



## AZOTO E FOSFORO TOTALE

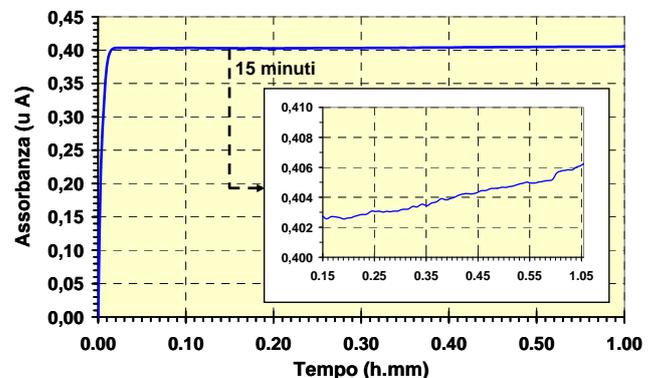
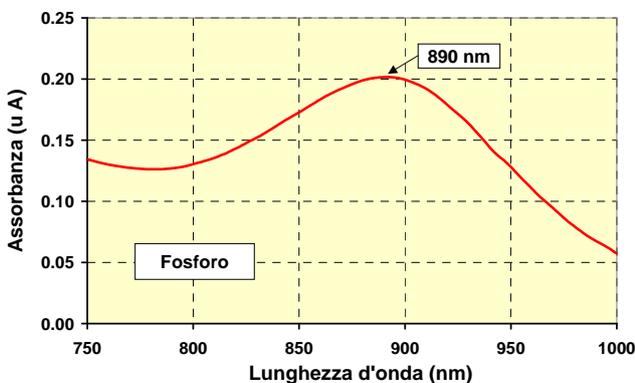
### metodo colorimetrico

#### PRINCIPIO DEL METODO

I composti organici contenenti azoto e fosforo vengono contemporaneamente ossidati a nitrato ed ortofosfato con la miscela ossidante potassio persolfato, acido borico e sodio idrossido; l'ossidazione è simultanea grazie alla variazione tra pH 9,7 e 5 ottenuta dall'ossidazione del sistema acido borico - sodio idrossido.

Dopo l'ossidazione l'azoto totale si determina per lettura diretta del nitrato alla lunghezza d'onda di 220 nm, questa determinazione è possibile solo sul campione ossidato perchè l'ossidazione disgrega i composti organici interferenti sulla lettura a 220 nm.

Il fosforo totale viene determinato per reazione dell'ortofosfato con l'ammonio molibdato ed il potassio antimonio tartrato che porta alla formazione del complesso antimonio fosfomolibdico, a sua volta ridotto dall'acido L-ascorbico al complesso blu di molibdeno che presenta il massimo di assorbanza a 890 nm.



Spettro di assorbimento di azoto e fosforo totale con cinetica di sviluppo del colorante blu di molibdeno per la determinazione del fosforo totale.

## INTERVALLO ANALITICO, LIMITI DI RIVELABILITA' E QUANTIFICAZIONE

Intervalli analitici e limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) dell'analisi dell'azoto in mg N L<sup>-1</sup> e fosforo totale in µg P L<sup>-1</sup>, 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.

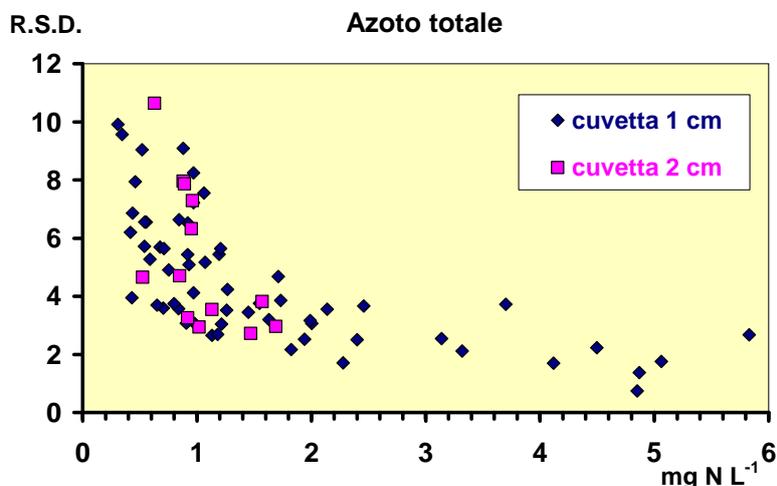
Passo ottico cuvetta	Intervallo analitico (mg N L <sup>-1</sup> )	LOD (mg N L <sup>-1</sup> )		LOQ (mg N L <sup>-1</sup> )	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
1 cm	0,30 - 2,00	0,06	0,032	0,20	0,066
1 cm	0,40 - 6,00	0,04	0,106	0,18	0,278

