



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

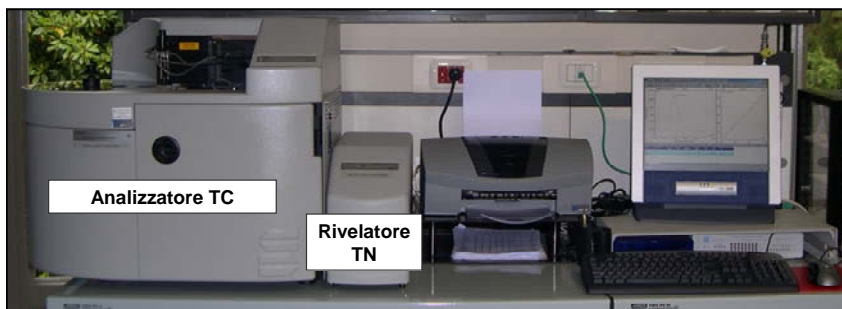


CARBONIO E AZOTO

metodo a combustione catalitica Skalar Formacs TC/TN

PRINCIPIO DEL METODO

Una aliquota di campione (50-200 μL) viene iniettata all'interno di una camera di combustione a 850 °C costituita da un tubo di quarzo contenente il catalizzatore ossidativo (CeO_2). Il carbonio e tutte le specie azotate presenti nelle varie forme dei composti inorganici ed organici, vengono ossidate rispettivamente a CO_2 e NO . I prodotti della combustione, spinti dal gas trasportatore (O_2), vengono raffreddati in due trappole di condensazione di cui una ad effetto Peltier a 2 °C, successivamente la CO_2 viene determinata in un rivelatore a infrarossi (IR) a 4,2 μm e gli NO dopo ozonizzazione con trasformazione in NO^* , vengono determinati nel rivelatore a chemiluminescenza (CLD).



Analizzatore Skalar Formacs TC/TN

DEFINIZIONI DELLE FORME DI CARBONIO ed AZOTO

- CARBONIO TOTALE (TC): è costituito dalla totalità del carbonio presente nel campione, ovvero dalla somma del carbonio organico (TOC) ed inorganico (TIC) e viene quantificato sul campione analizzato tal quale senza alcun pre trattamento di filtrazione, acidificazione o gorgogliamento con gas (O_2).

$$\text{TC} = \text{TOC} + \text{TIC}$$

- CARBONIO TOTALE DISCIOLTO (DC): è la somma di carbonio organico ed inorganico disciolto presente nel campione dopo filtrazione (0,45 μm) ed analizzato senza acidificazione o gorgogliamento con gas (O_2).

$$\text{DC} = \text{DIC} + \text{DOC}$$

- CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC): è la porzione di carbonio organico che rimane dopo l'acidificazione del campione tal quale (senza filtrazione) ed eliminazioni del carbonio inorganico (TIC) come CO_2 . Il TOC dovrebbe in linea teorica contenere anche la porzione volatile, spesso però viene misurato su campioni nei quali tale frazione è già stata rimossa.

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$$

- CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO (DOC): è la frazione di carbonio organico misurata su campioni filtrati con filtri a porosità di 0,45 µm e successivamente acidificati per eliminare la CO₂ prodotta dalla neutralizzazione del carbonio inorganico (DIC).
- CARBONIO ORGANICO PARTICELLATO (POC): è la frazione di carbonio organico contenuta nelle particelle raccolte su un filtro con porosità solitamente di 0,45 µm.
- CARBONIO INORGANICO (TIC): è la somma di carbonati, bicarbonati ed anidride carbonica che a seguito dell'acidificazione vengono trasformati in anidride carbonica asportata per degasaggio.

$$\text{TIC} = \text{TC} - \text{TOC}$$

Se l'analisi viene eseguita sulla frazione filtrata a 0,45 µm, viene chiamato carbonio inorganico disciolto (DIC).

- CARBONIO ORGANICO VOLATILE (VOC): è la frazione di carbonio organico contenuto in sostanze organiche molto volatili rimovibili insufflando gas esente da CO₂ nel campione.
- NON PURGEABLE ORGANIC CARBON (NPOC): è la porzione di carbonio organico che rimane nel campione tal quale (non filtrato) dopo che è stato insufflato con gas per eliminare le forme altamente volatili di carbonio.

$$\text{NPOC} = \text{TOC} - \text{VOC}$$

- AZOTO TOTALE (TN) è costituito dalla somma di tutte le specie azotate inorganiche ed organiche e quantificato sul campione tal quale non filtrato.
- AZOTO KJELDAHL (N_{Kjel}) è la somma dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico

$$N_{\text{Kjel}} = \text{NH}_4^+ + N_{\text{Org}}$$

Questa denominazione deriva dalla metodica secondo Kjeldahl utilizzata per anni e che si basa sulla digestione in acido solforico (mineralizzazione con catalizzatori alla temperatura di 350-370°C). La successiva distillazione dell'ammoniaca con sodio idrossido e riassorbimento su acido solforico a concentrazione nota, permette di quantificare la somma delle concentrazioni di azoto ammoniacale ed organico. Quando la determinazione viene eseguita sul campione tal quale (non filtrato), viste le energiche condizioni di mineralizzazione, la componente N_{Org} è data dal disciolto più il particellato mineralizzabile.

- AZOTO TOTALE DISCIOLTO (DTN) è costituito dalla somma di tutte le specie azotate inorganiche ed organiche e quantificato su campioni filtrati con filtri a porosità di 0,45 µm.

$$\text{DTN} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ + N_{\text{Org}}$$

e che con l'approssimazione per la componente N_{Org} particellata dell'N_{Kjel} può essere trascritta:

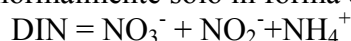
$$\text{DTN} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + N_{\text{Kjel}}$$

- AZOTO ORGANICO DISCIOLTO (DON) è costituito dalla somma di tutte le specie azotate organiche (N_{Org}) disciolte e quantificato per differenza tra DTN e DIN.

$$\text{DON} = \text{DTN} - \text{DIN}$$

- AZOTO ORGANICO PARTICELLATO (PON): è la frazione di azoto organico raccolta su un filtro con porosità solitamente di 0,45 µm.

- AZOTO INORGANICO DISCIOLTO (DIN) è la somma delle forme inorganiche nitrato, nitrito e ammonio che sono normalmente solo in forma disciolta.



Acronimi comunemente utilizzati per indicare le diverse specie di carbonio ed azoto presenti nelle acque.

Carbonio	Acronimi
Carbonio totale (disciolto & particellato)	TC = TOC+TIC
Carbonio totale disciolto	DC = DIC+DOC
Carbonio organico totale	TOC = DOC+POC
Carbonio organico disciolto	DOC
Carbonio inorganico totale	TIC
Carbonio inorganico disciolto	DIC
Carbonio organico particolato	POC
Carbonio organico volatile	VOC
Carbonio organico meno frazione volatile	NPOC = TOC-VOC

Azoto	Acronimi
Azoto totale (disciolto & particellato)	TN = DTN+PON
Azoto Kjeldahl	$N_{\text{Kjel}} = \text{NH}_4^+ + N_{\text{Org}}$
Azoto totale disciolto	DTN
Azoto organico disciolto	DON
Azoto organico particolato	PON
Azoto inorganico disciolto	DIN

CAMPO DI APPLICAZIONE

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

INTERVALLO ANALITICO, LIMITI DI RIVELABILITA' E QUANTIFICAZIONE

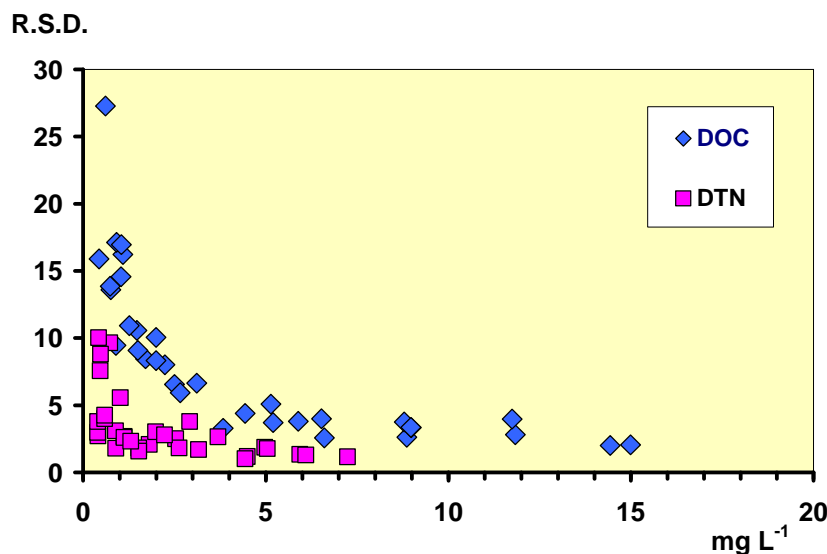
Intervalli analitici e limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) per le determinazioni del carbonio e dell'azoto con il metodo a combustione catalitica Skalar Formacs TC/TN, ottenuti secondo il metodo IUPAC (tre e dieci volte la deviazione *standard* del bianco rispettivamente per LOD e LOQ) e con il più recente metodo dell'intervallo di predizione calcolato al 95 % dalla regressione utilizzata per la calibrazione e riportata nel paragrafo specifico.

