



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

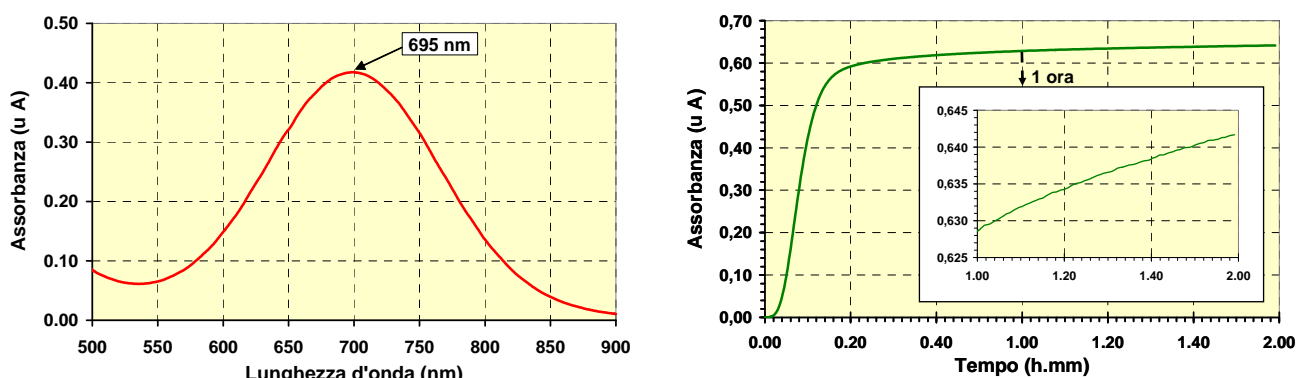


AZOTO AMMONIACALE

metodo colorimetrico

PRINCIPIO DEL METODO

In presenza del catalizzatore sodio nitroprussiato lo ione ammonio reagisce con il gruppo fenolico presente nel sodio salicilato; l'azione ossidante del sodio dicloro isocianurato porta alla formazione del composto blu indofenolo il cui spettro presenta un massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 695 nm.



Spettro di assorbimento e cinetica di sviluppo del colorante blu indofenolo

INTERVALLO ANALITICO, LIMITI DI RIVELABILITA' E QUANTIFICAZIONE

Intervallo analitico e limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) dell'analisi del azoto ammoniacale espressi in $\mu\text{g N L}^{-1}$, 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.

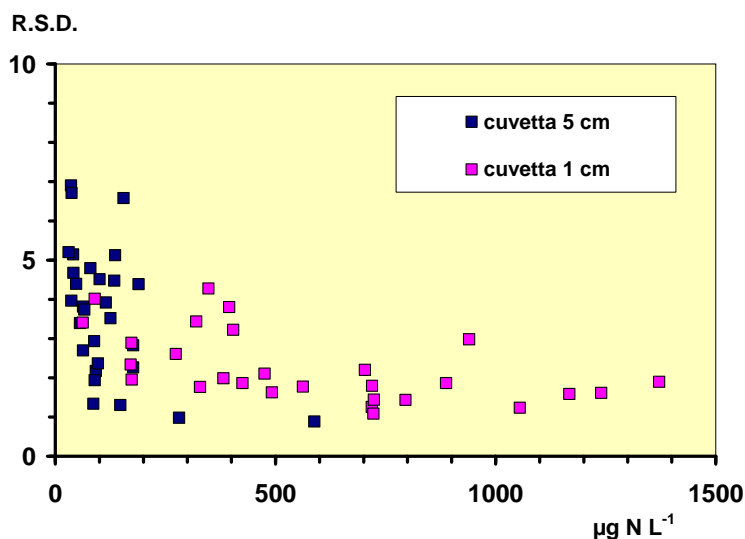
Passo ottico cuvetta	Intervallo analitico ($\mu\text{g N L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g N L}^{-1}$)		LOQ ($\mu\text{g N L}^{-1}$)	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
5 cm	5 - 200	4,3	4,5	13	11
1 cm	200 - 1500	-	-	25	186

