



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 e FOSFORO REATTIVO

metodo colorimetrico (Automated Discrete Analyser SEAL AQ2e)

PRINCIPIO DEI METODI

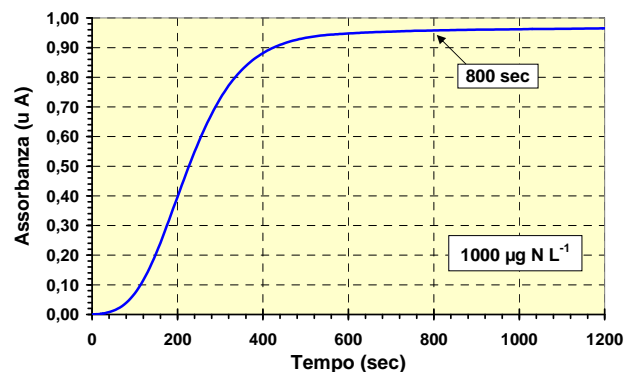
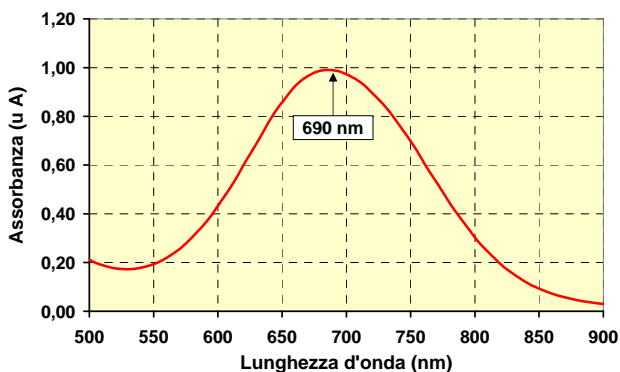
L'analizzatore discreto multiparametrico SEAL AQ2e è uno strumento automatico in grado di eseguire contemporaneamente più metodi colorimetrici ad assorbimento molecolare utilizzando micro quantità di campione e reattivi. Dal campione posto in una fiala da 2 mL viene prelevata una aliquota (solitamente 300÷500 μL) per ciascun metodo in analisi; l'aliquota di campione viene depositata in una cella di reazione nella quale vengono aggiunti in tempi diversi i reagenti (20÷300 μL). A reazione completa il campione viene aspirato in una cella a flusso da 10 mm di passo ottico (volume interno 50 μL) e la lettura in assorbanza viene eseguita con un fotometro a filtri interferenziali a lunghezza d'onda fissa con intervallo spettrale di +/- 8-10 nm, rivelatore a fotiododi. Per le determinazioni di azoto ammoniacale e fosforo reattivo i filtri interferenziali utilizzati sono rispettivamente a 690 e 880 nm.

Le celle di reazione sono termostatate a 37 °C mentre i reagenti sono refrigerati a circa 10 °C; lo strumento è in grado di diluire automaticamente i campioni oltre l'intervallo di calibrazione.

DETERMINAZIONE DELL'AMMONIO

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 690 nm.

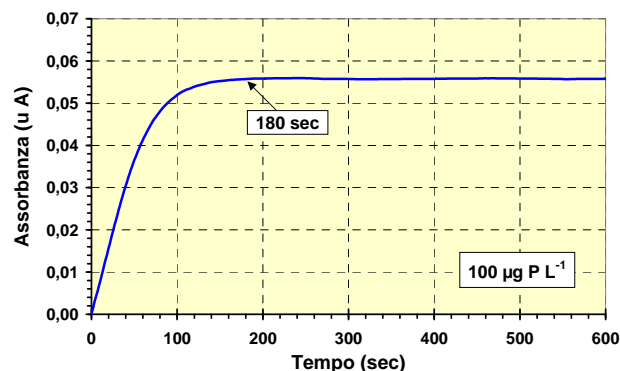
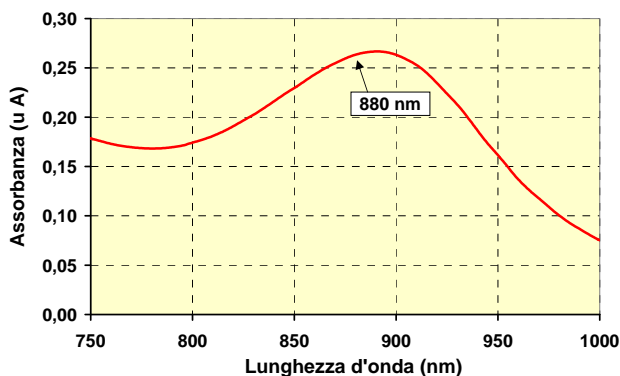
Per la determinazione dell'azoto ammoniacale si utilizzano due metodi, che ricoprono un ampio intervallo d'analisi, un primo metodo utilizzabile da 0,05 a 1,5 ppm (N690_L) ed uno per alte concentrazioni da 1 a 5 ppm (N690_H).



