice identificativo a cui saranno associati i propri risultati.

I partecipanti effettueranno le misure e restituiranno i dati sperimentali, unitamente ad informazioni riguardanti la procedura di misura utilizzata, attraverso la Scheda Risultati da restituire ad ISPRA entro i termini temporali fissati nel calendario delle attività (Sezione 5).

Prima dell'elaborazione dei dati sperimentali, l'organizzatore dello studio collaborativo può chiedere eventualmente ai laboratori partecipanti conferma dei dati trasmessi.

Ad ogni partecipante sarà inviata, dopo l'elaborazione dei dati sperimentali, una Bozza del Rapporto Conclusivo con le valutazioni statistiche.

### 5) CALENDARIO ATTIVITA'

Lo SC si svolge secondo la tempistica sotto riportata:

<b>entro 1 marzo 2012:</b> ISPRA invia tramite e-mail ai laboratori partecipanti allo studio collaborativo: a) Protocollo dello studio collaborativo; b) Scheda di adesione
---

<b>8 marzo 2012:</b> data ultima di restituzione delle Schede di Adesione compilate dai laboratori ad ISPRA ( <a href="mailto:sc005@isprambiente.it">sc005@isprambiente.it</a> )
<b>Entro 21 marzo 2012:</b> Spedizione ai laboratori partecipanti tramite corriere, in accordo con le Ditte fornitrici, dei Materiali di Prova e dei kit per l'esecuzione del test in cuvetta
<b>30 aprile 2012:</b> Trasmissione ad ISPRA ( <a href="mailto:sc005@isprambiente.it">sc005@isprambiente.it</a> ) da parte dei laboratori partecipanti della Scheda Risultati contenente i risultati delle misure effettuate sui materiali di prova.
<b>Entro metà settembre 2012:</b> Invio della Bozza del Rapporto Conclusivo ai laboratori partecipanti.
<b>Entro dicembre 2012:</b> Presentazione dell'elaborazione statistica e discussione dei risultati tra tutti i partecipanti allo studio collaborativo in una riunione organizzata da ISPRA.

## **6) MATERIALE DI PROVA**

**Per eseguire la convalida del metodo per la determinazione del COD ciascun laboratorio partecipante riceverà:**

- 1 unità di ISPRA RM036 (refluo urbano);
- 1 unità di ISPRA RM037 (refluo industriale);
- 1 unità di ISPRA RM038 (refluo industriale);
- il kit per l'esecuzione del test del COD in cuvetta fornito dalle Ditte produttrici.

Il materiale di prova è stato prodotto dal Servizio Metrologia Ambientale e preparato presso i laboratori di Castel Romano. Ogni unità, costituita da una bottiglia di vetro scuro, contiene circa 100 mL di campione non filtrato e acidificato con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un pH variabile da 1,2 a 2.

Sono state condotte prove finalizzate a valutare il grado di omogeneità delle unità prodotte e saranno condotte prove di stabilità a diverse temperature durante tutto il periodo di svolgimento dello studio collaborativo.

**Una volta ricevuto il materiale e prima dell'esecuzione della determinazione del COD, è cura del laboratorio partecipante provvedere a conservare tale materiale nel suo contenitore di origine, sigillato, al buio e ad una temperatura di circa +4°C ed analizzarlo il prima possibile e comunque entro 48h dal ricevimento.**

### **6.1 Parametri**

In tutti i materiali di prova deve essere quantificato il contenuto di COD come riportato nella Tabella 1.

**Tabella 1**

Parametro	UNITÀ DI MISURA	N° di cifre decimali
COD	mg L <sup>-1</sup>	1

Le concentrazioni in massa attese sono da intendersi comprese tra:

- 100 - 500 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM036);
- 300-1000 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM037);
- 500 - 1500 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM038).

### 6.2 Modalità di esecuzione della prova

I Laboratori partecipanti allo studio collaborativo devono condurre le analisi seguendo la procedura di prova che sarà fornita dalla Ditta unitamente al materiale per l'esecuzione del test in cuvetta.

Riportare sulla Scheda Risultati (Sezione 7) la data di ricevimento, quella di analisi ed il numero della bottiglia ricevuta su cui si sta eseguendo la misura.