L'intervallo analitico $5\text{-}200 \mu\text{g N L}^{-1}$ è ottimizzato per le basse concentrazioni di ammonio delle acque superficiali ed ha minori valori di LOD ed LOQ; per concentrazioni superiori a $200 \mu\text{g N L}^{-1}$

utilizzare la cuvetta da 1 cm che arriva alla concentrazione massima di 1500 µg N L⁻¹. Campioni con concentrazioni più elevate 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 1 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 - 200 g di sodio citrato tribasico biidrato e 20 g di sodio idrossido in gocce vengono sciolti in 1000 mL di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo è stabile per sei mesi.
- II - 0,5 g di sodio nitroprussiato biidrato e 42,5 g di sodio salicilato (Merck n. 6601) vengono sciolti in 250 mL di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo va conservato al buio ed è stabile per due settimane.
- III - 0,116 g di sodio dicloro isocianurato (Kodak n. 10511) vengono sciolti in 20 mL di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.
- IV - miscela ossidante: 80 mL della soluzione I vengono miscelati con 20 mL della soluzione III. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.

PROCEDIMENTO

Per queste analisi utilizzare beute da 50 mL con tappo a vite, precedentemente risciacquate con acqua deionizzata ultrapura; periodicamente (ogni 2-3 mesi) si consiglia un lavaggio più energico con acido solforico concentrato seguito da un risciacquo con acqua deionizzata.

Prima di iniziare a prelevare i campioni preparare tre prove in bianco con acqua deionizzata ultrapura come verifica della procedura analitica.

Con una pipetta prelevare 25 mL di campione ed, agitando dopo ogni aggiunta di reattivo, aggiungere nell'ordine 1 mL della soluzione II e 1 mL della soluzione ossidante IV. Tappare le beute ed attendere un'ora prima della lettura spettrofotometrica.

La lettura spettrofotometrica si esegue alla lunghezza d'onda di 695 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* come indicato nella tabella delle diluizioni delle soluzioni madre, prelevarne in triplo 25 mL, avendo cura di procedere in ordine crescente 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.

Per la preparazione degli *standard* utilizzare matracci tarati lavati con acido solforico e risciacquati con acqua ultrapura.

Soluzioni madre:

- A - 0,76378 g NH₄Cl in 1000 mL = 200 µg N mL⁻¹
- B - 10 mL di A in 1000 mL = 2 µg N mL⁻¹

Diluizioni delle soluzioni madre A e B per la preparazione delle soluzioni *standard* di calibrazione del metodo spettrofotometrico dell'azoto ammoniacale.

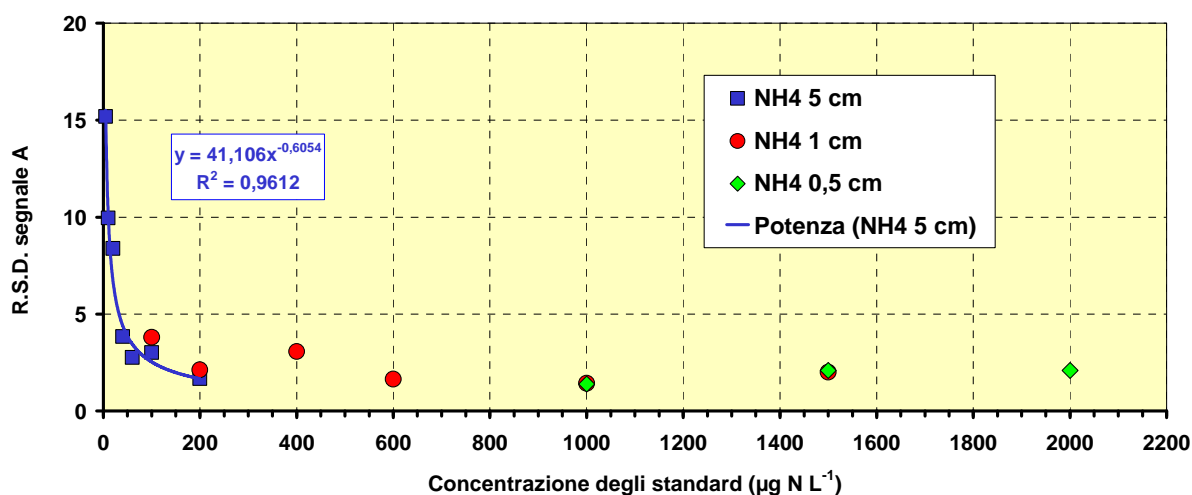
Concentrazione µg N L ⁻¹	Prelievo		Volume finale mL
	madre A	madre B	
5		500 µL	200
10		1000 µL	200
20		2000 µL	200
40		2000 µL	100
60		3000 µL	100
100		10 mL	200
200		20 mL	200
400		40 mL	200
600	3000 µL		1000
1000	5000 µL		1000
1500	7500 µL		1000
2000	5000 µL		500