Intervallo analitico	LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)	
	IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
0,2 ÷ 20,0 (mg C L ⁻¹)	0,230	0,104	0,780	0,213
0,1 ÷ 10,0 (mg N L ⁻¹)	0,045	0,013	0,151	0,026

Campioni a concentrazioni più elevate possono essere analizzati procedendo con opportuna calibrazione o dopo diluizione con acqua ultrapura. Con la strumentazione qui descritta si possono analizzare campioni contenenti fino a 1000 mg C L⁻¹ e 300 mg N L⁻¹.

RIPETIBILITA' ANALITICA

I valori di ripetibilità qui riportati sono stati ottenuti nel laboratorio di idrochimica del CNR-ISE dall'anno 2004 con il metodo qui descritto. Il valore di deviazione *standard* relativa (R.S.D.) è ottenuto dalle analisi delle carte di controllo preparate da campioni sintetici a diverse concentrazioni ed analizzati per un periodo di 3-4 mesi in giorni diversi nelle condizioni qui descritte, per un totale di almeno circa 30÷50 determinazioni.



In figura vengono riportati i valori di ripetibilità analitica espressa come deviazione *standard* relativa (R.S.D.) rispetto le concentrazioni di DOC (mg C L⁻¹) e DTN (mg N L⁻¹).

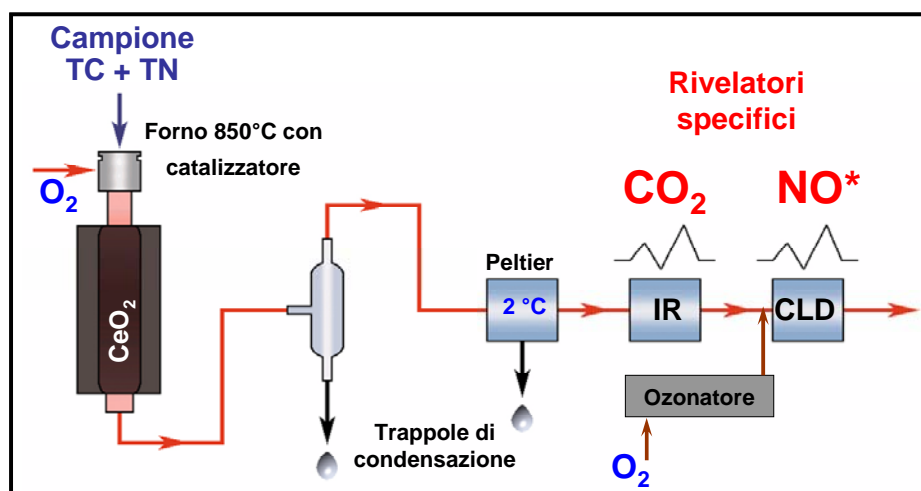
DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIATURA

Lo strumento Skalar FORMACS ^{series} TOC/TN ANALYSER è composto da un autocampionatore, l'analizzatore TC con rivelatore IR e dal rivelatore esterno a chemiluminescenza ND 20 per la determinazione dell'azoto. Tutti componenti sono connessi al *software* Skalar HT Access versione 1.03 per la gestione strumentale e l'acquisizione dei dati; affiancato al *software* Skalar per l'elaborazione dei segnali provenienti dai rivelatori viene utilizzata anche l'interfaccia Dionex UCI-100 con il *software* Dionex Chromeleon versione 6.70 che offre notevoli possibilità aggiuntive per l'elaborazione dei segnali, le calibrazioni e la gestione dei risultati analitici.

Lo strumento è sinteticamente costituito dalle seguenti parti.

- Autocampionatore da 80 posizioni.
- Braccio per il trattamento e l'iniezione del campione costituito da un ago di prelievo diametro 0,8 mm, da un agitatore meccanico ed un ago per l'aggiunta dell'acido e gorgogliatore (*sparging*).
- Siringa da 250 µL per l'iniezione del campione anche a volumi variabili.
- Due micro pompe a membrana per le aggiunte dell'acido necessario per le reazioni.
- Regolatore del flusso di O₂ utilizzato per il gorgogliatore.
- Due pompe peristaltiche per lavaggi con acqua ultrapura ed il drenaggio dei reflui.

- Catalizzatore costituito da circa 8,5 cm di CeO₂ e circa 1 cm di lana di quarzo, contenuto in un tubo di quarzo con diametro interno 16 mm; il tubo è inserito in un forno riscaldato a temperatura variabile tra 700-950 °C e l'accesso al tubo per l'iniezione del campione è gestito da una valvola a "pinza" di apertura e chiusura.
- Trappole di condensazione in vetro.
- *Scrubber* in rame per l'eliminazione dei composti alogenati e filtro 0,1 µm per eventuali polveri sospese.
- Trappola di condensazione ad effetto Peltier operante alla temperatura di 2 °C.
- Rivelatore ad IR non dispersivo a lunghezza d'onda di 4.2 µm con correzione continua della deriva, ed operante contemporaneamente su tre intervalli analitici di lavoro.
- Ozonatore con campo elettrico pulsato ad elevato potenziale (15 kV).
- Rivelatore Skalar ND 20 a chemiluminescenza (CLD)



Schema semplificato di funzionamento dell'analizzatore TC-TN per la determinazione in combustione

REAGENTI

Acqua ultrapura: acqua deionizzata trattata con processo di ultrapurificazione consistente in ultrafiltrazione a 0,05 µm e trattamento foto-ossidativo con raggi UV a 185 e 254 nm. Il contenuto di TOC dell'acqua prodotta deve essere inferiore a 20 µg C L⁻¹ e continuamente monitorato e visualizzato dallo strumento di produzione.

L'acqua così prodotta non può essere conservata per lungo tempo, deve essere utilizzata immediatamente per evitare il deterioramento delle sue caratteristiche.

Acqua ultrapura di lavaggio: acqua ultra pura con contenuto di TOC inferiore a 20 µg C L⁻¹ con l'aggiunta di circa 2 mL di H₃PO₄ 2 M in circa 2 litri d'acqua.

Acido fosforico 2 M: portare a volume con acqua ultrapura 14 mL di acido fosforico 85 % (circa 15 M) per analisi in un matraccio da 100 mL. Questa soluzione ha una concentrazione approssimativa di 2 M e viene utilizzata per la conservazione degli *standard* e per l'acqua di lavaggio.

Acido fosforico 0,6 M: ad un matraccio da 500 mL contenente circa 400 mL di acqua ultrapura, aggiungere 20 mL di acido fosforico 85 % (circa 15 M) per analisi e portare a volume con acqua ultrapura. La soluzione ha una concentrazione approssimativa di 0,6 M.

Questa soluzione viene utilizzata per acidificare il campione nel *vial* allo scopo di eliminare il carbonio inorganico contenuto nel campione (*spargin acid*) e può essere utilizzata anche per determinare quantitativamente il carbonio inorganico (TIC) contenuto nel campione posto nel *IC reactor*.

IMPOSTAZIONI ANALITICHE E CONTROLLO DELLO STRUMENTO

Le seguenti note analitiche sono riassuntive e relative alla strumentazione precedentemente citata, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore.

Per gli aspetti riguardanti la manutenzione ordinaria delle singole parti (ago di prelievo, pompa peristaltica, siringa, ecc.) e per ulteriori dettagli riguardanti caratteristiche, uso ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali Skalar relativi alle singole parti strumentali ed i manuali dei *software* Skalar HTAccess e Dionex *Chromeleon* 6.70.

Nelle descrizioni di questo metodo, tutte le impostazioni analitiche ed i controlli strumentali vengono eseguite tramite il *software* HTAccess, mentre l'acquisizione, l'elaborazione dei segnali dai rivelatori (i due fondo scala per TC ed uno per TN), la calibrazione ed il calcolo delle concentrazioni dei campioni vengono eseguite tramite il *software* Dionex *Chromeleon*.