Per una corretta elaborazione statistica e analisi dei risultati è necessario che i laboratori eseguano la prova seguendo scrupolosamente la procedura allegata al materiale per l'esecuzione della prova in cuvetta fornito dalle Ditte nonché le ulteriori indicazioni riportate di seguito:

- eseguire e verificare la retta di taratura dello spettrofotometro prima dell'analisi strumentale;
- omogeneizzare il materiale di prova seguendo la seguente procedura:
  - agitazione manuale per 30 secondi della bottiglia contenente il materiale di prova,
  - avvinamento di un beaker (o contenitore similare) con un volume adeguato del materiale di prova,
  - trasferimento di circa 50 mL del materiale all'interno del contenitore precedentemente avvinato,
  - agitazione del materiale contenuto nel beaker mediante agitatore magnetico per un minuto,
  - prelievo del quantitativo necessario per l'analisi sempre sotto agitazione;
- eseguire **cinque (5) misure indipendenti** per ogni materiale di prova;
- da ogni materiale di prova prelevare la **quantità** definita all'interno delle procedure per l'esecuzione del test in cuvetta;
- l'analisi delle **5 misure indipendenti** per ogni materiale di prova deve avvenire in condizioni di ripetibilità ristretta (stesso operatore, stessa sequenza analitica, senza alcuna nuova taratura intermedia dello strumento);
- la digestione deve essere condotta alla temperatura di **148°C per 2 ore**;
- eseguire **almeno un bianco procedurale** per ogni materiale di prova;
- valutare l'eventuale contaminazione del bianco **prima** di eseguire l'analisi di tutto il gruppo di prove relativo a ciascun materiale di prova.

L'espressione dei risultati sperimentali (unità di misura, numero di cifre decimali) deve essere effettuata secondo le indicazioni riportate nella Tabella 1.

Riportare la determinazione del [LOQ] come valore numerico del Limite di Quantificazione e riportare le modalità di calcolo all'interno delle note.

Per i laboratori che vogliono provare contemporaneamente al metodo in cuvetta, anche il metodo APAT-IRSA 5130 (Manuale APAT-IRSA, Vol 29/2003), questi dovranno specificarlo anticipatamente ad ISPRA ([sc005@isprambiente.it](mailto:sc005@isprambiente.it)), contestualmente alla adesione allo studio collaborativo, in modo che possano ricevere la quantità di materiale di prova adeguato. Le prove dovranno essere svolte sempre seguendo le indicazioni del presente protocollo e quelle del metodo APAT-IRSA 5130. Nel caso, per ciascun materiale di prova, dovranno essere riempite due diverse Schede Risultati (una per metodo di misura).

## **7) SCHEDA DEI RISULTATI**

La scheda dei risultati sottoforma di file Excel (ad esempio LAB-02.xls) sarà resa disponibile in un'area riservata del web ISPRA, con accesso limitato tramite username e password. Le istruzioni circa le modalità di accesso e di utilizzo dell'area riservata saranno fornite ai laboratori prima dell'avvio dello studio collaborativo.

Il file Excel è composto da sette (7) fogli in cui la parte di colore verde viene compilata dall'organizzatore e la parte in colore giallo/arancione viene compilata dal laboratorio partecipante. La struttura della scheda è la seguente:

- Foglio 1 - "Generalità" del Laboratorio partecipante: viene compilato principalmente dall'organizzatore, per un riscontro sull'esattezza dei dati inviati; i partecipanti possono apportare eventuali correzioni se necessario. Viene inoltre assegnato il codice identificativo del Laboratorio partecipante;
- Foglio 2 - "RM036" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- Foglio 3 - "RM037" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- Foglio 4 - "RM038" per il parametro indagato riportare: il numero della bottiglia ricevuta, la data di ricevimento, la data di analisi, i risultati delle misure indipendenti e la migliore stima, il valore d'incertezza estesa associato, il limite di quantificazione;
- Foglio 5 - "Procedure di Misura": il partecipante deve fornire, compilando i campi disponibili:



- d. informazioni sulla strumentazione utilizzata;
- e. eventuali commenti sulla procedura di misura utilizzata;
- f. le informazioni riguardo irregolarità o problemi avvenuti durante le analisi (da riportare nelle note);
- Foglio 6 - "Bianco": specificare il tipo di bianco analizzato, riportare il dato sulla contaminazione e se tale dato è stato sottratto alla misura del campione;
- Foglio 7 - "Incertezza": contiene un campo da compilare a cura del laboratorio con informazioni circa la modalità di calcolo dell'incertezza di misura (metodo, fattore di copertura, etc.).