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* dei due intervalli analitici 5-200 e 200-1500 µg N L⁻¹ rispettivamente per le cuvette da 5 ed 1 cm di passo ottico, vengono riportati nelle sottostanti tabelle 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 12 -9 % per le basse concentrazioni (5-20 µg N L⁻¹) al 4-1 % per le altre concentrazioni.

Cuvetta 5 cm µg N L ⁻¹	5	10	20	40	60	100	200
u A media	0,0252	0,0481	0,0944	0,1980	0,3052	0,4930	1,0167
R.S.D.	15,2	10,0	8,4	3,8	2,8	3,0	1,3
n° dati	29	31	31	37	28	32	41

Cuvetta 1 cm µg N L ⁻¹	100	200	400	600	1000	1500
u A media	0,0998	0,2039	0,4165	0,6395	1,0571	1,5353
R.S.D.	3,8	2,1	3,1	1,6	1,4	2,0
n° dati	35	35	35	31	35	34



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).

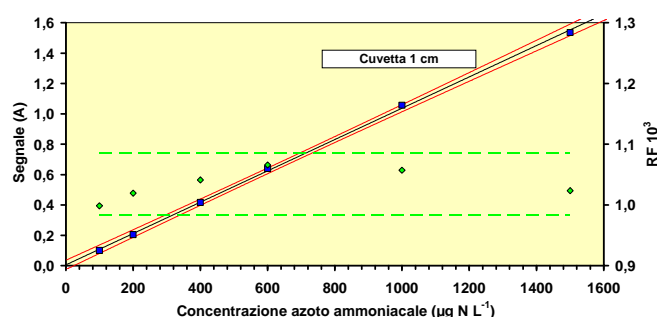
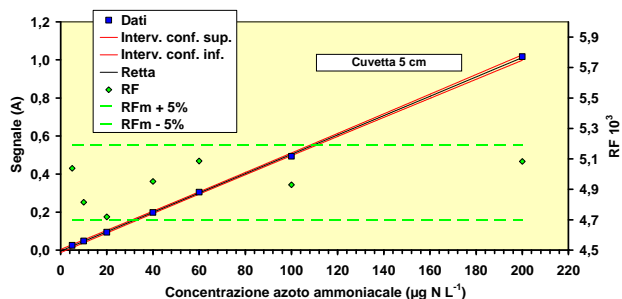
Intervallo analitico 5 - 200 µg N L⁻¹ (utilizzati i primi 7 *standard*): cuvetta passo ottico 5 cm

$$\mu\text{g N L}^{-1} = 196,677 \text{ u.A} + 0,876 \quad r = 0,999872$$

Intervallo analitico 200 - 1500 µg N L⁻¹ (utilizzati i 6 *standard*): cuvetta passo ottico 1 cm

$$\mu\text{g N L}^{-1} = 968,591 \text{ u.A} - 4,7 \quad r = 0,999642$$

I grafici delle calibrazioni per ciascun l'intervallo analitico (5 - 200 e 100 - 1500 $\mu\text{g N L}^{-1}$), vengono qui riportati assieme agli intervalli di confidenza della regressione (al 95 %) ed ai valori di fattore di risposta calcolati per ogni concentrazione (RF = segnale / concentrazione), ad indicare 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 0,010 e 0,040 u.A per le cuvette da 5 cm e tra 0,002 e 0,010 u.A per le cuvette da 1 e da 0,5 cm) e trasformati in concentrazione mediante la retta di taratura.

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

Riferimenti bibliografici

- Grasshoff K. and H. Johannsen 1972. A new sensitive and direct method for the determination of ammonia in sea water. *J.Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 34: 516-521
- Fresenius W.,K.E. Quentin and W. Schneider (Eds.) 1988. *Water Analysis*. Springer-Verlag, Berlin. 804 pp.
- 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.