



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Verbania Pallanza

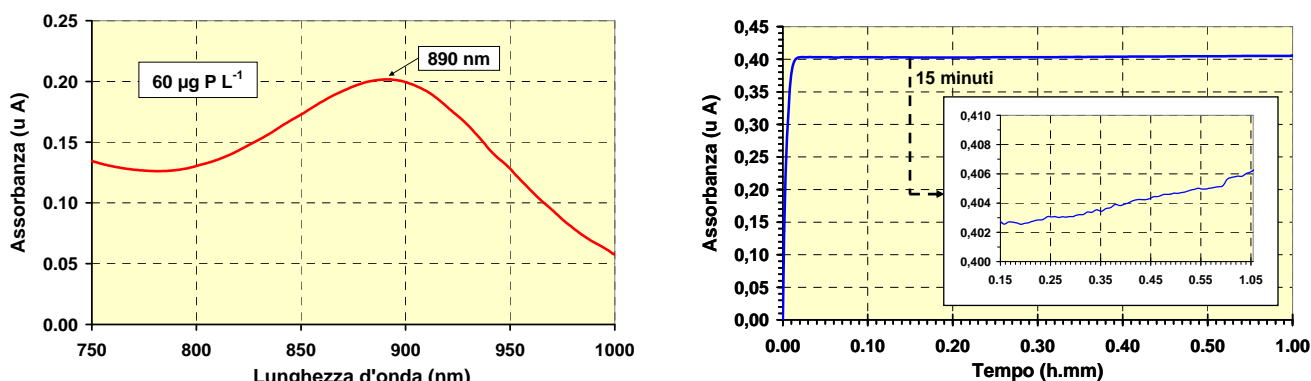


Laboratorio di idrochimica - metodi analitici ad uso interno
a cura di Gabriele TARTARI

FOSFORO REATTIVO metodo colorimetrico

PRINCIPIO DEL METODO

La determinazione si basa sulla reazione dell'ortofosfato con l'ammonio molibdato ed il potassio antimonio tartrato con formazione del complesso antimonio fosfomolibdico, a sua volta ridotto dall'acido L-ascorbico al colorante blu di molibdeno il cui spettro di assorbimento presenta il massimo di assorbanza a 890 nm.



Spettro di assorbimento e cinetica di sviluppo del colorante blu di molibdeno

INTERVALLO ANALITICO, LIMITI DI RIVELABILITÀ E QUANTIFICAZIONE

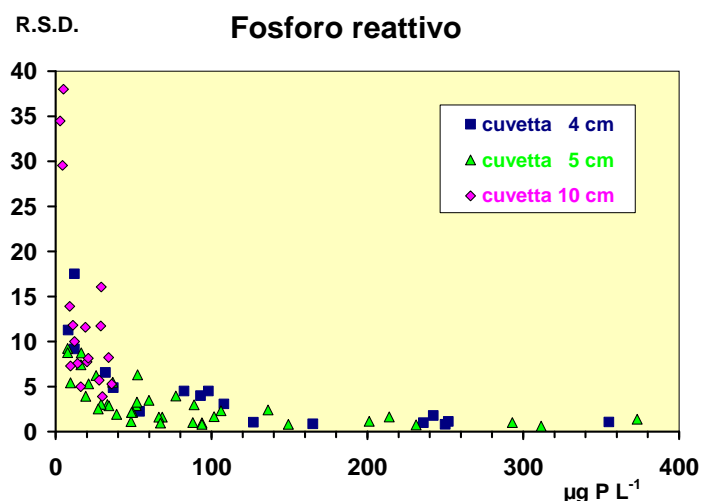
Intervallo analitico e limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) dell'analisi del fosforo reattivo espressi in µg P L⁻¹, ottenuti secondo il metodo IUPAC (tre e dieci volte la deviazione *standard* del bianco rispettivamente per LOD e LOQ) e con il più recente metodo dell'intervallo di predizione calcolato al 95 % dalla regressione utilizzata per la calibrazione e riportata nel paragrafo specifico.