Le Schede Risultati vanno restituite compilate ad ISPRA entro e non oltre il 30 aprile 2012 al seguente indirizzo e-mail: sc005@isprambiente.it.

Le schede dovranno inoltre essere caricate sull'area web riservata seguendo le istruzioni che saranno fornite ai laboratori da ISPRA.

### **8) ELABORAZIONE STATISTICA**

I dati analitici forniti dai Laboratori partecipanti, sottoposti preliminarmente ad analisi statistiche di base, saranno analizzati secondo la norma ISO 5725-2:1994 .

### **9) RAPPORTO CONCLUSIVO**

Bozza del Rapporto Conclusivo, che contiene i risultati dell'elaborazione statistica sarà inviata per commenti ai laboratori partecipanti e alle Ditte produttrici dei test in cuvetta entro settembre 2012.

### **10) INFORMAZIONI SULLA RISERVATEZZA**

E' garantita la confidenzialità dei risultati in quanto ogni partecipante sarà registrato con un codice noto ad ISPRA e al Referente del laboratorio partecipante.

### **11) COSTI**

Nessun costo di iscrizione e spedizione dei materiali di prova.

### **12) RIFERIMENTI**

3. ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method;
4. UNICHIM Manuale n.201 Guida per l'utilizzo di test in cuvetta nei controlli della qualità delle acque;

5. Metodi Analitici per le Acque, APAT-CNR IRSA. Metodo 5130 (Manuali e Linee Guida APAT, Vol 29/2003)

Per ogni ulteriore chiarimento, fare riferimento a:

ISPRA- Servizio Metrologia Ambientale, Via di Castel Romano, 100 - 00128 ROMA

Tel: 06/5007.3228/3211 - Fax: 06/5050519

e-mail:

[sc005@isprambiente.it](mailto:sc005@isprambiente.it)

# ADDENDUM AL PROTOCOLLO STUDIO COLLABORATIVO “ISPRA-SC005”

## STUDIO COLLABORATIVO PER LA CONVALIDA DEL PROCEDIMENTO DI MISURAZIONE DEL COD IN ACQUE DI SCARICO CON IL METODO IN CUVETTA

**Tabella 1**

Parametro	UNITÀ DI MISURA	N° di cifre decimali
COD	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	1

Le concentrazioni in massa attese sono da intendersi comprese tra:

- 500 - 1500 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM036);
- 200-600 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM037);
- 300 - 1000 mg L<sup>-1</sup> (ISPRA RM038).

L'Addendum fa parte integrante del Protocollo. I valori delle concentrazioni in massa attese sopra riportati sostituiscono quelli contenuti nel Protocollo inviato a febbraio 2012.

Marzo 2012

## **APPENDICE D**

**Risultati delle misure dei laboratori**  
**ISPRA RM036**  
**ISPRA RM037**  
**ISPRA RM038**

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
1	misura 1	921,0	(3)	(3)
	misura 2	922,0		
	misura 3	920,0		
	misura 4	921,0		
	misura 5	922,0		
2	misura 1	888,0	527,0	506,0
	misura 2	885,0	518,0	577,0
	misura 3	895,0	526,0	514,0
	misura 4	888,0	528,0	511,0
	misura 5	891,0	518,0	535,0
3	misura 1	819,8	476,8	508,2
	misura 2	846,7	471,4	508,2
	misura 3	848,5	473,3	477,4
	misura 4	838,9	475,6	496,9
	misura 5	852,4	473,7	499,2
4	misura 1	877,0	499,0	618,0
	misura 2	882,0	505,0	537,0
	misura 3	872,0	506,0	534,0
	misura 4	885,0	513,0	544,0
	misura 5	873,0	504,0	563,0
5	misura 1	896,0	415,0	485,0
	misura 2	915,0	416,0	493,0
	misura 3	901,0	420,0	521,0
	misura 4	895,0	423,0	517,0
	misura 5	900,0	425,0	530,0
6-A(1)	misura 1	902,0	499,4	531,0
	misura 2	906,1	517,7	526,5
	misura 3	904,8	515,7	532,0
	misura 4	899,4	487,7	525,5
	misura 5			