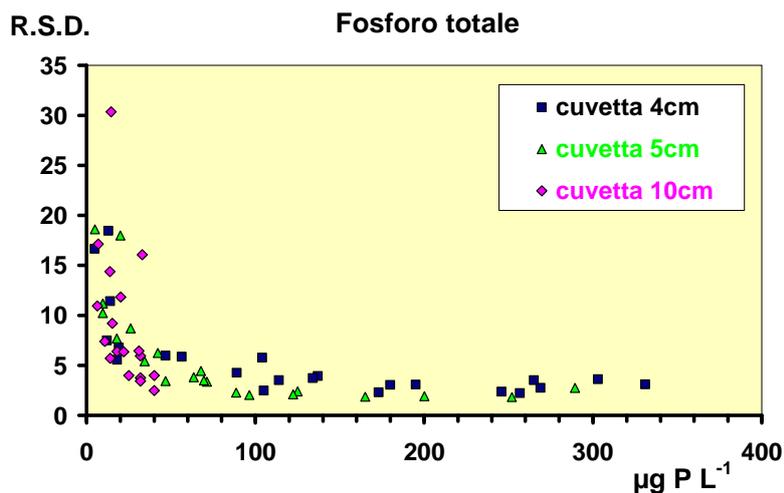
Passo ottico cuvetta	Intervallo analitico (µg P L <sup>-1</sup> )	LOD (µg P L <sup>-1</sup> )		LOQ (µg P L <sup>-1</sup> )	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
5 cm	4 - 60	4,4	3,0	14,8	6,9
5 cm	4 - 400	4,0	3,7	14,6	9,5

Gli intervalli analitici 0,30-2,00 mg N L<sup>-1</sup> e 4-60 µg P L<sup>-1</sup> sono ottimizzati per le basse concentrazioni di azoto e fosforo totale delle acque superficiali e hanno minori valori di LOD ed LOQ. Campioni con concentrazioni più elevate dell'intervallo analitico 0,40-6,00 mg N L<sup>-1</sup> e 4-400 µg P L<sup>-1</sup> possono essere analizzati solo dopo opportuna diluizione.

### RIPETIBILITA' ANALITICA

I valori di ripetibilità qui riportati sono stati ottenuti con cuvette a diverso passo ottico 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 ossidante:

250 g di potassio persolfato ( $K_2S_2O_8$ ) allo 0,001% massimo di azoto (Merck n. 5092), 150 g di acido borico, 70 g di sodio idrossido in gocce portati a 5000 mL con acqua deionizzata. Conservare a temperatura ambiente, non raffreddare a 4°C.

II - Acido solforico 98% contenente al massimo 0,0005% di azoto (Merck n° 748).

### III - Miscela di reagenti:

- 0,340 g di potassio antimonio tartrato  $KOOC(CHOH)_2COOSb \frac{1}{2} H_2O$ , sciolti in circa 50 mL di acqua deionizzata;
- 8,1 g di ammonio eptamolibdato  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  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 matraccio tarato da 500 mL e portare a volume con acqua deionizzata.

### IV - 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 ossidante (I) è utilizzabile per 3-4 mesi, mentre la miscela di reagenti (III) e la soluzione riducente (IV) sono stabili per un mese se conservati in cella frigorifera a 4°C ed al buio.

## VETRERIA

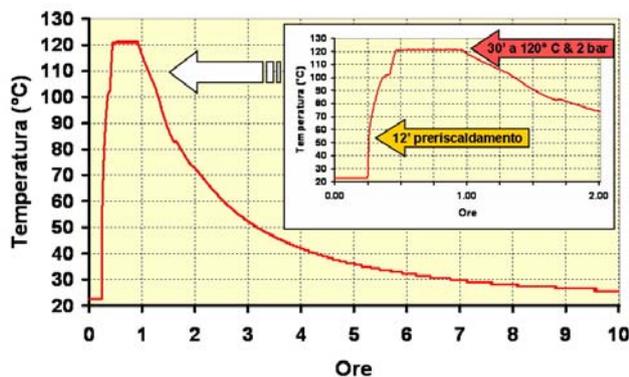
La vetreria utilizzata per queste analisi deve essere lavata con detersivi esenti da fosforo, oppure con acido solforico al 25 % e risciacquate con acqua deionizzata.