Passo ottico cuvetta	Intervallo analitico (µg P L ⁻¹)	LOD (µg P L ⁻¹)		LOQ (µg P L ⁻¹)	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
5 cm	4 - 60	2,0	1,2	5,5	2,7
5 cm	4 - 400	2,1	2,1	5,5	5,5

L'intervallo analitico 4-60 µg L⁻¹ è ottimizzato per le basse concentrazioni di fosforo delle acque superficiali ed ha minori valori di LOD ed LOQ. Campioni con concentrazioni più elevate dell'intervallo analitico 4-400 µg L⁻¹ possono essere analizzati solo dopo opportuna diluizione.

RIPETIBILITA' ANALITICA

La ripetibilità qui riportata è stata ottenuta con cuvette a diverso passo ottico (4, 5 e 10 cm) nel laboratorio di idrochimica del CNR-ISE dall'anno 1989 con il metodo qui descritto. Il valore di deviazione *standard* relativa (R.S.D.) è ottenuto dalle analisi delle carte di controllo; ogni valore è rappresentativo di una serie di almeno 30 determinazioni eseguite in giorni diversi sullo stesso campione.



REAGENTI

I - Miscela di reagenti:

- 0,340 g di potassio antimonio tartrato $\text{KOOOC}(\text{CHOH})_2 \text{COOSb } \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, sciolti in circa 50 mL di acqua deionizzata;
- 8,1 g di ammonio eptamolibdato $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sciolti in circa 100 mL di acqua deionizzata;
- 100 mL di acido solforico concentrato (densità 1,84) in circa 200 mL di acqua deionizzata: attenzione aggiungere l'acido all'acqua e contemporaneamente raffreddare;
- dopo aver sciolto separatamente, unire il tutto in un matraccio tarato da 500 mL portando a volume con acqua deionizzata.

II - Soluzione riducente:

- In un matraccio tarato da 500 mL sciogliere 35 g di acido L-ascorbico e 0,150 g di EDTA- Na_2 in circa 400 mL di acqua deionizzata, aggiungere 3 mL di acido formico e portare a volume con acqua deionizzata.

La miscela di reagenti (I) e la soluzione riducente (II) sono stabili per un mese se conservati in cella frigorifera a 4°C ed al buio.

VETRERIA

La vetreria utilizzata per queste analisi deve essere lavata con detersivi da laboratorio esenti da fosforo, oppure con acido solforico al 25 % e risciacquate con acqua deionizzata.

PROCEDIMENTO

Prima di iniziare a prelevare dai campioni l'aliquota da analizzare, preparare tre prove in bianco (acqua ultrapura più i reattivi) come verifica della seguente procedura analitica.

Il volume di campione analizzato può essere di 50 o 25 mL a seconda del volume totale di campione disponibile, l'aliquota di 50 mL è quella consigliata; in seguito tra parentesi vengono riportati i valori relativi all'analisi dell'aliquota di 25 mL.

Con un cilindro graduato da 50 mL ud una pipeta automatica prelevare 50 mL (25 mL) di campione stabilizzato alla temperatura ambiente di 20÷25 °C e versarli in una beuta da 100 mL (50 mL), aggiungere 1,5 mL (0,75 mL) di miscela di reagenti (I), agitare, e dopo circa 2 minuti aggiungere 1,5 mL (0,75 mL) di soluzione riducente (II) ed agitare nuovamente; dopo 15 minuti ed entro 1 ora dall'aggiunta dei reattivi, si esegue la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 890 nm utilizzando una cuvetta da 5 cm di passo ottico, azzerando lo strumento con acqua deionizzata.

CALIBRAZIONE

Dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata di sale con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato nella tabella delle diluizioni delle soluzioni madre e prelevare in triplo 50 mL in beute da 100 mL lavate di fresco avendo cura di procedere in ordine dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore ed avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; continuare poi con la determinazione come descritto nel procedimento.