Impostazione delle modalità operative e di acquisizione nel *software* Skalar HTAccess

Parameter	Value	Unit
Default Sample Time	300	s
TC Temp	850	°C
Syringe	250	µl
Flush Count	4	count(s)
Flush Volume	200	µl
Rinse Time	40	s
PickUp Speed	35	
Inject Speed	70	
Acid to Cup	5	count(s)
Acid to IC	10	count(s) * 50 µl
Sparging Time	120	s
Stir Time	30	s

FormacsHT Analyser Setting

I parametri impostati sono descritti nel pannello *Analyser Setting*; tra questi si sottolinea che il miglior compromesso per una buona resa analitica sui composti del carbonio e dell'azoto, oltre all'utilizzo del catalizzatore (CeO_2), è importante la temperatura del forno (*TC Temp* 850 °C), la velocità d'iniezione del campione (*Inject Speed* 70), la quantità di *Acid to Cup* (5 counts) e lo *Spargin Time* (120 s).

Vanno inoltre impostate le condizioni di *Alarm Setting* e di integrazione *Detection Setting* come riportato in figura.

Carbonio ed azoto: *Delta Up* 300 Digital Units
Delta Detected 4 Seconds

Carbonio
Azoto *Delta Down* 35 Digital Units
Delta Down 50 Digital Units

Parameter	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Flow	100	300	ml/min
TC Temp	750	900	°C
Peltier Temp	1	5	°C

FormacsHT Alarm Setting

Parameter	Value	Unit
Delta Up (Carbon)	300	Digital Units
Delta Detected (Carbon)	4	Seconds
Delta Down (Nitrogen)	50	Digital Units
Delta Detected (Nitrogen)	4	Seconds

Auto Zero
 Use auto zero
 No auto zero

FormacsHT Detection Setting

Impostazione delle modalità di acquisizione nel *software* Dionex *Chromeleon*

Per il *software* Dionex *Chromeleon* connesso ai rivelatori IR e CLD tramite l'interfaccia Dionex UCI-100, le impostazioni nel *file* di programma (.prg) per l'acquisizione dei segnali dai rivelatori sono le seguenti:

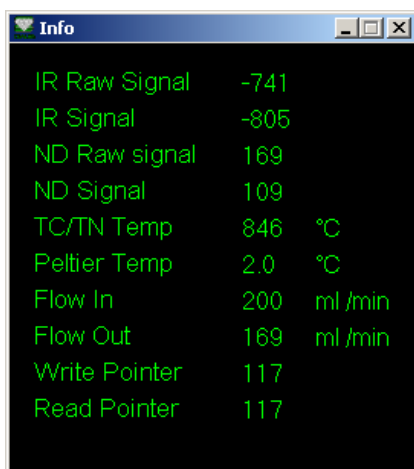
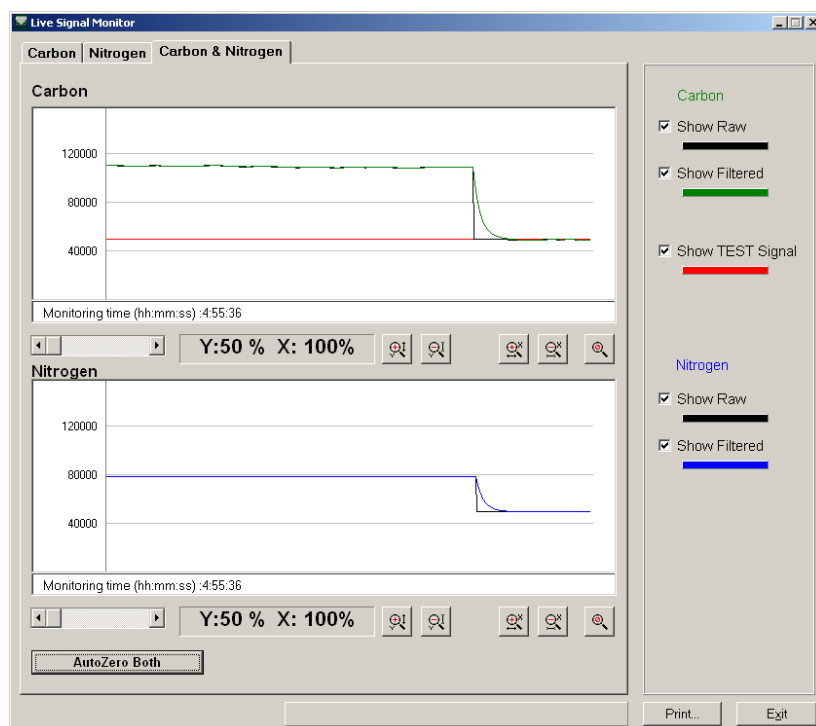
Tempo	Comando	Commento
	IR_Low.Step = Auto IR_Low.Average = On IR_Medium.Step = Auto IR_Medium.Average = On CLD.Step = Auto CLD.Average = On	Attivazione delle condizioni di acquisizione dai rivelatori IR (<i>low</i> e <i>medium</i>) e CDL.
0,00	Inject	Inizio analisi.
0,15	IR_Low.AcqOn IR_Medium.AcqOn CLD.AcqOn	Inizio acquisizione dai rivelatori.
2,60	IR_Low.AcqOff IR_Medium.AcqOff CLD.AcqOff	Termine dell'acquisizione dai rivelatori.
	End	Termine dell'analisi.

Attenzione che la comunicazione e l'acquisizione tra il *software* *Browser* di *Chromeleon* e l'interfaccia UCI-100 connessa ai rivelatori, avviene solamente con *Chromeleon Server Monitor* attivato (*Chromeleon Server Monitor is working*).

Preparazione ed accensione dell'analizzatore TC/TN

Prima dell'accensione lo strumento necessita di alcuni controlli e di una regolare manutenzione:

- verificare che il gas ossigeno sia aperto (pressione a circa 2,0÷2,3 bar) prima di accendere i rivelatori;
- sostituire l'acqua ultrapura di lavaggio verificandone la qualità (TOC < 20µg C L⁻¹) e svuotare il recipiente di raccolta degli scarichi;
- chiudere i fermi delle due pompe peristaltiche e settimanalmente ingrassarle con silicone;
- controllare il livello di acido fosforico 0,6 M nella bottiglia dello *sparging acid* utilizzato per l'acidificazione automatica dei campioni;
- verificare che il piatto porta campioni sia in posizione corretta, controllare che il braccio con l'ago di prelievo sia libero per la movimentazione ed accendere l'analizzatore TC/TN ed il rivelatore esterno ND 20;
- dopo essere entrati con *password* ed *operator* nel *software* Skalar HTAccess, dal menu principale connettersi allo strumento *Connection > Auto connect*.
- inviare le condizioni operative da *Setting > Analyser setting* con *Reset All*, ed aprire il pannello informativo da *View > Info* per vedere gli effetti delle impostazioni;
- attendere circa 30 minuti per il raggiungimento della temperatura di lavoro (850 °C)
- aprire poi il pannello *View > Live Signal Monitor* per visualizzare graficamente in tempo reale l'andamento dei segnali dai rivelatori e procedere al loro azzeramento con *AutoZero Both* e verificarne la stabilità nel tempo.

Pannello *info* delle condizioniPannello *Live Signal Monitor*

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per il prelievo dei campioni si consigliano recipienti in vetro o polietilene ad alta densità accuratamente lavati con HCl circa 1 M e risciacquati con acqua ultrapura.

Tra il prelievo del campione e l'analisi deve intercorrere il minor tempo possibile.

Per l'eventuale conservazione si consiglia il congelamento o l'acidificazione con acido fosforico (o acido cloridrico) nelle stesse concentrazioni di quelle utilizzate per la determinazione (1,5 mL H₃PO₄ o HCl 0,6 M in 100 mL). L'acidificazione va eseguita all'atto del campionamento subito dopo la filtrazione eseguita su filtri in fibra di vetro (0,7 µm) o in altro materiale purché testato per il rilascio di carbonio.

I campioni vengono prelevati ed inseriti nell'autocampionatore che può contenere fino a 80 *vials* da 6,5 mL; le fiale in vetro vengono lavate con acqua ultrapura e muffolate a 500°C per circa tre ore.

Per l'analisi del carbonio organico disciolto DOC il campione viene filtrato su filtro con porosità 0,45 µm. Per l'analisi del TOC di campioni contenenti molto particolato in sospensione, si consiglia di eliminare il particolato più grosso filtrando con filtri da 5 ÷ 10 µm.

Al momento dell'analisi i campioni vengono prelevati nelle fiale risciaquandole con almeno due aliquote di campione. Nel caso non sia possibile eseguire l'acidificazione automatica (*Acid to Cup 5 counts*) acidificare con 100 µL di H₃PO₄ 0,6 M sufficienti per neutralizzare l'alcalinità del campione fino a circa 7,5 meq L⁻¹.