Per l'ossidazione in autoclave si consigliano bottiglie ermetiche da 50 o da 100 mL come quelle riportate in figura, con tappo a vite e guarnizione resistenti alla temperatura di 120°C (SCHOTT DURAN con tappo blu GL32 e GL45 con massima temperatura di utilizzo 140°C).



## AUTOCLAVE

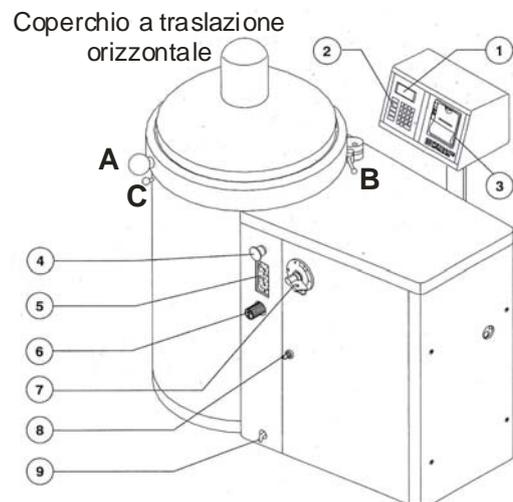
L'autoclave o sterilizzatore a vapore saturo permette di mineralizzare i campioni con la miscela ossidante alla temperatura di 120 °C e pressione totale di 2 bar. Il processo di mineralizzazione a 120 °C è di 30 minuti ma il ciclo completo dal preriscaldamento al raffreddamento prima di poter aprire l'autoclave dura circa 3 ore e complessivamente circa 5-6 ore, prima di poter portare a termine la determinazione come si può vedere nel grafico che rappresenta l'intero ciclo termico.



Autoclave a vapore saturo

Vengono qui descritte le principali parti dell'autoclave, per il suo utilizzo si veda lo specifico manuale.

- A. Manopola per traslazione coperchio
- B. Manopola di chiusura coperchio
- C. Manopola di apertura coperchio
- 1. Display a cristalli liquidi
- 2. Tastiera
- 3. Stampante
- 4. Pulsante di arresto per emergenza
- 5. Manometri pressione delle camere
- 6. Valvola manuale di scarico pressione camera
- 7. Interruttore generale
- 8. Chiave di accesso al vano tecnico
- 9. Condotto di deflusso



## PROCEDIMENTO

Prima di iniziare a prelevare i campioni 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 eseguita sull'aliquota di 25 mL.

### Ossidazione in autoclave

Prelevare separatamente per l'analisi del fosforo e dell'azoto totali 50 mL (25 mL) di campione con un cilindro graduato da 50 mL o con una pipetta automatica, si versano nelle bottiglie per l'ossidazione e si aggiungono 7 mL (3,5 mL) della miscela ossidante (I); le bottiglie ben tappate si mettono in autoclave e si procede con l'ossidazione a 120°C per 30 minuti. In assenza di autoclave è possibile utilizzare una stufa a 120-130°C aumentando il tempo a 2 ore.

Estrarre i campioni quando la temperatura dell'autoclave è scesa sotto i 60°C, proseguire con le analisi solo quando i campioni si sono raffreddati alla temperatura ambiente.

### Determinazione dell'azoto totale

Dopo l'ossidazione in autoclave i campioni vanno acidificati con 0,85 mL (0,4 mL di acido solforico 98% contenente al massimo 0,0005% di N, (Merck n. 748) ed agitati; la lettura spettrofotometrica si esegue alla lunghezza d'onda di 220 nm in cuvette di quarzo da 1 cm, l'azzeramento dello strumento si esegue con circa 57 mL di acqua ultrapura acidificata con 0,85 mL di acido solforico 98 % allo 0,0005% di N.

Attenzione: accendere lo spettrofotometro e la lampada per l'ultravioletto almeno 15 minuti prima della lettura.

### Determinazione del fosforo totale

Ai campioni ossidati in autoclave e raffreddati alla temperatura ambiente di 20÷25°C si aggiungono 1,5 mL (0,75 mL) di soluzione riducente (IV), si agita, e dopo circa 2 minuti si aggiungono 1,5 mL (0,75 mL) di miscela di reagenti (III) e si agita nuovamente; dopo 15 minuti, ed entro 1 ora, si esegue la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 890 nm 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* contenenti entrambi i composti di azoto e fosforo procedendo come indicato nella tabella delle diluizioni delle soluzioni madre. Prelevare in triplo 50 mL di soluzione *standard* in beute lavate di fresco avendo cura di procedere in ordine dal bianco allo *standard* con concentrazione maggiore, avvinando la pipetta ad ogni cambio di concentrazione; aggiungere ad ogni beuta 7 mL di miscela di riferimento costituita da 50,4 g di KHSO<sub>4</sub>, 30 g di H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 14 g di NaOH portati al volume di un litro con acqua deionizzata.

