



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



CLORURI, NITRATI, SOLFATI

CARBONIO INORGANICO (DIC)

metodo in cromatografia liquida a scambio ionico
con eluente potassio idrossido – loop iniezione 20-25 µL

PRINCIPIO DEL METODO

Un'aliquota di campione, iniettata nel flusso di eluente alcalino (KOH), viene pompata nella colonna di separazione contenente la resina a scambio anionico: qui gli anioni si separano in base alla loro affinità con i siti attivi della resina. Gli anioni attraversano quindi il sistema di soppressione a micromembrana dove vengono convertiti nei loro corrispondenti acidi forti (HCl, HNO₃ e H₂SO₄), mentre per il carbonio inorganico disciolto (C_{in} o DIC), che è la somma del carbonio da carbonati, bicarbonati ed anidride carbonica disciolta, si ha la formazione di acido carbonico dissociato in anidride carbonica gassosa ed acqua (H₂CO₃* = CO₂ + H₂O). L'eluente KOH subisce invece lo scambio del K⁺ con H⁺ con formazione di acqua a bassa conducibilità (minore di 1 µS/cm).

Il rivelatore conduttometrico, posto dopo il soppressore, permette l'identificazione delle diverse specie anioniche sulla base dei tempi di ritenzione, mentre la loro quantificazione si ottiene dall'area dei picchi, in seguito a una adeguata calibrazione.

Il valore del carbonio inorganico disciolto ottenuto con questo metodo può essere confrontato con l'alcalinità totale ottenuta con i metodi per titolazione acido base come il metodo di Gran o a due punti finali (pH 4,5 e 4,2). L'unica differenza sostanziale è che in IC viene determinata anche l'anidride carbonica disciolta che solitamente presenta concentrazioni basse o trascurabili, mentre per titolazione (Gran o 2 punti finali) si determinano solo le basi presenti, che nelle acque naturali sono prevalentemente carbonati e bicarbonati. Una stima del contenuto di anidride carbonica disciolta nel campione all'equilibrio, può essere fatta utilizzando le equazioni indicate da Stumm & Morgan (1996) con le quali partendo dai valori di pH, alcalinità totale e tenendo conto della temperatura e della quota, si possono calcolare le varie forme di carbonio disciolto all'equilibrio.

Gli aspetti teorici ed il confronto tra la determinazione del carbonio inorganico in IC e l'alcalinità totale, vengono discusse nell'ultimo capitolo di questo metodo.

INTERVALLO ANALITICO, LIMITI DI RIVELABILITA' E QUANTIFICAZIONE

Intervalli analitici e limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) ottenuti nell'analisi dei cationi con *loop* di iniezione da 20 µL, utilizzando vari criteri di calcolo:

- IUPAC tre e dieci volte la deviazione *standard* della soluzione *standard* a concentrazione minore rispettivamente per LOD e LOQ;
- intervallo di predizione calcolato al 95 % dalle regressioni (Hubaux-Vos);

Analita	Intervallo (mg L ⁻¹)	LOD ottenuto secondo:		LOQ ottenuto secondo:	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
Cl ⁻	0,2 ÷ 60	0,05	0,09	0,10	0,20
N-NO ₃ ⁻	0,20 ÷ 20	0,030	0,060	0,100	0,200
C inorganico	1 ÷ 72	1	2	2	5
SO ₄ ⁼	1 ÷ 300	0,11	0,30	0,40	0,80

I valori di LOD ed LOQ dipendono dal volume iniettato, qui sono riferiti ad un *loop* da 20 µL, con volumi d'iniezione maggiori si possono determinare per cloruri, solfati e nitrati concentrazioni fino a 0,01 mg L⁻¹, mentre per il carbonio inorganico difficilmente si può scendere sotto 1 mg C L⁻¹. Per il carbonio inorganico si consigliano *loop* di piccole dimensioni (10-25 µL), i campioni con concentrazioni superiori all'intervallo di concentrazione qui riportato, non possono essere analizzati per diluizione a causa della CO₂ disciolta nell'acqua ultrapura che si utilizza per la diluizione.

RIPETIBILITÀ ANALITICA

I valori di ripetibilità sono stati ottenuti nel laboratorio di idrochimica del CNR-ISE dalla deviazione *standard* relativa (R.S.D.) delle carte di controllo a diverse concentrazioni analizzate per un periodo di 3-4 mesi in giorni diversi per un totale di almeno 20÷30 determinazioni.

	mg/L	R.S.D.		mg/L	R.S.D.
Cloruri	1	8 %	Azoto nitrico	1	9 %
	3	5 %		3	5 %
	10	4 %		5	4 %
C inorganico	10	12 %	Solfati	3	7 %
	23	4 %		15	4 %
	30	4 %		50	3 %

DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIATURA

Sistema cromatografico Dionex serie DX320 composto da pompa isocratica, rivelatore conduttometrico CDM ed UV-Visibile AD25, vano cromatografico termostato porta colonne ed autocampionatore AS50. L'utilizzo delle colonne Dionex AG19-AS19 o AG11HC-AS11HC richiede il generatore di eluenti EG40 per la produzione di KOH. Interfaccia di comunicazione con moduli cromatografici Dionex per *personal computer* compatibile con *software* Dionex *Chromeleon* 6.8 in ambiente Microsoft Windows XP.

Per ulteriori dettagli riguardanti installazione, manutenzione ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali delle singole parti strumentali ed i manuali di uso e manutenzione delle colonne di separazione e soppressione Dionex.



Sistema cromatografico Dionex DX320 con autocampionatore AS50

COLONNE, ELUENTI E SOPPRESSIONE

Colonne per separazione isocratica Dionex IonPac AG19 – AS19 oppure AG11HC – AS11HC diametro 4 mm.