SOLUZIONI STANDARD DI CALIBRAZIONE

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare le quantità indicate dei sali sodio nitrato e potassio idrogeno ftalato di grado analitico eventualmente corrette per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* contenenti entrambi i composti di azoto e carbonio procedendo come indicato nella tabella delle diluizioni della soluzione madre. Per la

calibrazione prelevare gli *standard* nelle apposite *vials* dedicate per ciascun *standard* avendo cura di procedere in ordine dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore.

Soluzioni *standard* multi elemento C & N

Soluzione madre di potassio idrogeno ftalato (C₈H₅KO₄) e sodio nitrato rispettivamente per carbonio e azoto (C&N) preparata in un matraccio da 500 mL ed acidificata prima di portare a volume con 1000 µL H₃PO₄ 2 M.

$$\begin{aligned} 1,0627 \text{ g C}_8\text{H}_5\text{KO}_4 &= 1,00 \text{ mg C mL}^{-1} \\ 1,5171 \text{ g NaNO}_3 &= 0,50 \text{ mg N mL}^{-1} \end{aligned}$$

Diluizioni della soluzione madre per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione contenenti carbonio ed azoto. Ogni singola soluzione *standard* prima di essere portata a volume deve essere acidificata con 500 µL H₃PO₄ 2 M (pH finale circa 2).

	Prelievo da C&N	Matraccio mL	mg C L⁻¹	mg N L⁻¹
ST. 1	100 µL	250	0,4	0,20
ST. 2	200 µL	250	0,8	0,40
ST. 3	400 µL	250	1,6	0,80
ST. 4	750 µL	250	3,0	1,50
ST. 5	1500 µL	250	6,0	3,00
ST. 6	2500 µL	250	10,0	5,00
ST. 7	3500 µL	250	14,0	7,00
ST. 8	5000 µL	250	20,0	10,00

Modalità di calibrazione

Le calibrazioni si eseguono per regressione lineare della concentrazione di ogni analita rispetto all'area del corrispondente picco; il valore del bianco analizzato prima di ogni sequenza analitica, viene utilizzato nella calibrazione come *standard* a zero mg L⁻¹ per la retta relativa all'intervallo analitico inferiore (0 – 3 mg C L⁻¹ e 0 – 1,5 mg N L⁻¹).

Nella determinazione del carbonio vengono utilizzati due diversi fondo scala del rivelatore ad infrarossi: *low* per l'intervallo analitico 0,4 – 10,0 mg C L⁻¹ e *medium* per l'intervallo da 6,0 – 20,0 mg C L⁻¹.

All'interno del primo intervallo analitico del carbonio (rivelatore IR *low*), la calibrazione viene ulteriormente suddivisa in due intervalli:

- **Carbonio rivelatore IR *low*** intervallo 0 ÷ 3,0 mg C L⁻¹
intervallo 3,0 ÷ 10,0 mg C L⁻¹
- **Carbonio rivelatore IR *medium*** intervallo 6,0 ÷ 20,0 mg C L⁻¹

Per l'azoto invece tutto l'intervallo analitico 0,2 – 10 mg N L⁻¹ rientra in un unico fondo scala, che viene poi suddiviso in due calibrazioni così ripartite:

- **Azoto rivelatore CLD** intervallo 0 ÷ 1,5 mg N L⁻¹
intervallo 1,5 ÷ 10,0 mg N L⁻¹

La scelta di utilizzare calibrazioni lineari è il risultato dell'elaborazione dei segnali in area ottenuti dai bianchi e da ciascun calibrante analizzato in un lungo periodo di tempo (giugno 2006 – dicembre 2007). Dai valori medi dei segnali sono stati calcolati i fattori di risposta (RF) e valutati gli andamenti delle regressioni lineari e quadratiche con il test F di Fischer.

$$RF = \frac{\text{segnale in area}}{\text{concentrazione del calibrante}}$$

Andamenti costanti dei valori di RF indicano un'ottima correlazione lineare, mentre significative variazioni del valore di RF indicano una bassa correlazione lineare tra *standard* e segnale; tali condizioni possono essere indice di errori nella preparazione delle soluzioni calibranti o di andamenti non lineari che richiedono altri tipi di regressione.

Generalmente l'andamento non contenuto nell'intervallo del $\pm 5\%$ attorno al valore di RF_{medio} indica la necessità di utilizzare una regressione quadratica anziché lineare; per regressioni con valori di intercetta significativamente diversa da zero (come nel caso del carbonio), l'andamento dell'RF non è sufficiente per giustificare la scelta della regressione quadratica.

L'utilizzo del test F di Fischer applicato all'analisi della varianza (ANOVA), permette di confrontare statisticamente la regressione con dei modelli di riferimento. Esso viene eseguito a posteriori utilizzando i valori dell'errore quadratico medio del modello lineare ($MS_{R,lin}$) con l'errore quadratico medio del modello non lineare di riferimento ($MS_{R,nonlin}$) secondo il seguente rapporto:

$$F = \frac{MS_{R,lin}}{MS_{R,nonlin}}$$

$$\text{dove } MS_R = \frac{SS_R}{GL} \quad \text{ed} \quad SS_R = \sum_i (y_i - y_{ci})^2$$

SS_R è la parte di variazione dei valori di y rispetto al valore medio \hat{y} attribuita al fatto che le osservazioni non stanno perfettamente sulla retta di regressione

Il test F non viene eseguito sui valori medi calcolati in base ai rispettivi gradi di libertà che indicano quante parti di informazione indipendenti sono necessarie per calcolare quella somma di quadrati.

Se il valore di F_c calcolato è superiore a quello critico F_t tabulato per il livello di significatività scelto, nel nostro caso $\alpha = 0,05$ (5%), l'ipotesi di linearità del modello deve essere rifiutata.

Nelle tabelle seguenti vengono riassunti gli intervalli analitici utilizzati per i vari fondo scala nell'analisi di carbonio ed azoto. I valori di area media ed RF ottenuti per iniezione di 150 μL di ciascun *standard*, sono calcolati da una serie storica di tutte le calibrazioni giornaliere eseguite con tre repliche nel periodo giugno 2006 – dicembre 2007 ed archiviate in un foglio di calcolo *Excel*.

Carbonio mg L⁻¹		ST. 1	ST. 2	ST. 3	ST. 4	ST. 5	ST. 6	ST. 7	ST. 8
		0,4	0,8	1,6	3,0	6,0	10,0	14,0	20,0
Fondo scala e calibrazione		IR <i>low</i> lineare							
						IR <i>low</i> lineare			
						IR <i>medium</i> lineare			
IR <i>Low</i>	Area media	22	35	62	106	206	324	436	
	RF	54	44	38	35	34	32	31	
IR <i>Medium</i>	Area media					15	25	35	49
	RF					2,47	2,47	2,46	2,47

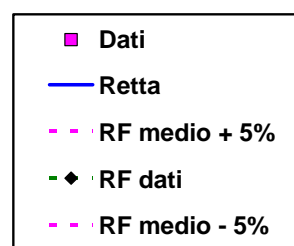
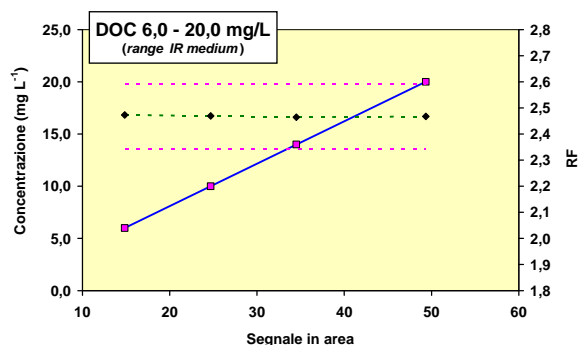
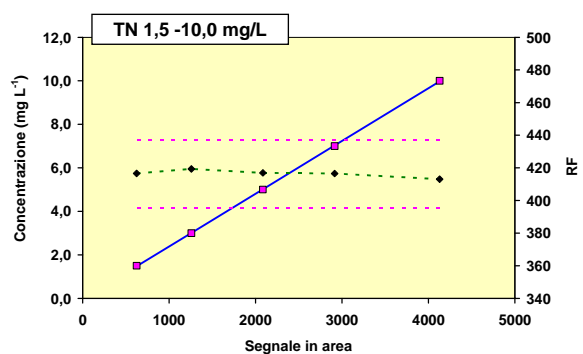
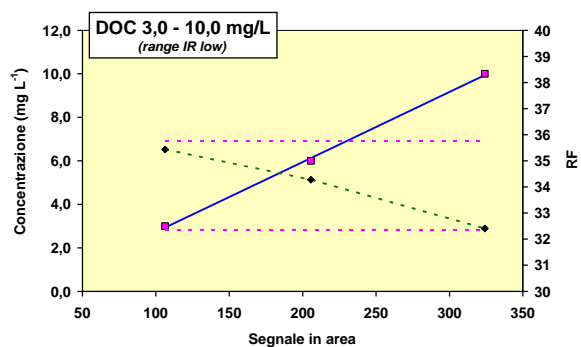
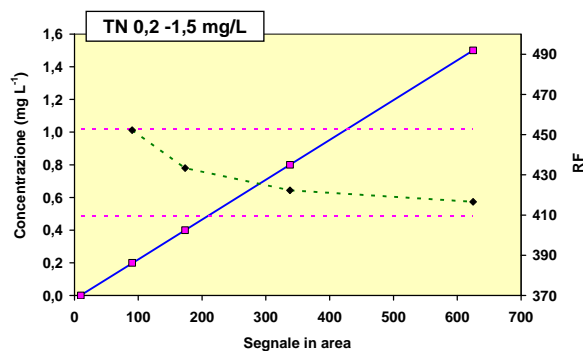
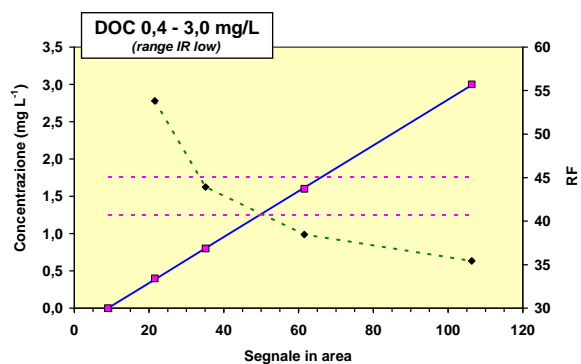
Azoto mg L⁻¹		ST. 1	ST. 2	ST. 3	ST. 4	ST. 5	ST. 6	ST. 7	ST. 8
		0,2	0,4	0,8	1,5	3,0	5,0	7,0	10,0
Fondo scala e calibrazione		CLD lineare							
						CLD lineare			
CLD	Area media	90	173	338	625	1258	2085	2915	4130
	RF	452	433	422	417	419	417	416	413