Le soluzioni *standard* così trattate rappresentano il campione al termine della ossidazione in autoclave, ipotizzando che il processo di ossidazione abbia una resa del 100% per tutti i composti organici contenenti azoto e fosforo presenti nel campione, con completa minaralizzazione a nitrato e fosfato.

La procedura di calibrazione continua poi con le singole determinazioni di azoto e fosforo totali come descritto nel procedimento.

Soluzioni madre per il fosforo:

- A - 0,87874 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1000 mL = 200  $\mu\text{g P mL}^{-1}$
- B - 10 mL di A in 1000 mL = 2  $\mu\text{g P mL}^{-1}$

Soluzione madre per l'azoto:

- C - 0,61286 g  $\text{NaNO}_3$  in 1000 mL = 0,10 mg N  $\text{mL}^{-1}$

Diluizioni delle soluzioni madre A , B e C per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione contenenti azoto e fosforo per la determinazione dell'azoto e del fosforo totale.

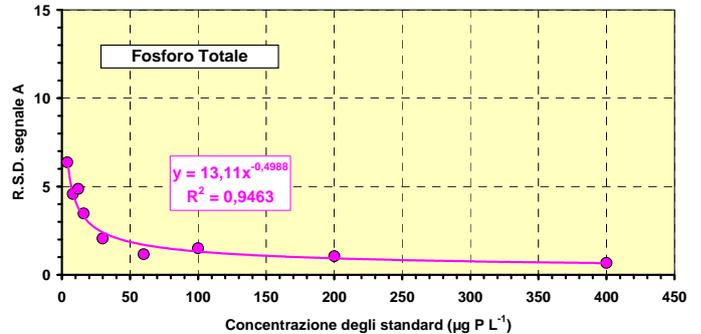
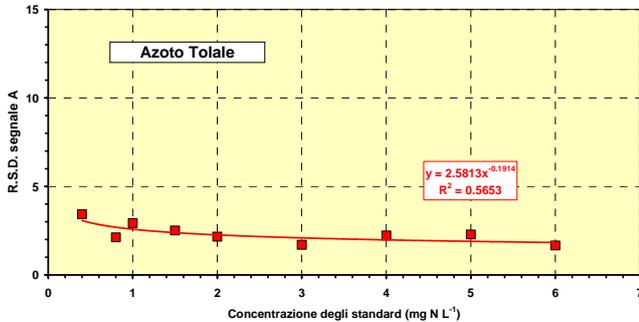
Azoto			Fosforo			Volume finale mL
mg N L <sup>-1</sup>	Prelievo	Madre	$\mu\text{g P L}^{-1}$	Prelievo	Madre	
<b>0,40</b>	2000 $\mu\text{L}$	C	<b>4</b>	1000 $\mu\text{L}$	B	500
<b>0,80</b>	4000 $\mu\text{L}$	C	<b>8</b>	2000 $\mu\text{L}$	B	500
<b>1,00</b>	5000 $\mu\text{L}$	C	<b>12</b>	3000 $\mu\text{L}$	B	500
<b>1,50</b>	15 mL	C	<b>16</b>	8 mL	B	1000
<b>2,00</b>	20 mL	C	<b>30</b>	15 mL	B	1000
<b>3,00</b>	15 mL	C	<b>60</b>	15 mL	B	500
<b>4,00</b>	20 mL	C	<b>100</b>	25 mL	B	500
<b>5,00</b>	25 mL	C	<b>200</b>	50 mL	B	500
<b>6,00</b>	30 mL	C	<b>400</b>	1000 $\mu\text{L}$	A	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 nelle sottostanti tabelle e figure 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. d per l'azoto totale sono tutti entro il 2-3 % mentre pe il fosforo totale decrescono sensibilmente dal 7 % per le basse concentrazioni all'1 % per le altre concentrazioni.

mg N L <sup>-1</sup>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>6,0</b>
<b>u A media</b>	0,0947	0,1881	0,2367	0,3527	0,4697	0,7003	0,9337	1,1549	1,3808
<b>R.S.D.</b>	3,4	2,1	2,9	2,5	2,2	1,7	2,2	2,3	1,7
<b>n° dati</b>	28	26	25	23	27	26	27	23	27

$\mu\text{g P L}^{-1}$	4	8	12	16	30	60	100	200	400
<b>u A media</b>	0,0130	0,0265	0,0393	0,0524	0,1019	0,2070	0,3465	0,6996	1,3933
<b>R.S.D.</b>	13,8	7,3	6,4	4,4	2,7	1,3	1,7	1,0	1,0
<b>n° dati</b>	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 di azoto e fosforo totale, sono riportate qui di seguito assieme ai coefficienti di correlazione lineare (r).