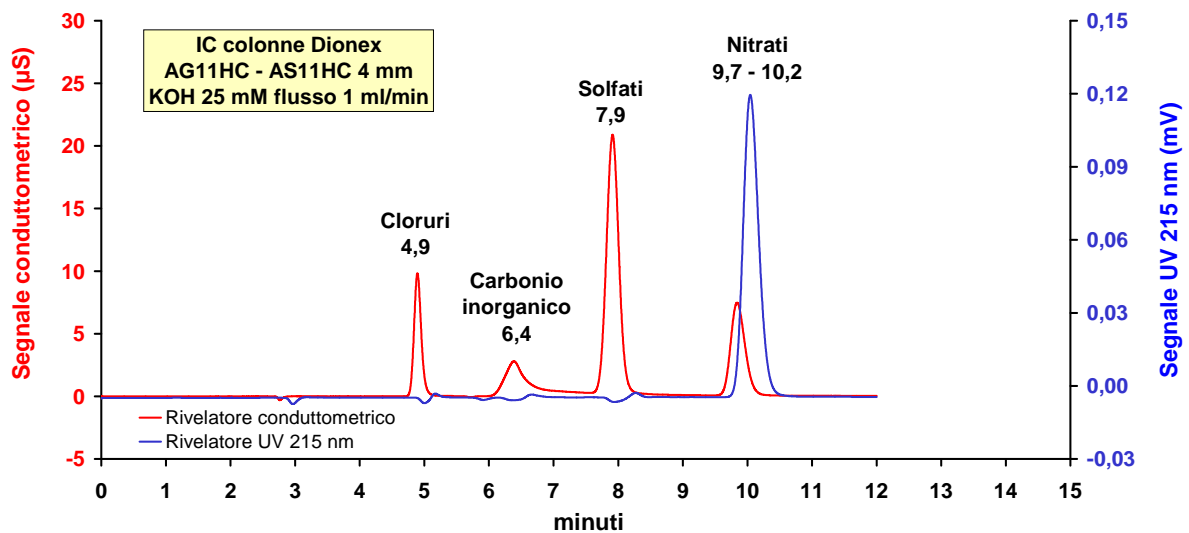
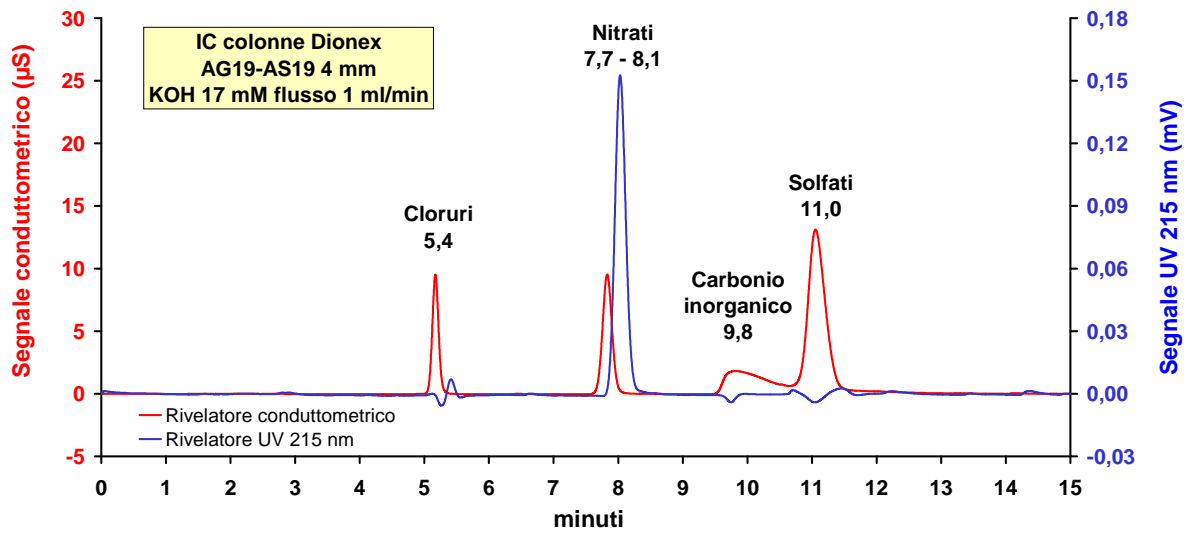
Soppressore dell'eluente di tipo elettrochimico a micromembrana Dionex ASRS 300 utilizzato in auto-rigenerazione continua ed alimentato dal *controller* SC20.

Generatore di eluenti EG40 con cartuccia EGC-KOH per la preparazione dell'eluente KOH partendo da acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22µm, con trappola anionica auto-rigenerante (CR-ATC); la concentrazione dell'eluente consigliata è di KOH 16÷25 mM; questo valore permette di ottenere una buona separazione del picco del carbonio inorganico in un ragionevole tempo analitico totale (12÷15 minuti).

Il flusso di eluente consigliato per ottenere un buon compromesso tra separazione, velocità di analisi e ripetibilità è di 1,0 mL al minuto.

Autosoppressione elettrochimica a micromembrana ASRS 300 con SC20 *Suppressor Controller* posizionato sul *Range* 0,25 A con CC SET a 65÷75 mA i valori risultanti di queste impostazioni sono di circa 3 volts e 65-70 mA; la conducibilità dell'eluente soppresso è compresa tra 0,3 e 0,7 µS cm⁻¹. Il *Controller* SRS del soppressore può essere acceso solo contemporaneamente all'attivazione del flusso della pompa e deve essere spento immediatamente dopo aver fermato il flusso dell'eluente. Si consiglia di rispettare questa sequenza in quanto gli elettrodi all'interno del soppressore vengono raffreddati dallo stesso flusso di eluente, ed è altrettanto importante non far passare eluente nel soppressore con il *Controller* SRS spento perché si causerebbe la perdita di efficienza del soppressore con conseguente diminuzione della sensibilità analitica.

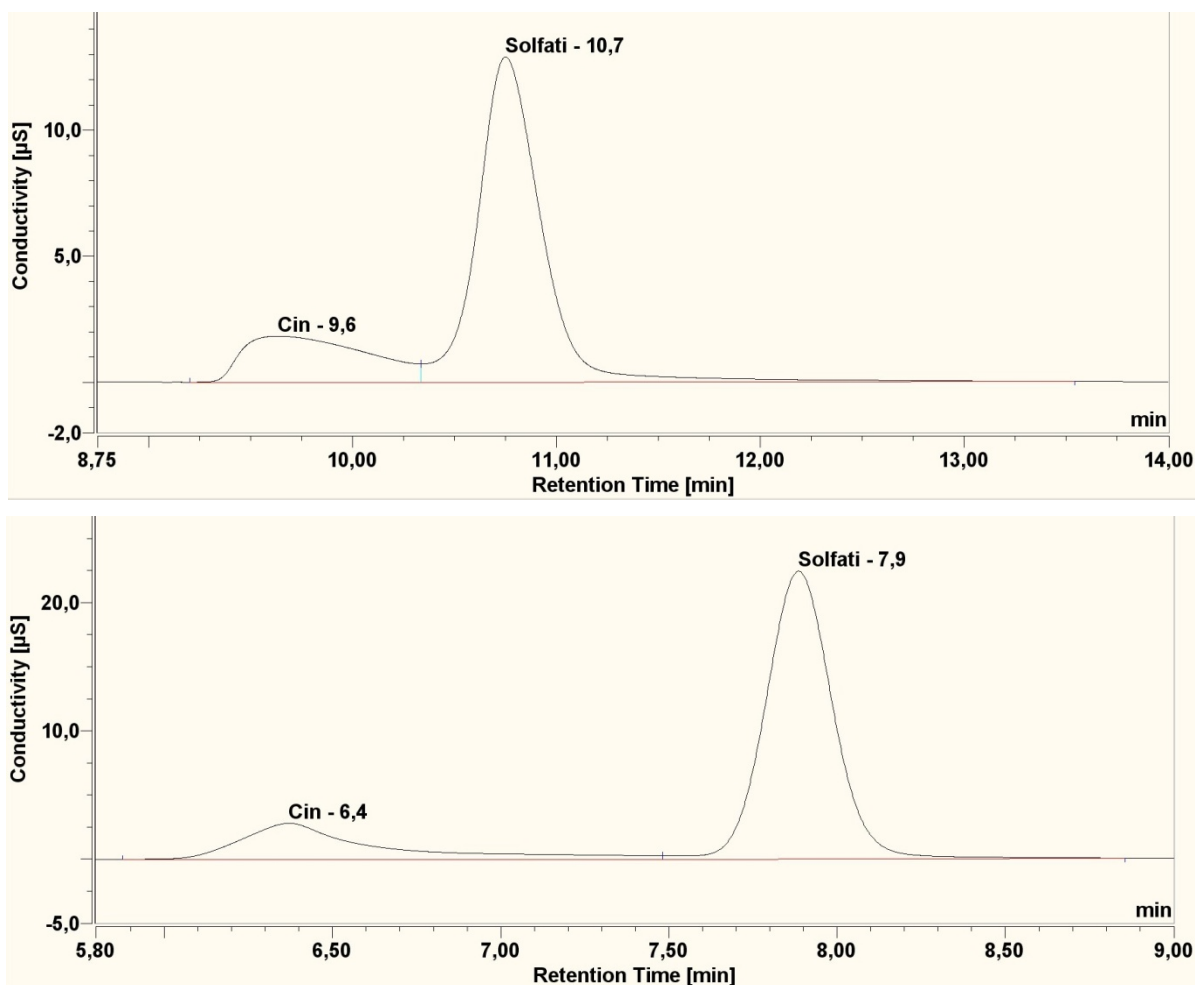
Con il generatore di eluenti EG40 con cartuccia EGC-KOH con trappola anionica auto-rigenerante (CR-ATC) si genera eluente KOH esente da carbonati ad elevato grado di purezza nelle concentrazioni comprese tra 0,1 e 100 mM per flussi compresi tra 0,1 e 3,0 mL min⁻¹; è eventualmente possibile eseguire dei gradienti di concentrazione utili per una migliore separazione di fluoruri ed acidi deboli (formiati ed acetati) che eluiscono prima del picco dei cloruri.