La verifica della linearità nell'intervallo analitico più basso, è stata eseguita per carbonio ed azoto sui valori dell'area media degli ST. 1 ÷ ST. 4 utilizzando il test F di Fischer precedentemente descritto; i valori ottenuti ($F_c = 1,7$ e $1,1$) sono inferiori al valore tabulato ($F_t = 39$) a conferma dell'andamento lineare della regressione.

Nelle regressioni è stato utilizzato anche il bianco con il segnale ottenuto in circa tre anni di determinazioni, i cui valori medi in area sono di 9 e 10 rispettivamente per carbonio e azoto.

Si evidenzia l'elevato valore di bianco del carbonio che non è trascurabile in quanto è circa il 40 % del segnale dello *standard* più basso 0,4 mg L⁻¹ (segnale medio 22), mentre per l'azoto l'influenza del bianco è minore, circa l'11% dello *standard* 0,2 mg L⁻¹ (segnale 90).

Vengono in seguito riportati i grafici ed i parametri delle calibrazioni eseguite con i valori delle aree medie delle precedenti tabelle, al fine di evidenziare con la costanza dei valori di RF l'andamento lineare delle regressioni; fa eccezione la calibrazione del DOC 0,4 - 3 mg L⁻¹ dove l'elevato valore di bianco (segnale in area 9) di cui non si tiene conto nel calcolo dell'RF presenta valori fuori dai i limiti del $\pm 5\%$.

Esempi delle regressioni del carbonio (IR *low* e *medium*)

Esempi delle regressioni dell'azoto (CLD)

Parametri delle calibrazioni lineari ($\text{Conc} = \text{pendenza} \times \text{segnale} + \text{intercetta}$) eseguite con i valori medi dei segnali ottenuti per ciascun intervallo analitico precedentemente descritto.

Variabile	Fondo scala	Intervallo	Pendenza	Intercetta	Coeff. corr. lin.
Carbonio	IR <i>low</i>	Bianco ÷ 3 mg C L ⁻¹	0,0307	-0,275	0,999952
	IR <i>low</i>	3 ÷ 10 mg C L ⁻¹	0,0322	-0,492	0,999499
	IR <i>medium</i>	6 ÷ 20 mg C L ⁻¹	0,406	-0,017	0,999999
Azoto	CLD	Bianco ÷ 1,5 mg N L ⁻¹	0,00244	-0,023	0,999997
	CLD	1,5 ÷ 10 mg N L ⁻¹	0,00242	-0,041	0,999972

Soluzioni standard ottimizzate per campioni particolari

Questi *standard* si utilizzano specificatamente per le determinazioni di carbonio ed azoto sui campioni dei laghi Maggiore ed Orta; le concentrazioni sono state ottimizzate per calibrazioni lineari, per il carbonio il fondo scala del rivelatore IR è posizionato su *low*.

Si preparano queste soluzioni singolo elemento acidificate con H₃PO₄ 2 M prima di portare a volume.

Soluzione C in matraccio 1000 mL acidificata con 2000 µL H₃PO₄ 2 M
 $1,0627 \text{ g C}_8\text{H}_5\text{KO}_4 = 0,50 \text{ mg C mL}^{-1}$

Soluzione N in matraccio 500 mL acidificata con 1000 µL H₃PO₄ 2 M
 $1,5171 \text{ g NaNO}_3 = 0,50 \text{ mg N mL}^{-1}$

Da queste soluzioni si preparano le soluzioni *standard* contenenti carbonio ed azoto dedicate alle analisi dei campioni dei laghi Maggiore ed Orta.

Ogni singola soluzione *standard* prima di essere portata a volume deve essere acidificata con 400 µL H₃PO₄ 2 M (pH finale circa 2).

Soluzioni standard multi elemento per Lago Maggiore

	Prelievo da C	Prelievo da N	Matraccio	mg C L ⁻¹	mg N L ⁻¹
ST. M1	240 µL	320 µL	200 mL	0,6	0,80
ST. M2	360 µL	360 µL	200 mL	0,9	0,90
ST. M3	480 µL	400 µL	200 mL	1,2	1,00

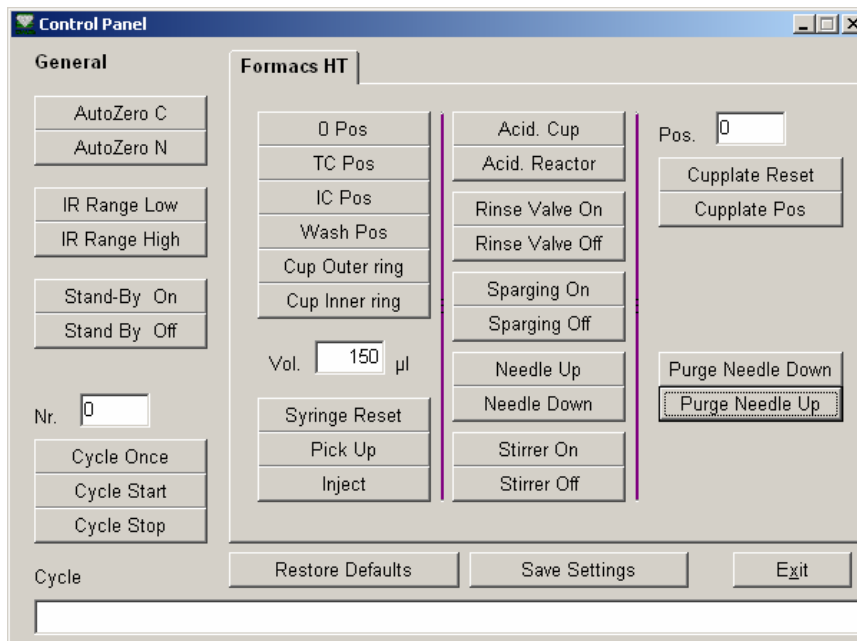
Soluzioni standard multi elemento per Lago d'Orta

	Prelievo da C	Prelievo da N	Matraccio	mg C L ⁻¹	mg N L ⁻¹
ST. O1	240 µL	600 µL	200 mL	0,6	1,50
ST. O2	360 µL	720 µL	200 mL	0,9	1,80
ST. O3	480 µL	800 µL	200 mL	1,2	2,00

PREPARAZIONE PER L'ANALISI

Prima di eseguire un ciclo di analisi eseguire le seguenti operazioni.

- Verificare sul pannello *Info* che la temperatura del forno sia 850 °C e che il flusso di ossigeno in entrata (*Flow In*) sia 200 mL min⁻¹, mentre quello in uscita (*Flow Out*) sia compreso tra 160 e 200 mL min⁻¹.
- Richiamare il pannello di controllo *View > control panel* dal quale si possono inviare singoli comandi all'analizzatore TC/TN.