**Intervallo analitico 0,4 - 2 mg N L<sup>-1</sup>** (utilizzati i primi 5 *standard*): cuvetta con passo ottico 1 cm

$$\text{mg N L}^{-1} = 4,266 \text{ u.A} - 0,005 \quad r = 0,999989$$

**Intervallo analitico 0,4 - 6 mg N L<sup>-1</sup>** (utilizzati tutti i 9 *standard*): cuvetta con passo ottico 1 cm

$$\text{mg N L}^{-1} = 4,349 \text{ u.A} - 0,030 \quad r = 0,999960$$

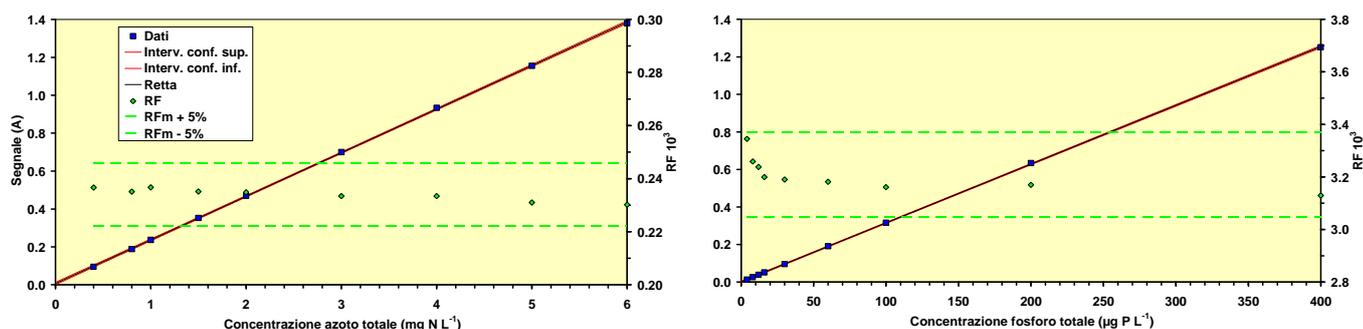
**Intervallo analitico 4 – 60  $\mu\text{g P L}^{-1}$**  (utilizzati i primi 5 *standard*): cuvetta con passo ottico 5 cm.

$$\mu\text{g P L}^{-1} = 315,691 \text{ u.A} - 0,198 \quad r = 0,999999$$

**Intervallo analitico 4 – 400  $\mu\text{g P L}^{-1}$**  (utilizzati tutti i 9 *standard*): cuvetta con passo ottico 5 cm.

$$\mu\text{g P L}^{-1} = 319,173 \text{ u.A} - 0,617 \quad r = 0,999983$$

I grafici delle calibrazioni per gli intervalli analitici 0,4 – 2,0 mg N L<sup>-1</sup> e 4 - 400  $\mu\text{g P L}^{-1}$ , vengono qui riportati assieme agli intervalli di confidenza della regressione (al 95 %) ed ai valori dei fattori di risposta calcolati per ogni concentrazione (RF = Segnale / concentrazione), che indicano la qualità della regressione lineare (entro  $\pm 5\%$  dell'RF medio).



## CALCOLI

Ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura viene sottratta la media dei tre bianchi (solitamente compresa tra 0,005 e 0,025 u.A per l'azoto con cuvetta da 1 cm e tra 0,002 e 0,020 u.A per il fosforo con cuvetta da 5 cm) e trasformati in concentrazione mediante le rette di taratura.

Esprimere la concentrazione dell'azoto totale in mg N L<sup>-1</sup> di azoto arrotondando al centesimo, ed il fosforo in µg P L<sup>-1</sup> 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.

Per le condizioni di ossidazione e la determinazione del fosforo totale:

Valderrama J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109 - 122.

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

Per la determinazione dell'azoto totale:

A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Method 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B). Amer. Publ. Health Ass., Washington.