Determinazione dell'azoto ammoniacale, spettro di assorbimento e cinetica di sviluppo del colorante blu indofenolo

DETERMINAZIONE DEL FOSFORO REATTIVO

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 viene letto alla lunghezza d'onda di 880 nm.



Determinazione del fosforo reattivo, 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 di ammonio e fosforo espressi in mg N L^{-1} e mg 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.

Analita	Intervallo analitico	LOD		LOQ	
		IUPAC	Regressione	IUPAC	Regressione
N-NH ₄	0,015 – 1,500 mg N L^{-1}	0,015	0,013	0,045	0,030
N-NH ₄	0,50 – 5,00 mg N L^{-1}	0,145	0,075	0,380	0,160
P-PO ₄	0,015 – 0,400 mg P L^{-1}	0,013	0,022	0,032	0,051

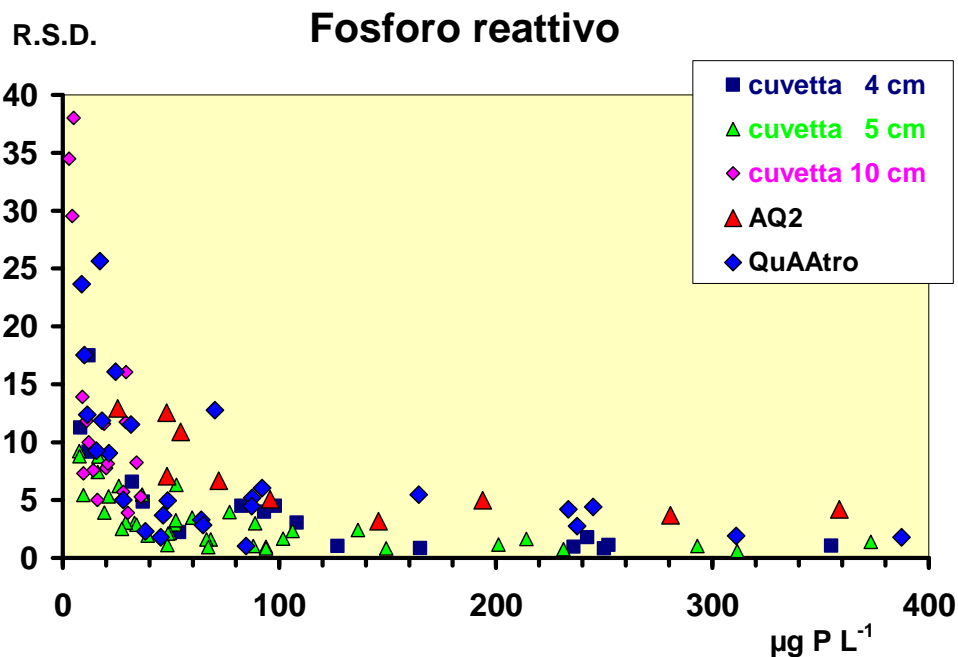
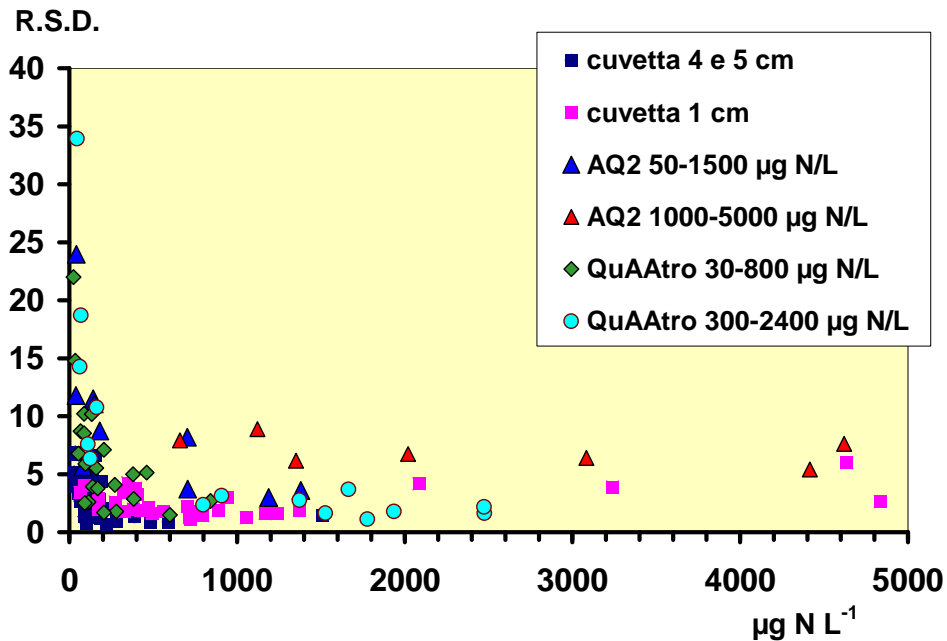
Questi intervalli analitici sono ottimizzati per le concentrazioni di ammonio e fosforo delle deposizioni atmosferiche. Campioni con concentrazioni più elevate possono essere analizzati solo dopo opportuna diluizione.