Soluzione madre:

- A -	0,87874 g KH ₂ PO ₄ in 1000 mL	=	200 µg P mL ⁻¹
- B -	10 mL di A in 1000 mL	=	2 µg P mL ⁻¹

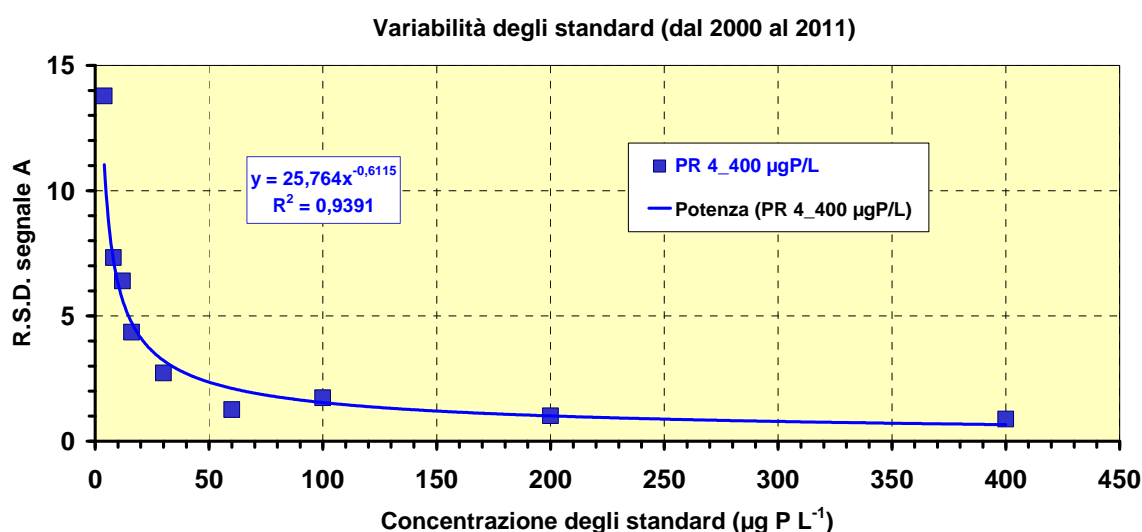
Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo per la determinazione del fosforo reattivo.

Concentrazione µg P L ⁻¹	Prelievo		Volume finale mL
	madre A	madre B	
4		1000 µL	500
8		1000 µL	250
12		1500 µL	250
16		2000 µL	250
30		15 mL	1000
60		15 mL	500
100		25 mL	500
200	1000 µL		1000
400	1000 µL		500

La stabilità della risposta del metodo è stata valutata utilizzando l'archivio di tutti i segnali ottenuti dagli *standard* utilizzati per le calibrazioni annuali eseguite con lo stesso spettrofotometro SAFAS UV mc2 dall'anno 2000.

I valori di assorbanza media (u A) ottenuti per ogni *standard* vengono riportati nella sottostante tabella e figura assieme alla loro variabilità espressa come deviazione *standard* relativa (R.S.D.). Si nota il tipico andamento in diminuzione con l'aumentare della concentrazione; i valori di R.S.D. decrescono sensibilmente dal 14-7 % per le basse concentrazioni (4-12 µg P L⁻¹) al 4-1 % per le altre concentrazioni.