Esempio di cromatogrammi ottenuti nell'analisi in cromatografia ionica con colonne anioniche Dionex AG19 - AS19 (in alto) e AG11HC - AS11HC (in basso) con rivelatore conduttometrico (CDM) ed UV a 215nm con soppressione chimica dell'eluente (ASRS 300).

Per ogni anione viene riportato il tempo di ritenzione, le concentrazioni sono le seguenti: cloruri 5 mg L⁻¹, nitrati 3 mg N L⁻¹, carbonio inorganico 36 mg L⁻¹ e solfati 25 mg L⁻¹.

L'eluente KOH utilizzato con le colonne AG19 - AS19 permette di eluire il carbonio inorganico (carbonati, bicarbonati ed anidride carbonica disciolta) come carbonati presenti nel campione. Ad elevate concentrazioni di DIC questo picco dei carbonati può interferire sul picco dei nitrati, pertanto si consiglia di abbinare al rivelatore conduttometrico un rivelatore UV alla lunghezza d'onda di lettura di 215 nm per determinare i nitrati che assorbono a questa lunghezza d'onda. Con le colonne AG11HC - AS11HC queste interferenze sono decisamente più contenute.



Particolare dell'integrazione con *Chromeleon* 6.8 del carbonio inorganico e dei solfati nell'analisi in cromatografia ionica con colonne anioniche Dionex AG19 - AS19 (in alto) e AG11HC - AS11HC (in basso) con rivelatore conduttometrico. Concentrazioni del carbonio inorganico 36 mg L⁻¹ e dei solfati 25 mg L⁻¹.

CONDIZIONI D'INTEGRAZIONE

Le condizioni di integrazione vengono ottimizzate con il programma Dionex *Chromeleon* 6.8, per informazioni e chiarimenti sull'uso di questo *software* si consiglia di consultare il manuale d'uso.

Per la determinazione del carbonio inorganico si consigliano *loop* di iniezione da 20-25 µL al fine di limitare la forte asimmetria del picco alle diverse concentrazioni.

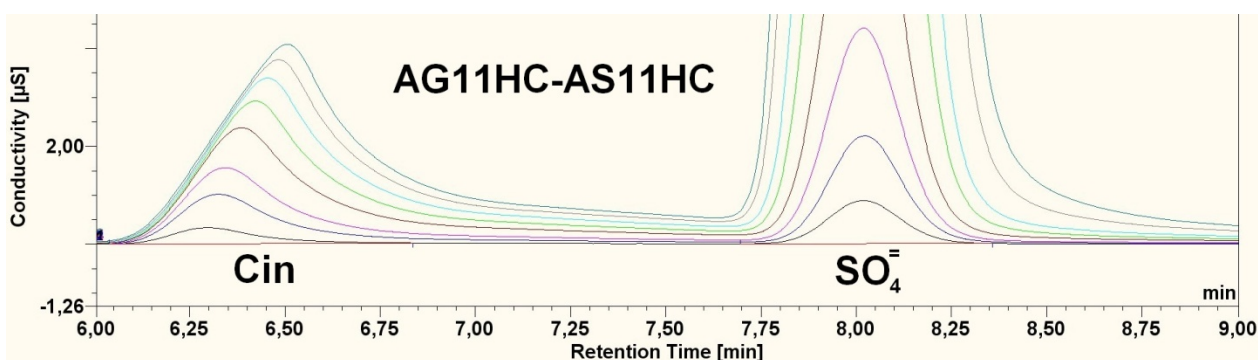
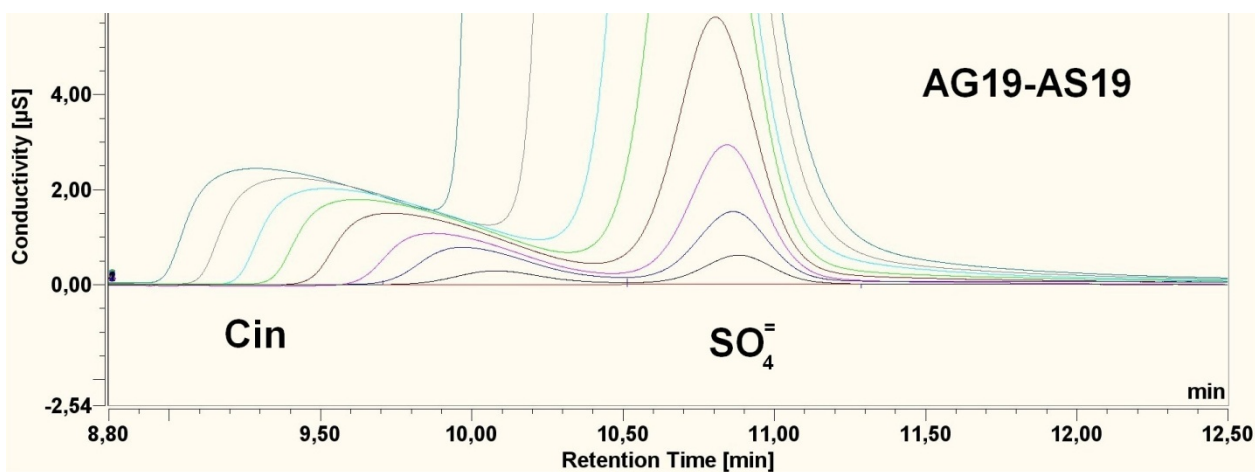
Nelle condizioni di lavoro qui indicate si ottengono cromatogrammi come quelli riportati negli esempi dove gli anioni vengono rilevati con le colonne AG19-AS19 in 14-15 minuti ai seguenti tempi di ritenzione espressi in minuti e decimi di minuto: cloruri 5,4, nitrati 8,0, carbonio inorganico circa 10 e solfati circa 11. Il picco del carbonio inorganico ha una notevole asimmetria con forti variazioni di ampiezza in funzione della sua concentrazione, piccole variazioni nella concentrazione dell'eluente determinano poi lo spostamento del picco che in alcuni casi può interferire con i picchi adiacenti (nitrati o solfati). In alternativa l'uso delle colonne AG11HC-AS11HC permette un'analisi più breve (circa 12 minuti) ed una migliore separazione del carbonio inorganico (6,4 minuti) che eluisce tra cloruri e solfati (rispettivamente a circa 5 e 8 minuti), con possibile interferenza con i solfati; i nitrati invece eluiscono dopo i solfati e non sono interferiti, pertanto non è necessario l'abbinamento al secondo rivelatore UV a 215 nm. Anche per queste colonne si ha una forte asimmetria del picco del carbonio inorganico come evidenziato nelle figure successive.