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant, (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
6-B (2)	misura 1	(3)		
	misura 2			
	misura 3			
	misura 4			
	misura 5			
7	misura 1	895,0	534,0	552,0
	misura 2	902,0	531,0	595,0
	misura 3	895,0	548,0	597,0
	misura 4	894,0	544,0	526,0
	misura 5	888,0	529,0	498,0
8	misura 1	871,0	498,0	519,0
	misura 2	875,0	503,0	509,0
	misura 3	878,0	509,0	499,0
	misura 4	877,0	499,0	512,0
	misura 5	877,0	499,0	526,0
10	misura 1	908,1	522,2	565,2
	misura 2	907,3	520,1	564,1
	misura 3	907,1	522,1	525,2
	misura 4	910,2	521,2	526,1
	misura 5	906,1	519,1	525,2
12-A (1)	misura 1	881,0	553,0	557,0
	misura 2	884,0	553,0	585,0
	misura 3	881,0	551,0	573,0
	misura 4	889,0	553,0	602,0
	misura 5	899,0	557,0	540,0
12-B (2)	misura 1	1004,0	655,0	598,0
	misura 2	1012,0	658,0	581,0
	misura 3	1004,0	650,0	595,0
	misura 4	1005,0	654,0	566,0
	misura 5	1010,0	649,0	557,0

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant, (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
13	misura 1	1005,0	569,0	657,0
	misura 2	1017,0	568,0	678,0
	misura 3	994,0	555,0	650,0
	misura 4	950,0	560,0	642,0
	misura 5	972,0	564,0	652,0
14	misura 1	933,0	560,0	555,0
	misura 2	935,0	558,0	541,0
	misura 3	932,0	560,0	575,0
	misura 4	931,0	560,0	522,0
	misura 5	934,0	556,0	563,0
15	misura 1	982,0	547,0	581,0
	misura 2	974,0	558,0	554,0
	misura 3	976,0	546,0	606,0
	misura 4	978,0	561,0	537,0
	misura 5	977,0	559,0	544,0
16	misura 1	993,0	606,0	557,0
	misura 2	991,0	622,0	549,0
	misura 3	990,0	597,0	584,0
	misura 4	992,0	615,0	552,0
	misura 5	986,0	608,0	612,0
17	misura 1	1007,0		587,0
	misura 2	1042,0		601,0
	misura 3	1012,0		552,0
	misura 4	1009,0		617,0
	misura 5	1021,0		600,0
18	misura 1	969,0	545,0	506,0
	misura 2	980,0	598,0	503,0
	misura 3	983,0	544,0	498,0
	misura 4	981,0	543,0	515,0
	misura 5	976,0	539,0	575,0

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant, (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
19	misura 1	(3)		
	misura 2			
	misura 3			
	misura 4			
	misura 5			
20	misura 1	947,0	570,0	613,0
	misura 2	937,0	569,0	588,0
	misura 3	938,0	568,0	567,0
	misura 4	944,0	563,0	629,0
	misura 5	934,0	564,0	565,0
21	misura 1	943,0	554,0	545,0
	misura 2	945,0	555,0	531,0
	misura 3	946,0	555,0	542,0
	misura 4	940,0	556,0	527,0
	misura 5	946,0	556,0	542,0
22	misura 1	982,0	553,0	571,0
	misura 2	986,0	557,0	567,0
	misura 3	995,0	561,0	544,0
	misura 4	977,0	556,0	583,0
	misura 5	982,0	554,0	529,0
23	misura 1	930,0	517,0	524,0
	misura 2	943,0	526,0	542,0
	misura 3	928,0	518,0	508,0
	misura 4	935,0	517,0	534,0
	misura 5	935,0	517,0	529,0
24	misura 1	924,0	536,0	520,0
	misura 2	921,0	537,0	525,0
	misura 3	926,0	523,0	514,0
	misura 4	932,0	524,0	531,0
	misura 5	930,0	526,0	516,0