Pannello di controllo

- procedere con un lavaggio dell'ago e dei circuiti di iniezione del campione tramite la sequenza dei seguenti comandi:
 - *Wash Pos* per posizionarsi sullo scarico;
 - *Purge Needle Down* per immergere gli aghi nel lavaggio e scarico;
 - *Acid. Cup* per erogare l'acido (ripetere più volte all'inizio);
 - *Rinse Valve On* per circa 3 minuti allo scopo di lavare il circuito di prelievo del campione;
 - *Pick Up* per abbassare il pistone della siringa in aspirazione e verificare che non ci siano bolle d'aria al suo interno;
 - *Inject* per eseguire il movimento di iniezione;
 - *Syringe Reset*;
 - *Rinse Valve Off* per richiudere la valvola;
 - *Purge Needle Up* per estrarre gli aghi da lavaggio e scarico.

Dopo queste operazioni di pulizia lo strumento è pronto per partire con l'analisi di 2-3 campioni di acqua ultra pura e 2-3 soluzioni *standard* da analizzare solo come verifica del corretto funzionamento della strumentazione.

A questo scopo si consiglia di preparare una sequenza (*Template*) chiamata TEST da utilizzare per questa verifica.

Preparazione della sequenza analitica

Dal menu principale si accede al *Template* con *New* se si vuole partire da una sequenza completamente vuota, o con *Edit* per aprire una sequenza precedente e cambiarne le impostazioni; salvare il *Template* con il nome della nuova sequenza (ad esempio 150107 Piogge.tdb). Procedere così con l'editing della nuova sequenza dei campioni (massimo 80) contenente le modalità di analisi per ciascun campione, quali il numero di iniezioni per campione (3), il volume iniettato solitamente 150 µL ma che è possibile aumentare a 200 µL per migliorare la sensibilità, il tipo di analisi da eseguire.

Al termine della preparazione della sequenza salvare ed uscire.

Finestra del *Template* per l'impostazione della sequenza analitica

Una sequenza analitica è solitamente così organizzata:

		<i>Type</i>
– 2	bianchi di acqua ultrapura	<i>Unknown</i> ;
– 8	<i>standards</i> di calibrazione ST.1-2-3-4-5-6-7-8	<i>Standard</i> ;
– 1	bianco di acqua ultra pura	<i>Unknown</i> ;
– 1 o 2	carte di controllo	<i>Unknown</i> ;
– 20÷25	campioni	<i>Unknown</i> ;
– 1 o 2	carte di controllo	<i>Unknown</i> ;
– 1	bianco di acqua ultrapura	<i>Unknown</i> ;
– 8	<i>standards</i> di calibrazione	<i>Standard</i>
– 1	bianco di acqua ultra pura	<i>Unknown</i> ;
– 20÷25	campioni	<i>Unknown</i> ;

e così via fino ad occupare le 80 posizioni dell'autocampionatore.

Nel *template* vengono inseriti i parametri analitici riguardanti il singolo campione in *Position* (*Type* *Standard* o *Unknown*, *Dilution Factor*, *Range* del rivelatore, tipi di *Injections* ed il volume di campione iniettato *Injection Volumes* 150 o 200 µL); mentre per l'intera sequenza si selezionano per i singoli elementi *Carbon* e *Nitrogen* le impostazioni quali *Integration Time*, le repliche *Samples*, ecc. Le impostazioni più importanti del *Template* sono evidenziate nelle seguenti figure:

Particolare della finestra del *Template* riguardante l'impostazione di ciascun campione

La selezione (✓) del parametro NPOC (carbonio organico meno frazione volatile) associata con *Spargin*, *Acid Cup* e *Stirrer* permette di impostare le condizioni per la determinazione del DOC con l'aggiunta di acido al *vial*, agitazione e gorgogliamento del gas O₂ per una ottimale eliminazione della CO₂ disciolta e di quella prodotta dalla neutralizzazione dei carbonati con l'acido.

The screenshot shows a software interface with two main sections for 'Carbon' and 'Nitrogen'. Each section has fields for 'Samples TC/TN', 'Extra Samples', and 'Max. CV'. The 'Carbon' section has 'Samples TC' set to 3, 'Integration Time' to 60, and 'SampleTime' to 300. The 'Nitrogen' section has 'Samples TN' set to 3 and 'Integration Time' to 100. There are also 'Re-Analysis' radio buttons for 'Yes' and 'No', with 'No' selected. The 'AnalyserType' is set to 'FormacsHT'. Buttons for 'Cancel' and 'OK' are at the bottom right.

Particolare della finestra del *Template* riguardante le impostazioni per ogni analita della sequenza

Nella sequenza analitica oltre ai bianchi vengono introdotte le carte di controllo che sono campioni sintetici preparati all'interno del laboratorio (stabilizzati con H₃PO₄ a pH circa 2) ed analizzati per un lungo periodo (alcuni mesi) al fine di controllare la ripetibilità analitica nel periodo considerato.

L'impostazione della sequenza analitica nel *Template* del *software* HTAccess Skalar, è necessaria per trasferire e fare eseguire all'analizzatore TC/TN la preparazione, l'introduzione del campione ed una prima elaborazione del segnale.

L'acquisizione, l'elaborazione dei segnali dai due fondo scala IR per TC (*low* e *medium*) e dal rivelatore CLD del TN, viene eseguita con il *software* Dionex *Chromeleon*, più adatto per l'ottimizzazione dell'integrazione dei picchi, per la calibrazione ed il calcolo delle concentrazioni dei campioni e per l'elaborazione ed esportazione dei risultati. Per questo motivo bisognerà predisporre una analoga sequenza analitica in *Chromeleon* contenente i nomi dei campioni (in triplo per le tre repliche), la tipologia (*Standard* o *Unknown*), ed i metodi contenenti le modalità di integrazione e le concentrazioni degli *standard*.

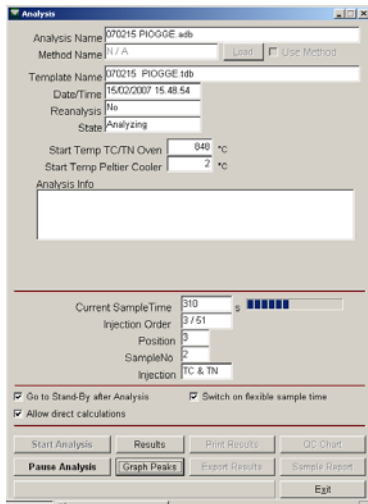
Per la preparazione della sequenza in *Chromeleon* in tutti i suoi aspetti (*apertura*, *editing*, e salvataggio ad esempio 150107 Piogge) si rimanda al manuale del *software* Dionex *Chromeleon*.

Terminata la preparazione della sequenza, si consiglia di verificare la connessione con *Chromeleon server monitor* e di fare partire l'acquisizione dati con il comando *Batch start*, affinché alla prima iniezione inizi l'acquisizione.

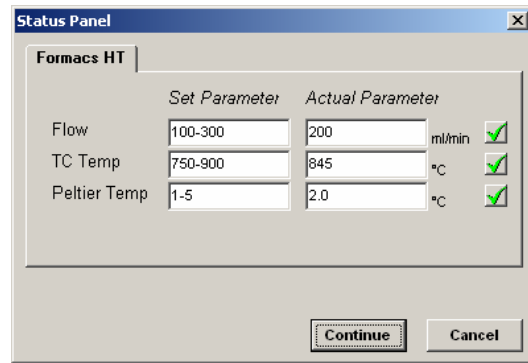
ANALISI DI UNA SEQUENZA

Per dare inizio ad una sequenza analitica procedere come segue:

- dal software HTAccess Skalar aprire il menù *Analysis>New* per creare e salvare il file (ad esempio 150107 Piogge.adb) dove verranno archiviati i dati della sequenza secondo l'impostazione del *Template* richiesto contestualmente;
- successivamente si apre la finestra di *Analysis* dalla quale cliccando su *Graph Peaks* si apre il pannello *Analysis Peaks* che visualizza i segnali dai rivelatori, procedere al loro azzeramento con *Auto Zero Both* e verificarne la stabilità, questo pannello può essere indifferentemente lasciato aperto o chiuso;
- tornare alla finestra di *Analysis* e procedere con *Start Analysis* che, dopo una verifica dallo *Status Panel* delle condizioni operative dell'analizzatore TC/TN (temperatura e flussi), inizia l'analisi della sequenza.