I tempi di ritenzione qui riportati sono indicativi e possono variare in funzione del sistema analitico e del suo volume morto o dell'invecchiamento delle colonne di separazione.

L'integrazione del picco del carbonio inorganico può essere ottimizzata inserendo i seguenti parametri di *Chromeleon*:

Parametro integrazione	Valore
Peak Slice	0,5
Front Riders to Main Peaks	On
Rider Skimming	Tangential at lower peak end

Nella figura sottostante si evidenzia la forte asimmetria del picco del carbonio inorganico e la variazione di ampiezza alla base all'aumentare della concentrazione. Per limitare questo disturbo è necessario lavorare con un *loop* di iniezione piccoli (10-25µL) ed utilizzare calibrations di tipo quadratico quando si hanno ampi intervalli di concentrazione (superiori ad un ordine di grandezza).



Asimmetria e spostamento del picco del carbonio inorganico (C_{in}) in funzione della concentrazione, rispetto al picco dei solfati nell'analisi in IC con colonne anioniche Dionex AG19 - AS19 e AG11HC - AS11HC con rivelatore conduttometrico.

Le concentrazioni di carbonio inorganico e solfati sono rispettivamente comprese negli intervalli 1 ÷ 72 mg C L⁻¹ e 1 ÷ 300 mg L⁻¹.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere preparati negli appositi *vial* per autocampionatore precedentemente lavati con acqua deionizzata; per il riempimento utilizzare una siringa in polietilene da 5 mL alla quale viene applicato un filtro a membrana da 0,8 µm, avvinare almeno due volte la siringa, l'apparato di filtrazione e il *vial* con il campione da analizzare.

Nella determinazione del carbonio inorganico prestare molta attenzione alle variazioni di anidride carbonica disciolta nel campione (assorbimento o rilascio). La CO₂ disciolta nel campione può essere superiore o inferiore a quella dell'ambiente (il laboratorio) rispettivamente per effetti di sopra saturazione o sotto saturazione indotti dalle attività biologiche (produzione algale, decomposizione della sostanza organica, anossia, ecc.) o anche per il solo effetto della pressione idrostatica a cui si trovava l'acqua al momento del prelievo. E' quindi indispensabile eseguire questa analisi quanto prima possibile e sul campione appena aperto limitando il contatto con l'ambiente di lavoro. E' stato verificato su campioni di acque di fiume e campioni di acque di lago profonde (> 200 m) che il processo di riequilibrio del campione con l'anidride carbonica del laboratorio è comunque un processo abbastanza lungo che necessita di alcuni giorni.

STANDARD DI LAVORO

Come in tutte le determinazioni cromatografiche anche la cromatografia ionica richiede almeno una calibrazione giornaliera, è indispensabile quindi preparare una serie di *standard* rappresentativi dell'intervallo di concentrazioni dei campioni analizzati come le soluzioni multielemento per l'uso più corrente descritte sotto.

Quando si analizzano campioni aventi rapporti di concentrazione diversi dagli *standard* multielemento già pronti o concentrazioni tra loro molto simili, è buona abitudine preparare tre *standard* specifici a concentrazione molto vicina a quella dei campioni.

La notevole sensibilità della metodica analitica impone per la preparazione degli *standard* l'uso di sali ad alto grado di purezza (grado analitico) opportunamente essiccati in stufa per almeno 1 ora a 105 °C e conservati in essiccatore. Unica eccezione è il sodio bicarbonato che non deve essere scaldato a temperature superiori i 40 °C perché si disproporziona in carbonato di sodio e anidride carbonica.

Note operative: in tutte le fasi della preparazione bisogna prestare la massima attenzione ai possibili inquinamenti tra le diverse soluzioni madre; le pesate si eseguono separatamente utilizzando una bilancia analitica da laboratorio (risoluzione 0,00001 g).

E' consigliabile utilizzare sempre lo stesso gruppo di pipette a volume fisso di classe A per ogni soluzione *standard* o pipette automatiche manuali o elettroniche periodicamente calibrate per pesata; i matracci tarati devono essere di classe A risciacquati di volta in volta solo con acqua deionizzata ultrapura.

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

Tutte le operazioni di diluizione si eseguono con acqua deionizzata ultrapura filtrata a 0,22 µm.

SOLUZIONI MADRE MULTIELEMENTO

- A** in matraccio da 500 mL - conservabile per due mesi
 0,8242 g NaCl = 1000 mg Cl L⁻¹
 4,5353 g K₂SO₄ = 5000 mg SO₄ L⁻¹
- B** in matraccio da 1000 mL - conservabile un mese
 10 mL madre A in 1000 mL = 10 mg Cl L⁻¹
 = 50 mg SO₄ L⁻¹

SOLUZIONI MADRE SINGOLO ELEMENTO

- C** in matraccio da 500 mL - conservabile un mese
 3,0341 g NaNO₃ = 1000 mg N-NO₃ L⁻¹
- D** in matraccio da 200 mL - conservabile una settimana
 2 mL madre C in 200 mL = 10 mg N-NO₃ L⁻¹

Nel caso si debbano preparare delle soluzioni *standard* diverse da quelle riportate negli *standard* anioni multielemento, può essere utile avere a disposizione anche le seguenti soluzioni madre a singolo elemento:

- E** in matraccio da 500 mL - conservabile due mesi
 0,8242 g NaCl = 1000 mg Cl L⁻¹
- F** in matraccio da 200 mL - conservabile un mese
 20 mL madre E in 200 mL = 100 mg Cl L⁻¹
- G** in matraccio da 1000 mL - conservabile due mesi
 0,9071 g K₂SO₄ = 500 mg SO₄ L⁻¹
- H** in matraccio da 1000 mL - conservabile due mesi (il sale non va scaldato oltre i 40 °C)
 1,6801 g NaHCO₃ = 240,22 mg CL⁻¹ corrispondenti a 20 meq L⁻¹

STANDARD ANIONI MULTIELEMENTO

Gli *standard* multielemento per la calibrazione degli anioni, vengono preparati partendo dalle soluzioni madre precedentemente descritte per diluizione in matraccio da 200 mL per lo *standard* 0 ed in matraccio da 100 mL per gli *standard* da 1 a 7; lo schema delle diluizioni è il seguente.