µg P L ⁻¹	4	8	12	16	30	60	100	200	400
u A media	0,0130	0,0266	0,0393	0,0524	0,1019	0,2070	0,3465	0,6996	1,3933
R.S.D.	13,8	7,3	6,4	4,4	2,7	1,3	1,7	1,0	0,9
n° dati	28	29	30	29	32	31	29	29	29



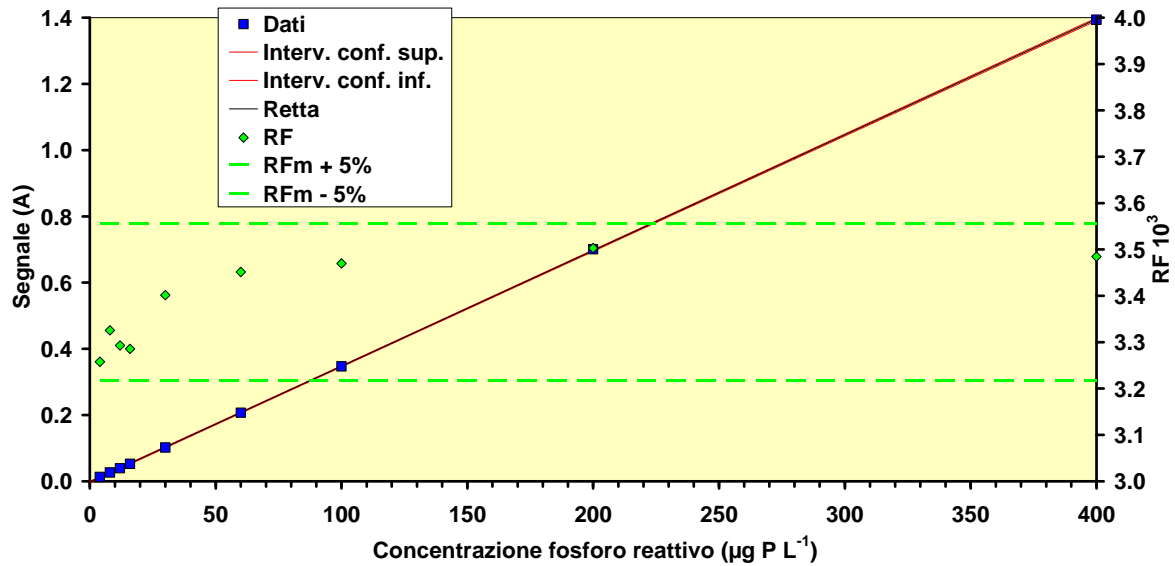
Considerata questa limitata variabilità negli anni, rappresentativa della buona stabilità strumentale ed analitica nel tempo e della variabilità nelle preparazioni degli *standard*, dall'anno 2007 per la calibrazione vengono utilizzati i valori medi dei segnali ottenuti dal 2000 per ciascun *standard*.

Le equazioni delle regressioni lineari ottenute per ciascun intervallo analitico ed utilizzate per il calcolo delle concentrazioni, sono riportate qui di seguito assieme ai coefficienti di correlazione lineare (r).

Intervallo analitico 4 - 60 µg P L⁻¹ (utilizzati i primi 6 *standard*): cuvetta con passo ottico di 5 cm
 $\mu\text{g P L}^{-1} = 286,385 \text{ u.A} + 0,596$ $r = 0,999995$

Intervallo analitico 4 - 400 µg P L⁻¹ (utilizzati tutti i 9 *standard*): cuvetta con passo ottico di 5 cm
 $\mu\text{g P L}^{-1} = 287,882 \text{ u.A} + 0,552$ $r = 0,999929$

Il grafico della calibrazione per l'intervallo analitico più ampio (4 - 400 µg P L⁻¹), viene qui riportato assieme agli intervalli di confidenza della regressione (al 95 %) ed ai valori di fattore di risposta calcolati per ogni concentrazione (RF = segnale / concentrazione), che indicano la qualità della regressione lineare (entro ± 5 % dell'RF medio).



CALCOLI

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,001 e 0,005 u.A) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura qui riportata.

Esprimere la concentrazione in $\mu\text{g P L}^{-1}$ arrotondando all'unità.

Riferimenti bibliografici

- 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.
- Valderrama J.C. 1977. Methods used by the Hydrographic Department of the National Board of Fisheries. Goteborg, Sweden.