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130



**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
25	misura 1	941,0	515,0	482,0
	misura 2	943,0	520,0	489,0
	misura 3	943,0	519,0	489,0
	misura 4	940,0	515,0	500,0
	misura 5	939,0	526,0	508,0
26	misura 1	950,0	511,0	580,0
	misura 2	945,0	517,0	588,0
	misura 3	950,0	514,0	589,0
	misura 4	944,0	520,0	601,0
	misura 5	940,0	513,0	593,0
27	misura 1	894,8	532,0	545,0
	misura 2	878,4	533,0	543,0
	misura 3	894,8	530,0	525,0
	misura 4	894,8	528,0	542,0
	misura 5	890,7	520,0	541,0
28	misura 1	1032,0	568,0	512,0
	misura 2	1013,0	575,0	536,0
	misura 3	1030,0	566,0	557,0
	misura 4	1009,0	564,0	566,0
	misura 5	1008,0	577,0	546,0
29	misura 1	968,0	540,0	501,0
	misura 2	968,0	541,0	498,0
	misura 3	972,0	543,0	505,0
	misura 4	971,0	540,0	505,0
	misura 5	970,0	544,0	501,0
30	misura 1	988,0	545,0	574,0
	misura 2	993,0	543,0	541,0
	misura 3	991,0	546,0	575,0
	misura 4	977,0	531,0	548,0
	misura 5	986,0	540,0	543,0

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
31	misura 1	974,0	555,0	538,0
	misura 2	985,0	556,0	549,0
	misura 3	983,0	556,0	541,0
	misura 4	990,0	550,0	585,0
	misura 5	990,0	558,0	586,0
32	misura 1	1014,0	583,0	541,0
	misura 2	1008,0	583,0	575,0
	misura 3	1015,0	588,0	549,0
	misura 4	1002,0	583,0	551,0
	misura 5	1020,0	619,0	552,0
33	misura 1	987,1	553,1	573,0
	misura 2	989,2	551,2	550,1
	misura 3	1001,0	542,0	550,1
	misura 4	991,2	548,0	562,2
	misura 5	1006,0	555,1	562,0
34	misura 1	947,0	518,0	584,0
	misura 2	947,0	514,0	553,0
	misura 3	944,0	517,0	547,0
	misura 4	954,0	512,0	566,0
	misura 5	943,0	512,0	582,0
35	misura 1	959,0	537,0	658,0
	misura 2	958,0	532,0	583,0
	misura 3	948,0	541,0	650,0
	misura 4	949,0	546,0	562,0
	misura 5	951,0	543,0	467,0
36	misura 1	1194,0	852,0	484,0
	misura 2	1067,0	898,0	564,0
	misura 3	1182,0	851,0	612,0
	misura 4	1197,0	647,0	521,0
	misura 5	1251,0	748,0	551,0

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130

**APPENDICE D - RISULTATI DELLE MISURE INDIPENDENTI (CONTINUA)**

LAB	Misure indipendenti	ISPRA RM036	ISPRA RM037	ISPRA RM038
		COD		
		mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>		
		Valore	Valore	Valore
37	misura 1	1023,0	578,0	566,0
	misura 2	1026,0	566,0	571,0
	misura 3	1033,0	582,0	592,0
	misura 4	1030,0	586,0	543,0
	misura 5	1030,0	601,0	558,0
38	misura 1	987,0	560,0	545,0
	misura 2	983,0	560,0	543,0
	misura 3	984,0	560,0	559,0
	misura 4	987,0	560,0	539,0
	misura 5	986,0	560,0	565,0
13 APAT-IRSA (4)	misura 1	980,0	550,0	610,0
	misura 2	1000,0	540,0	580,0
	misura 3	1020,0	550,0	590,0
	misura 4	960,0	560,0	600,0
	misura 5	980,0	540,0	590,0
20 APAT-IRSA (4)	misura 1	868,6	527,0	507,5
	misura 2	868,6	517,3	497,8
	misura 3	868,6	527,0	507,5
	misura 4	868,6	527,0	497,8
	misura 5	868,6	517,3	497,8
27 APAT-IRSA (4)	misura 1	894,8	527,8	523,7
	misura 2	878,4	531,9	523,7
	misura 3	894,8	527,8	490,7
	misura 4	894,8	531,9	490,7
	misura 5	890,7	527,8	507,2

(1) Misure con metodo in cuvetta Spectroquant (2) Misure con metodo in cuvetta HACH-LANGE (3) Misure escluse dalla valutazione statistica (4) Misure eseguite con metodo APAT –IRSA 5130