Soluzione Madre	Preparazione delle soluzioni <i>standard</i> multi elemento in 100 mL							
	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9
A				200 µL	500 µL	1000 µL	3000 µL	6000 µL
B	2000 µL	5 mL	10 mL					
C				150 µL	300 µL	500 µL	1000 µL	2000 µL
D	2000 µL	5 mL	10 mL					
H	500 µL	2500 µL	5000 µL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL

La numerazione degli *standard* riprende quella del metodo Anioni IC con loop di iniezione da 100 µL

Questi *standard* sono utilizzabili per una settimana e si conservano a temperatura ambiente in recipienti da 100 mL in policarbonato con tappo a vite e bocca larga di facile accesso alla siringa per il prelevamento; ogni recipiente e ogni siringa devono essere utilizzati sempre e solo per lo stesso *standard*. La tabella seguente riassume le concentrazioni in mg L⁻¹ degli *standard* multielemento:

Concentrazione in mg L ⁻¹ delle soluzioni <i>standard</i> multielemento								
Variabile	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9
Cl ⁻	0,20	0,50	1,00	2,00	5,0	10,0	30,0	60,0
N-NO ₃ ⁻	0,200	0,500	1,000	1,50	3,00	5,00	10,00	20,00
C inorganico	1,20	6,00	12,01	24,02	36,03	48,04	60,06	72,07
SO ₄ ²⁻	1,00	2,50	5,00	10,00	25,0	50,0	150,0	300,0

Le soluzioni di calibrazione a concentrazione più bassa (st. 2÷4) devono essere preparate giornalmente, mentre le altre possono venire utilizzate per dieci giorni dalla data di preparazione.

Si consiglia di predisporre una tabella sulla quale annotare la data di preparazione di ciascun soluzione *standard*.

Le soluzioni di calibrazione del carbonio inorganico devono essere preparate solo con sali di bicarbonato, inoltre per limitare l'interferenza dell'anidride carbonica dall'atmosfera gli standard devono essere preparati al momento con acqua ultrapura degassata al bagno ultrasuoni limitando il più possibile il contatto con l'aria. Si consiglia la preparazione di *standard* dedicati al carbonio inorganico rispettando gli stessi rapporti di nitrati e solfati presenti nei campioni analizzati o comunque aggiungere a tutti l'anione solfato. Nel caso di *standard* contenenti il solo carbonio inorganico aggiungere anche 10 mg L⁻¹ di solfati (2 mL di madre G in 100 mL).

Per comodità si riportata nella sottostante tabella la corrispondenza tra mg C L⁻¹ e meq L⁻¹.

mg C L ⁻¹	1,20	6,00	12,01	24,02	36,03	48,04	60,06	72,07
meq L ⁻¹	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0

ANALISI

Le seguenti note analitiche sono indicative e relative alla strumentazione precedentemente descritta, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore; per ulteriori informazioni tecniche vedere quindi gli specifici manuali relativi alle colonne e alla strumentazione Dionex.

Prima di iniziare un ciclo analitico, colonne di separazione e soppressore vanno equilibrati con il flusso degli eluenti per almeno un'ora, fino ad ottenere una linea di base stabile al *range* conduttometrico di lavoro (verificare la stabilizzazione controllando la linea di base ottenuta dall'iniezione di alcuni *standard* a bassa concentrazione).

L'analisi dei campioni viene eseguita iniettando *standard* e campioni con un *loop* di piccole dimensioni a volume fisso (20 - 25 µL).

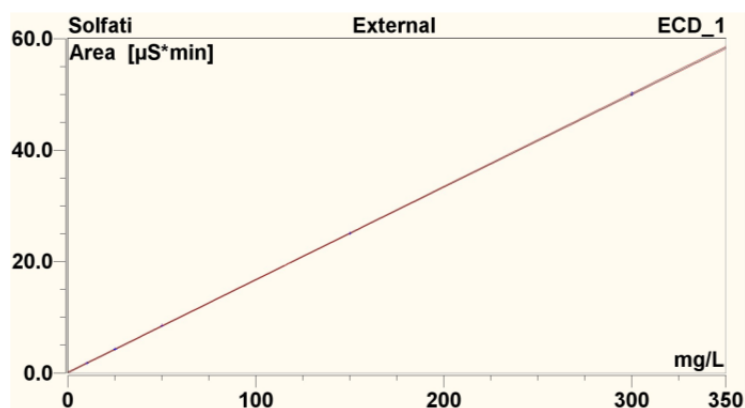
Un ciclo di analisi è solitamente composto dalla sequenza di 5÷7 *standard* per la calibrazione, di almeno due carte di controllo a concentrazioni diverse ed un bianco di acqua ultrapura, seguiti da 20÷25 campioni; al termine dei campioni viene riletta la sequenza iniziale di *standard*, carte di controllo e bianchi.

Modalità di calibrazione

Le calibrazioni si eseguono per regressione lineare della concentrazione di ogni analita rispetto l'area del corrispondente picco, l'intercetta con l'origine deve essere calcolata controllando che non sia molto diversa da zero. La scelta delle modalità di calibrazione dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola calibrazione; normalmente vengono scelti intervalli che vanno da un minimo di un ordine di grandezza (0,1-1) fino a tre ordini di grandezza (0,1-100).

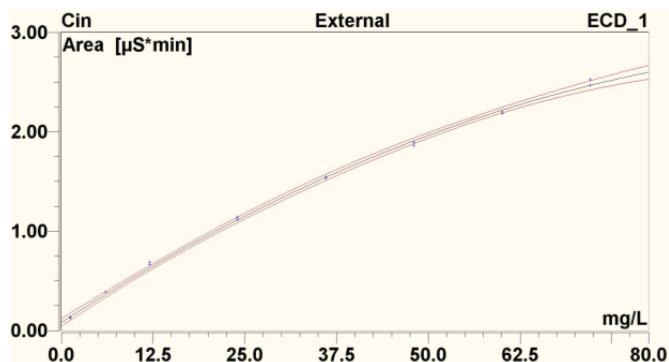
Per visualizzare i grafici delle calibrazioni utilizzando il software d'integrazione Dionex *Chromeleon* 6.8, si consiglia di attivare l'opzione che visualizza con delle linee rosse di l'intervallo di confidenza superiore ed inferiore al livello fiduciale del 95%.

L'eluente KOH utilizzato con le colonne AG19-AS19 e e AG11HC – AS11HC permette di determinare cloruri, nitrati e solfati fino a due ordini di grandezza con calibrazioni lineari aventi intercetta calcolata molto prossima all'origine; si consiglia di calibrare con 5-6 livelli di concentrazione scelti tra gli *standard* precedentemente descritti (st. 2 a 9).