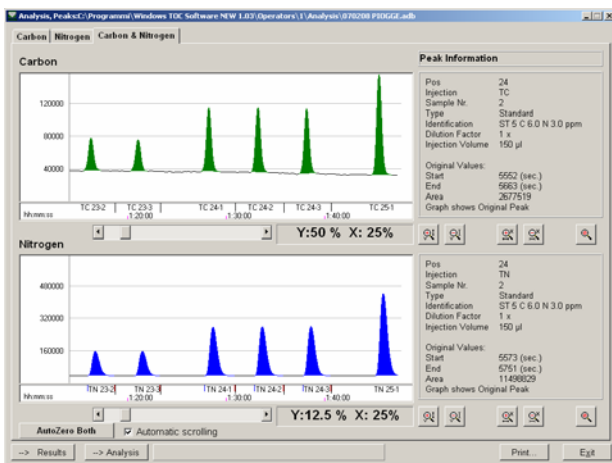


Pannello Analysis

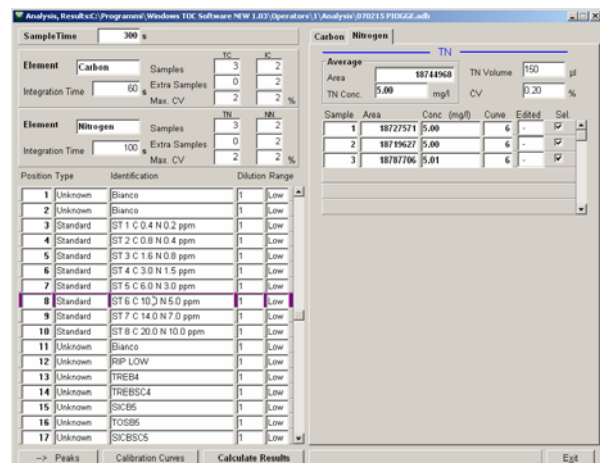


Status Panel per la verifica delle condizioni operative

Da questo momento l'analisi procede automaticamente con la visualizzazione grafica sul pannello Analysis e l'avanzamento dei risultati analitici nel pannello Results.

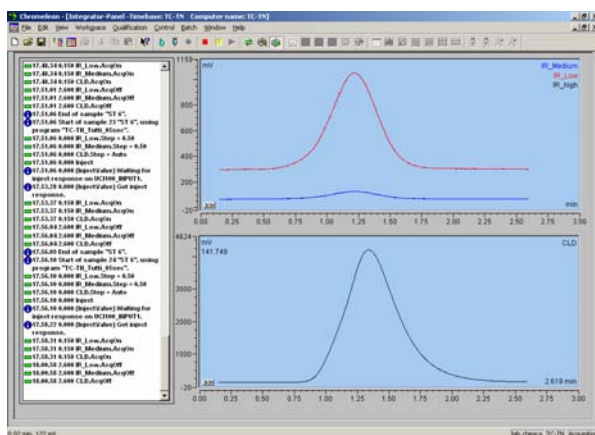


HTAccess Skalar pannello Analysis Peaks

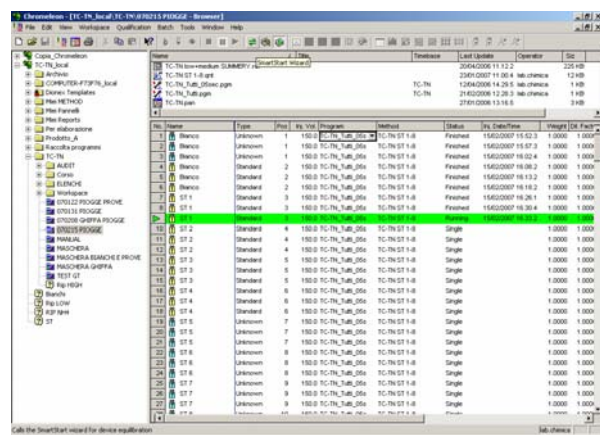


HTAccess Skalar pannello Results

Dopo la prima iniezione verificare in Chromeleon che si sia avviata l'acquisizione e la relativa integrazione dei segnali. Sul pannello di controllo devono comparire i grafici dei segnali dei rivelatori e nella sequenza deve attivarsi la linea verde che evidenzia il campione in acquisizione.



Chromeleon pannello di controllo



Chromeleon sequenza analitica

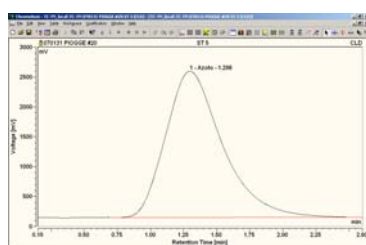
Nelle condizioni operative qui riportate, indicativamente il tempo analitico per ogni iniezione è di circa cinque minuti per un totale di circa quindici minuti per campione analizzato in triplo.

Terminata la sequenza analitica l'analizzatore TC/TN può essere impostato affinché vada automaticamente in condizioni di *Stand-By*, abbassando il flusso di gas e la temperatura del forno in attesa dell'intervento dell'operatore, mentre l'acquisizione in *Chromeleon* dovrà essere terminata con il comando *Batch Stop* seguito dalla chiusura della connessione con *Chromeleon server monitor*.

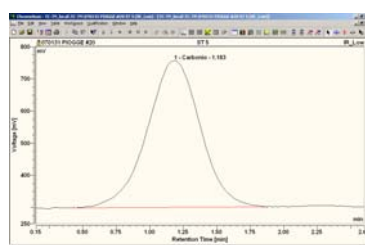
ELABORAZIONE E TRASCRIZIONE DEI DATI ANALITICI

Terminata l'analisi della sequenza si procede alla sua elaborazione utilizzando il *software* Chromeleon; nella sequenza nominata con data e tipologia (ad esempio 150107 Piogge) si devono verificare tutte le informazioni dal nome del campione, alla tipologia (*Standard* o *Unknown*), al metodo analitico utilizzato, ed eseguire i seguenti controlli sui risultati ottenuti per ogni campione:

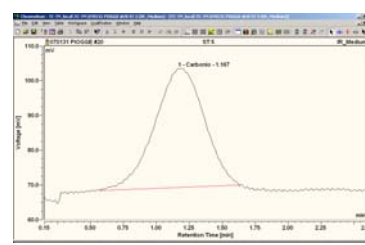
- selezionare il metodo con gli *standard* per l'intervallo di calibrazione più appropriato;
- controllare l'integrazione dei picchi per ciascun analita (azoto e carbonio) e per ogni intervallo analitico e/o fondo scala (IR *low* e *medium*);



Azoto rivelatore CLD

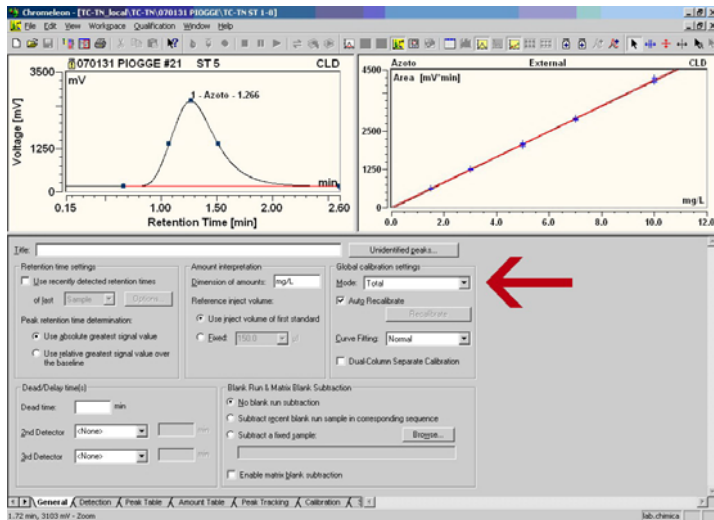


Carbonio rivelatore IR low



Carbonio rivelatore IR medium

- controllare le calibrazioni selezionando nel metodo alla cartella *General*, in *Global calibration setting*, l'opzione *Total* al fine di visualizzare graficamente i punti di tutti gli *standard* e verificare la corrispondenza delle letture ottenute nella prima calibrazione con le successive;
- nel caso di derive strumentali provvedere alla scelta della calibrazione più opportuna, ad esempio impostando nel metodo alla cartella *General*, in *Global calibration setting*, l'opzione *Group* che utilizza la prima calibrazione per il primo gruppo di campioni, la seconda calibrazione con il secondo gruppo e così via;
- verificare la qualità della regressione attraverso l'osservazione dei parametri della calibrazione e dell'intervallo fiduciale al 95 % visualizzato graficamente (linee rosse), i punti molto fuori dall'intervallo fiduciale possono essere esclusi dalla regressione;
- generare i *report* necessari per ogni intervallo analitico, selezionando gli *standard* secondo gli intervalli analitici precedentemente descritti.