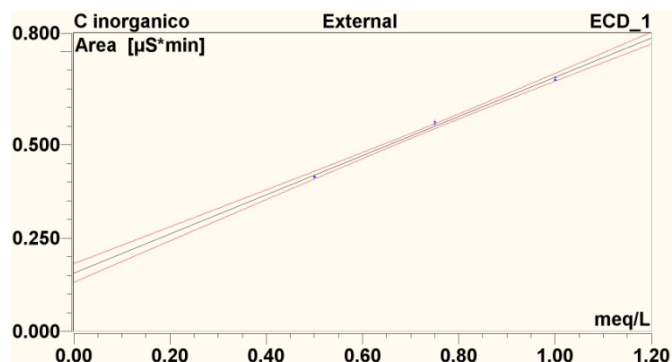


Calibrazione lineare dei solfati con 5 punti nell'intervallo 10÷300 mg L⁻¹ con l'intervallo di confidenza al 95% (linee rosse)

Per la determinazione del carbonio inorganico quando si hanno ampi intervalli di concentrazione (superiori ad un ordine di grandezza), si deve utilizzare la calibrazione di tipo quadratica inserendo anche il punto zero (0QOff in *Chromeleon*); questa modalità di calibrazione ha però la limitazione di avere un limite di determinazione ottenuto con il metodo della regressione (Hubaux-Vos con intervallo di confidenza al 95%) abbastanza elevato, circa 3 mg C L⁻¹ (0,25 meq L⁻¹). La calibrazione lineare è utilizzabile solo per intervalli di concentrazione molto limitati (3 punti entro un ordine di grandezza) e comunque si consiglia di valutare l'utilizzo della calibrazione quadratica anche per queste calibrazioni.



Calibrazione quadratica del carbonio inorganico nell'intervallo 1÷70 mg C L⁻¹ intervallo di confidenza al 95% (linee rosse)



Calibrazione lineare del carbonio inorganico relativa al Lago Maggiore nell'intervallo limitato tra 0,5÷1 meq L⁻¹ intervallo di confidenza al 95% (linee rosse)

L'utilizzo della calibrazione su tre punti è consigliata per campioni molto simili (ad esempio acque provenienti dallo stesso lago o fiume) dove i tre *standard* vengono preparati a concentrazioni molto prossime ai valori attesi (molto inferiore ad un ordine di grandezza). A questo scopo si possono utilizzare tre *standard* scelti tra quelli della serie o prepararne di più specifici partendo dalle madri singolo elemento. Nell'esempio qui riportato della calibrazione eseguita per le concentrazioni del Lago Maggiore (0,5 – 0,8 – 1 meq L⁻¹) si sono ottenuti limiti di determinazione di circa 0,2 meq L⁻¹ (2,5 mg C L⁻¹) con il metodo della regressione (Hubaux-Vos con intervallo di confidenza al 95%).

All'interno della stessa sequenza analitica è importante confrontare le calibrazioni (normalmente due di cui una all'inizio ed una alla fine della sequenza analitica) al fine di verificare che il segnale ottenuto per ogni *standard* non sia più del 3 % differente dalle altre calibrazioni (derive strumentali o iniezioni anomale); il *software* Dionex *Chromeleon* 6.8 permette di costruire un'unica calibrazione con tutti gli *standard* (iniziale e finale) utilizzati nella sequenza adottando nel metodo l'impostazione *total* alla cartella *General*.

Si consiglia inoltre di predisporre un *file* su foglio elettronico per l'archiviazione ed il confronto con una lunga serie di segnali in area relativi agli *standard* comunemente analizzati, al fine di controllare la stabilità strumentale e la ripetibilità nella preparazione delle soluzioni calibranti.

Elaborazione dei risultati analitici

Al termine dell'analisi di una sequenza analitica si deve procedere ai seguenti controlli ed elaborazioni dei risultati ottenuti:

1. riconoscimento, acquisizione ed integrazione appropriata dei picchi degli analiti provvedendo ad eventuali ritocchi sulle linee di base, particolare attenzione va riservata al picco del carbonio inorganico la cui integrazione va spesso rivista;
2. controllo delle calibrazioni verificando la qualità della regressione attraverso la visualizzazione degli intervalli fiduciali al 95% ed il valore dell'intercetta prossimo allo zero;
3. verifica dell'accordo tra concentrazioni nominali degli *standard* e valori ottenuti dalle calibrazioni (iniziale e finale con impostazioni globali di calibrazione in modalità *total*), il *software* *Chromeleon* quando visualizza il *report* di uno *standard*, riporta le concentrazioni calcolate dalla regressione, questi valori devono essere in buon accordo con i valori nominali;
4. nel caso di letture discordanti sugli *standard* è possibile eliminare alcuni punti di calibrazione (1 o al massimo 2) per ciascun analita: prima di procedere all'eliminazione dei punti si consiglia di confrontare i valori dei segnali in area trasferendoli nell'archivio Excel delle aree per ciascun *standard*;
5. controllo dei valori ottenuti dall'analisi dei campioni di carte di controllo ed archiviazione su foglio di lavoro Excel, al fine di confrontare i dati ottenuti nella sequenza con i dati conseguiti nel periodo precedentemente considerato nella carta di controllo;
6. verifica dei valori ottenuti dall'analisi dei bianchi ed archiviazione su foglio di lavoro Excel al fine di confrontare i dati ottenuti nella sequenza con i dati precedentemente ottenuti;
7. controllo e trascrizioni dei valori di concentrazione ottenuti sui campioni prestando attenzione che la calibrazione utilizzata comprenda i valori riscontrati nei campioni; per le calibrazioni quadratiche bisogna controllare che il segnale in area o altezza (μS) dell'analita nel campione non oltrepassi il segnale in area o altezza dell'analita nello *standard* a concentrazione più elevata.

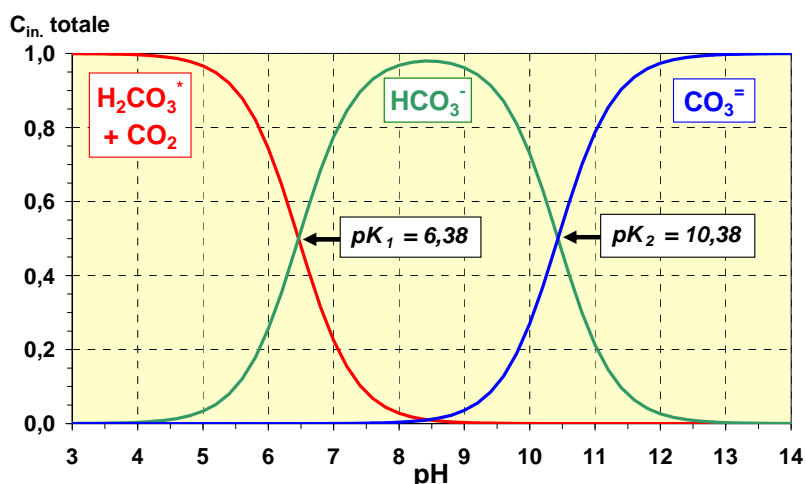
Nella trascrizione dei risultati analitici riportare i valori in concentrazione con il numero di cifre significative come descritto nel seguente schema:

Variabile	Intervallo di concentrazioni (mg L ⁻¹)		
	0-1	1-10	maggiore di 10
Cl ⁻	X,XX	X,X	X,X
N-NO ₃ ⁻	X,XXX	X,XX	X,X
C inorganico	X,X	X,X	X,X
SO ₄ ⁼	X,XX	X,XX	X,X

CARBONIO INORGANICO & ALCALINITÀ TOTALE:

Prima di discutere il confronto tra carbonio inorganico ed alcalinità totale rivediamo l'equilibrio dei carbonati e la relazione con l'alcalinità totale.

L'**equilibrio dei carbonati** in soluzione acquosa è riassunto nella sottostante figura che descrive la distribuzione delle varie forme di carbonio inorganico totale.



Curve relative agli equilibri delle forme del carbonio inorganico con il loro grado di dissociazione ($C_{in. totale} = 1 = 100\%$) in funzione del valore di pH.

Come si può vedere, nelle acque naturali con pH solitamente inferiore a 8,5 la forma prevalente è quella dei bicarbonati (HCO_3^-), mentre i carbonati ($CO_3^{=}$) cominciano ad essere presenti in modo significativo solo con pH superiori a 9 per raggiungere la massima concentrazione a pH 12,5-13,0. Per questo motivo nelle acque naturali con pH inferiore a 8,5 nel bilancio ionico il valore in meq L⁻¹ ottenuto dalla titolazione dell'alcalinità totale, viene associato unicamente ai bicarbonati.

Dallo stesso grafico si vede come a pH inferiore a 4,5 tutto il carbonio inorganico è nella forma di acido carbonico e CO₂ disciolto ($H_2CO_3^* + CO_2$) dove a sua volta l'acido carbonico asteriscato indica la somma di acido carbonico e biossido di carbonio, non analiticamente separabili.

Vengono inoltre riportate le costanti all'equilibrio di dissociazione (pK_1 e pK_2 a 20°C e 1 atm) per le acque dolci.

L'**alcalinità totale** è la capacità di un'acqua di neutralizzare gli acidi e corrisponde alla somma delle basi titolabili da un acido. In acque naturali con pH inferiore a 8,5 l'alcalinità totale è prevalentemente dovuta al contenuto di bicarbonati, mentre a pH superiori essa rappresenta il

contenuto di bicarbonati, carbonati e ioni idrossido; all'alcalinità totale possono contribuire anche borati, fosfati, silicati, solfuri, altre basi, alcuni composti organici o il particolato fine sospeso con caratteristiche alcaline (calciti ed alcune argille) quando presenti nel campione.

Per una più approfondita trattazione degli equilibri chimico fisici applicati alle acque naturali, vedere Stumm & Morgan. (1996) al capitolo 4 "Dissolved carbon dioxide" e Neal (2001), mentre per gli aspetti analitici si rimanda a Gran (1952) e Marchetto *et al.* (1997).

CONSIDERAZIONI SUL CONFRONTO DEL CARBONIO INORGANICO CON LA DETERMINAZIONE DELL'ALCALINITÀ PER TITOLAZIONE CON IL METODO DI GRAN.

La determinazione del carbonio inorganico disciolto (C_{in} o DIC) in IC descritta in questo metodo, è stata confrontata con:

1. la determinazione dell'alcalinità totale per titolazione acidimetrica con il metodo di Gran, in uso nel laboratorio di idrochimica del CNR ISE di Verbania e dettagliatamente descritta nel metodo ad uso interno *wAlk05*.
2. il valore di DIC calcolato dall'equilibrio del Carbonio inorganico secondo Stumm & Morgan (1996):

$$DIC = \frac{(TA_{alc} - K_w)/[H^+] + [H^+]}{\alpha_1 + 2\alpha_2}$$

dove: TA_{alc} è il valore di alcalinità totale, misurato con la titolazione acidimetrica secondo Gran;
K_w è la costante di equilibrio dell'acqua riferita alla temperatura del campione;
α₁ e α₂ sono rispettivamente le frazioni ionizzate di HCO₃⁻ e di CO₃⁼ ottenute dalle costanti di dissociazione all'equilibrio del carbonio inorganico (pK₁ e pK₂) corrette per la temperatura e la forza ionica del campione.

Il DIC ottenuto secondo Stumm & Morgan comprende le forme basiche e la CO₂ disciolta, calcolata dal valore del pH e dell'equilibrio dell'acido carbonico.

L'ipotesi del confronto è che il carbonio inorganico, analizzato in IC con eluente alcalino (KOH), comprenda le forme alcaline del DIC (bicarbonati e carbonati) e la CO₂ disciolta o parzialmente combinata con l'acido carbonico (H₂CO₃*), mentre l'alcalinità totale (TA_{alc}) per titolazione acidimetrica misura le forme alcaline del DIC e non la CO₂ disciolta.

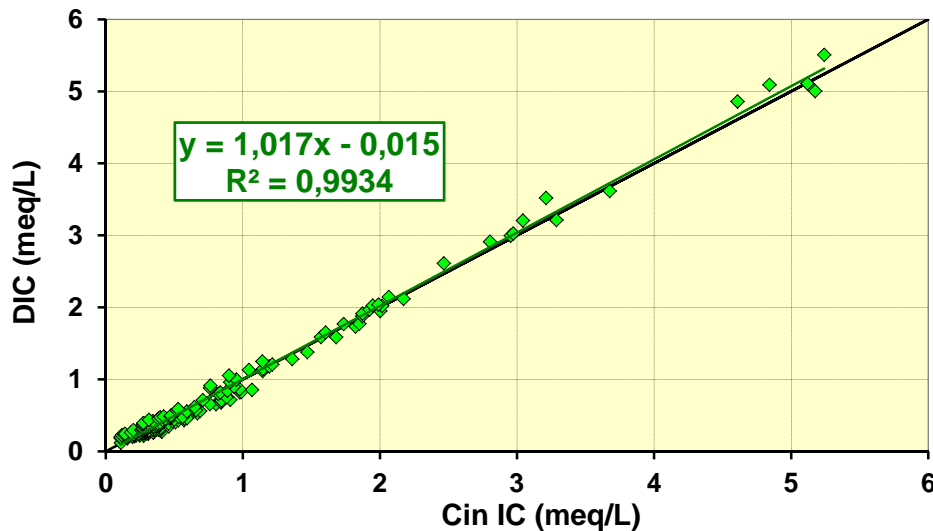
Se queste ipotesi sono verificate, C_{in} IC deve essere uguale al DIC ottenuto secondo Stumm & Morgan, ma diverso dall'alcalinità totale, in modo tanto più accentuato quanto più elevata è la concentrazione della CO₂ disciolta (p.es. campioni di acque anossiche, acque sotterranee soprassature di CO₂).