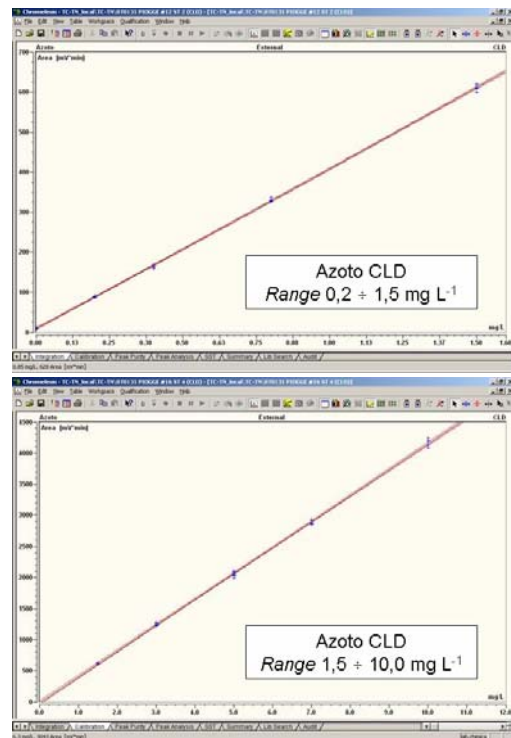
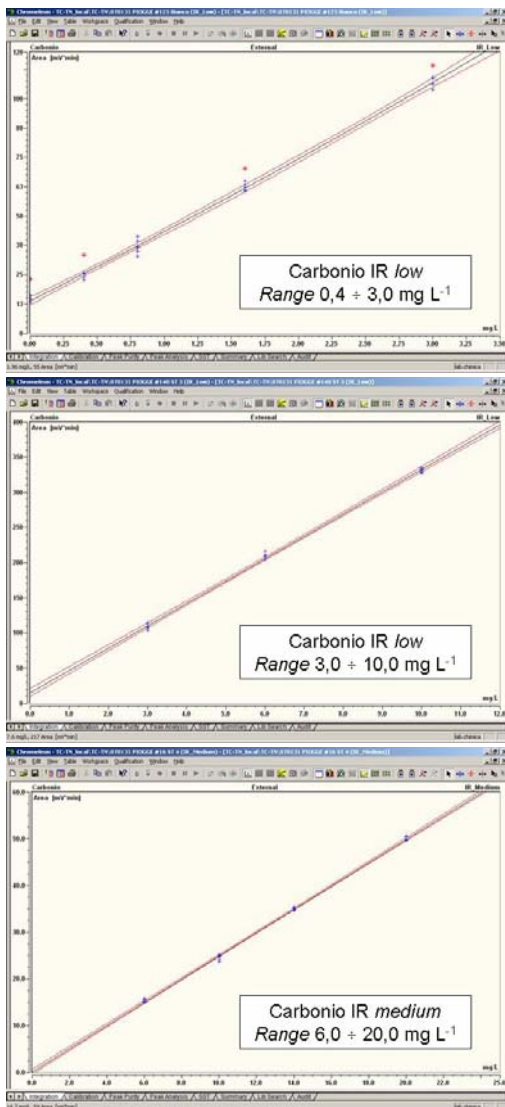


Impostazione di *Total* nel metodo alla cartella *General*

Condizioni di integrazione impostate nel metodo alla cartella *Detection* al tempo iniziale (0.000).

Sensitivity 10 All Channels
Minimum Area 1 CLD
Minimum Area 2 IR_Low
Minimum Area 10 IR_Medium

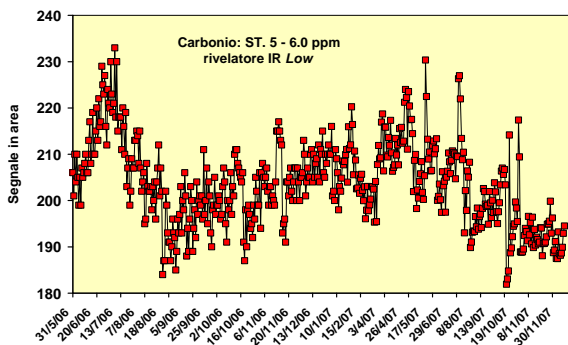
Maximum Peak Height 900 IR_Low
 necessario per escludere i picchi che vanno fuori scala con il rivelatore IR Low



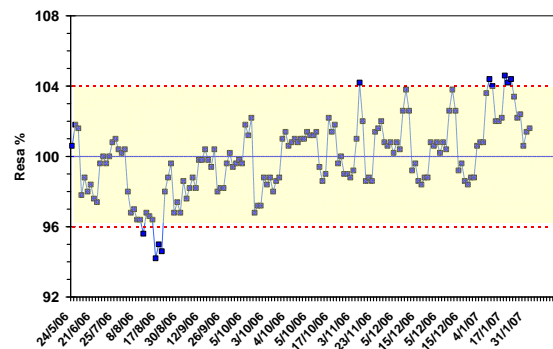
Esempi delle regressioni di carbonio ed azoto ottenute da una sequenza analitica, il software *Chromeleon* riporta con le linee rosse l'intervallo di confidenza al 95 % attorno alla retta

Dopo queste verifiche sulla sequenza analitica si procede con il trasferimento ad un foglio di calcolo Excel dei valori di segnale in area dei bianchi, degli *standard* e dei valori in concentrazione ottenuti per le carte di controllo (ripetibilità). Terminato il trasferimento di queste informazioni eseguire i seguenti controlli:

- confronto dei segnali in area ottenuti dai bianchi e degli *standard* della sequenza con il valore medio calcolato dai segnali ottenuti nella serie storica (bianchi e calibrazioni); questo confronto permette di valutare in particolare la confrontabilità degli *standards* nel tempo e la stabilità delle risposte e delle calibrazioni dell'analizzatore TC/TN;
- verifica dei valori in concentrazione ottenuti dall'analisi delle carte di controllo, confronto dei valori ottenuti nella sequenza con i dati del periodo precedentemente considerato dalla carta di controllo;
- verificare la resa ossidativa della carta di controllo composta dal solo azoto ammoniacale (5 mg N-NH₄ L⁻¹), il cui valore deve essere compreso tra 4,8 ÷ 5,2 mg N-NH₄ L⁻¹ corrispondente ad una resa compresa tra 96 ÷ 104 %;
- terminate queste verifiche procedere con la stampa riassuntiva dei valori analitici dei campioni ed alla trascrizione dei risultati analitici utilizzando l'intervallo di calibrazione più appropriato.



Esempio della serie storica dei segnali di uno *standard* (ST. 5 da 6 mg C L⁻¹)



Resa ossidativa dell'azoto ammoniacale (*standard* 5 mg N-NH₄ L⁻¹)

Nel caso le rese ossidative o i risultati delle carte di controllo non fossero quelli attesi, è necessario non considerare validi i risultati ottenuti sui campioni e procedere con l'individuazione delle cause dei malfunzionamenti prima di analizzare una nuova sequenza di campioni.

Tra le cause più frequenti dei malfunzionamenti si segnala l'errore nell'impostazione del volume iniettato, la diminuzione del flusso di ossigeno causata da una perdita nel circuito o nella valvola di chiusura in testa al forno, la rottura di un tubo della pompa peristaltica o un malfunzionamento nel braccio di prelievo ed agitazione del campione.

La diminuita resa ossidativa generalmente è causata dall'invecchiamento del catalizzatore CeO₂ che normalmente andrebbe sostituito ogni 4-6 mesi.

Nel bilancio dell'azoto, dove si confronta il valore di azoto totale con la somma di azoto nitrico, nitroso ed ammoniacale, si deve comunque considerare che la resa ossidativa di alcuni composti che contengono il doppio o triplo legame tra l'azoto, quali le azidi e le idrazine (peraltro presenti solo in alcune acque di scarico), è molto bassa (anche inferiore al 25 %).

Espressione dei risultati

Tenendo adeguatamente conto della procedura di preparazione del campione (filtrazione o acidificazione adottata), riportare le forme di carbonio ed azoto analizzate utilizzando le espressioni e gli acronimi precedentemente descritti (DOC, TOC, DTN o TN).

Nella trascrizione dei valori riportare la concentrazione del carbonio con una cifra decimale e l'azoto con due cifre decimali.

Riferimenti bibliografici

A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Method 5310 B). Amer. Publ. Health Ass., Washington.

APAT. IRSA-CNR. 2003. Metodi analitici per le acque. 5040 Carbonio organico disciolto.

Marchetto A., R. Mosello, G. A. Tartari, J. Derome, K. Derome, P. Sorsa, N. König, N. Clarke, E. Ulrich and Kowalska A.. 2006. Atmospheric deposition and soil solution. Working Ring Test 2005. European Union, United Nations Economic Commission for Europe, International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution on Forests, Fontainebleu, France, ISBN 2 84207 310 X 85 pp.

Rogora M., M. Minella, A. Orrù, G. A. Tartari. 2006 A comparison between high-temperature catalytic oxidation and persulphate oxidation for the determination of total nitrogen in freshwater. International Journal of Environmental & Analytical Chemistry, 14, 1065.