Come in parte già trattato in un precedente articolo Polesello *et al.* (2006), queste ipotesi sono state testate con un insieme di dati accoppiati su un gruppo di 160 campioni analizzati nel 2011-2012, rappresentativi di acque di fiume a basso contenuto di carbonio organico totale (TOC < 5 mg L⁻¹), le cui caratteristiche chimiche di base (pH, conducibilità elettrica, alcalinità e calcio) sono riportate nella tabella sottostante. In questa tipologia di campioni si assume trascurabile la presenza di altre basi organiche o inorganiche, disciolte o particolate.

Distribuzione dei valori di pH, conducibilità elettrica, alcalinità totale e calcio dei 160 campioni utilizzati per il confronto dei dati accoppiati ottenuti con i due metodi. L'intervallo analitico dell'alcalinità 0,1 – 5,4 meq L⁻¹ corrisponde a 1-65 mg C L⁻¹.

	pH	Conducibilità elettrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$ 20 °C)	Alcalinità totale (meq L ⁻¹)	Calcio (mg L ⁻¹)
Minimo	6,9	29	0,102	2,3
25 percentile	7,4	55	0,261	5,6
Mediana (50 ile)	7,6	92	0,411	10,6
75 percentile	8,0	190	0,870	23,6
Massimo	9,4	737	5,399	81,3

Sui dati è stato eseguito il test per il confronto della pendenza e dell'intercetta con la retta di regressione 1:1; il t-test per dati accoppiati con distribuzione normale ed il test non parametrico di Wilcoxon, più appropriato per andamenti non Gaussiani, anche se è noto che fornisce risultati simili quando applicato, come in questo caso, ad un elevato numero di dati (n>30). I risultati del confronto con la retta 1:1 del C_{in} IC con il DIC, riportati graficamente nella figura sottostante, mostrano un'ottima corrispondenza.



Confronto dati appaiati con la retta 1:1 (pendenza = 1). Carbonio inorganico ottenuto in IC rispetto DIC calcolato all'equilibrio secondo Stumm & Morgan (1996)

Su questo gruppo di dati è stato effettuato un confronto utilizzando i test statistici al livello di significatività $p < 0,001$ (pari all'0,1 % di probabilità che la differenza tra i metodi sia casuale). L'analisi statistica conferma le ipotesi di partenza e la validità del metodo di misura del C_{in} IC per la misura del carbonio totale inorganico presente in soluzione nelle sue diverse forme (bicarbonati, carbonati, H₂CO₃^{*}, CO₂ disciolta); i risultati sono riassunti in tabella.

Confronto del C_{in} IC con il DIC calcolato da alcalinità totale e pH secondo Stumm & Morgan (1996) e con l'alcalinità totale ottenuta per titolazione acidimetrica secondo Gran; concentrazioni espresse in meq L⁻¹.

	C_{in} IC - DIC	C_{in} IC – Alc. totale
Intervallo di concentrazioni (meq L ⁻¹)		0,10 – 6,00
Numero di dati		160
Esito del test Wilcoxon (p = 0,001)	Corrispondenti	Diversi
Valore di probabilità	0,92	0,00001
Regressione lineare: Alc = a + b x C _{in} IC		
Coefficiente correlazione lineare r	0,9967	0,9971
Esito test Pendenza = 1 (p = 0,001)	Corrispondenti	Corrispondenti
Valore pendenza	1,017	1,018
Esito del test sull'intercetta = 0 (p = 0,001)	Corrispondenti	Diversi
Intercetta (meq L ⁻¹)	-0,015	-0,042
Esito del test sulla differenza fra i dati	Corrispondenti	Diversi
Minimo (meq L ⁻¹)	-0,306	-0,350
25 %ile (meq L ⁻¹)	-0,047	-0,021
Mediana (meq L ⁻¹)	-0,004	0,026
75 %ile (meq L ⁻¹)	0,058	0,072
Massimo (meq L ⁻¹)	0,212	0,226
Media (meq L ⁻¹)	0,0001	0,0258
n. dati negativi	84	52
n. dati positivi	76	108

CONSIDERAZIONI FINALI SULL'APPLICABILITÀ DEI METODI ANALITICI

- Il metodo in IC è di semplice utilizzo per la determinazione contemporanea del carbonio inorganico (DIC) assieme agli altri anioni (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄⁼); in particolare si sottolinea che per la determinazione è sufficiente un piccolo volume di campione (1-2 mL).
- Per acque con poca CO₂ disciolta e prossima all'equilibrio o comunque non in forte soprasaturazione dove l'alcalinità totale si può assumere simile al DIC, il metodo in IC è una alternativa alla determinazione dell'alcalinità totale per titolazione acidimetrica.
- Per la determinazione dell'alcalinità totale la titolazione acidimetrica secondo Gran è sicuramente il metodo che fornisce i risultati più attendibili per accuratezza, ripetibilità e limite di quantificazione. La determinazione richiede un titolatore automatico con il software adatto all'elaborazione secondo Gran; per la determinazione sono necessari almeno 30 mL di campione.
- Nella determinazione in cromatografia ionica del DIC in acque soprasature di CO₂, se si determina anche l'alcalinità con la titolazione acidimetrica, è possibile stimare per differenza la CO₂ disciolta nel campione. Importante è però tenere in opportuna considerazione tutte le problematiche relative a campionamento, conservazione e rappresentatività del campione per determinare la CO₂ disciolta.

Riferimenti bibliografici.

- APAT. IRSA-CNR. 2003. Metodi analitici per le acque. 4020 Anioni in cromatografia ionica. Vol. 2. 1153 pp
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 2005. Standard Methods for the examination of water and wastewater. (Method 4110 B). Am. Publ. Healt Ass., Washington.
- Camusso, M., & S. Polesello. 2000. Determinazione di anioni (cloruro, nitrato, solfato, bromuro, fluoruro, fosfato e nitrito) mediante cromatografia ionica. Notiziario dei metodi analitici per le acque IRSA-CNR, febbraio 2000: 1-7.
- Gran G. 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titration II. Analyst 77: 661-671.
- Marchetto A., M. Bianchi, H. Geiss, H. Muntau, G. Serrini, G. Serrini-Lanza, G. A. Tartari and R. Mosello. 1997 Performances of analytical methods for freshwater analysis assessed through intercomparison exercises. I. Total alkalinity. Mem. Ist. ital. Idrobiol., 56: 1-13.
- Neal C. 2001. Alkalinity measurements within natural waters: towards a standardised approach. The Science of the Total Environment 265: 99-113.
- Polesello S., G.A. Tartari, P. Giacomotti, R. Mosello and S. Cavalli. 2006. Determination of total dissolved inorganic carbon in freshwaters by reagent-free ion chromatography. J. Chromatography A, 118: 56-61.
- Stumm, W. & J.J. Morgan. 1996. Aquatic chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1022pp.
- Tartari, G.A. & R. Mosello. 1997. Metodologie analitiche e controlli di qualità nel laboratorio chimico dell'Istituto Italiano di Idrobiologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Documenta Ist. ital. Idrobiol., 60: 160 pp. Sito web: <http://www.idrolab.ise.cnr.it>