RIPETIBILITÀ ANALITICA

La ripetibilità qui riportata è stata ottenuta nel laboratorio di idrochimica del CNR-ISE dall'anno 2006 al 2010 con il metodo qui descritto. Per confronto vengono riportate le ripetibilità dei metodi in assorbimento molecolare con lettura manuale allo spettrofotometro (cuvette a passo ottico da 1 a 5 cm) e le ripetibilità dell'analizzatore a flusso segmentato SEAL QuAAtro (*Segmented Flow Analysis SFA*) in uso dal 2011.

I valori di deviazione *standard* relativa (R.S.D.) sono ottenuti dalle analisi delle carte di controllo; ogni valore è rappresentativo di una serie di almeno 15 determinazioni eseguite in giorni diversi sullo stesso campione.

Azoto ammoniacale



STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

Analizzatore discreto multi parametrico SEAL AQ2e collegato a *personal computer* completamente gestito dal *software* AQ Series *Software* versione 4 in ambiente Microsoft Windows XP.

Lo strumento è composto da un piatto porta campioni a 57 posti per *vials* aperti da 2 ml, un piatto per dieci vaschette di reazione a 18 posizioni termostate a circa 37 °C, per un totale di 180 celle ciascuna della capacità di 1000 μL , ed un piatto raffreddato a circa 10 °C per effetto Peltier che può contenere fino a 15 recipienti da 40 mL per i reattivi. Un braccio rotante con sensori di livello permette di prelevare i campioni e gestire le aggiunte di reattivi; al termine della reazione una sonda di aspirazione preleva il colorante formatosi nelle celle di reazione e lo invia alla lettura colorimetrica in una cuvetta a flusso da 10 mm di passo ottico con volume interno di 50 μL e

termostata, l'assorbanza viene misurata da un fotometro a filtri interferenziali a lunghezza d'onda fissa con rivelatore a fotodiodi.

Il *software* permette di programmare e gestire autonomamente e contemporaneamente fino a 3-5 metodi analitici con analisi diversificate per metodo su ciascun campione o *standard* con calibrazioni multi punto per ciascun metodo e controlli di qualità.

Per gli aspetti riguardanti la manutenzione ordinaria delle singole parti (ago prelievo, pompa peristaltica e siringa) ed ulteriori dettagli riguardanti caratteristiche, uso ed eliminazione di inconvenienti, consultare i manuali SEAL AQ2 delle singole parti strumentali ed il manuale del *software*.



Analizzatore discreto SEAL AQ2e

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere preparati nel piatto porta campioni utilizzando gli appositi *vials* aperti, precedentemente lavati con acqua deionizzata; per il riempimento utilizzare una pipetta da 2 mL o versare direttamente il campione dalla bottiglia avvinando almeno due volte.

I campioni vengono generalmente analizzati tal quali, nel caso di evidente particolato sospeso procedere al riempimento dei *vials* utilizzando una siringa da 5 mL con applicato un filtro monouso a membrana da 0,8 μm .

Prima di far partire lo strumento si consiglia di sostituire le vaschette di reazione a 18 posizioni già utilizzate; lo strumento comunque tiene il conteggio delle celle di reazione già utilizzate, ed al momento della partenza di una nuova sequenza verifica se sono sufficienti segnalando eventualmente la sostituzione.



Vial porta campione da 2 mL



Vaschetta di reazione a 18 posizioni

REAGENTI

I reagenti per le determinazioni di ammonio e fosforo qui descritti sono gli stessi utilizzati per le determinazioni spettrofotometriche manuali in uso nel laboratorio del CNR-ISE e descritti in Tartari & Mosello 1997.

SDS - 2,5 g di sodio dodecil solfato in 50 mL di acqua deionizzata ultrapura; questa soluzione viene utilizzata per facilitare il trascinarsi di reattivi e campioni all'interno del sistema analitico.

Si aggiunge circa 200 µl di SDS in 40 mL del reattivo II dell'ammonio e della miscela dei reagenti V del fosforo reattivo.

Reagenti per l'ammonio

I - 100 g di sodio citrato tribasico biidrato e 10 g di sodio idrossido in gocce vengono sciolti in 500 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.

Al momento del travaso di questo reattivo nel contenitore da 40 mL per reattivi dello strumento AQ2 aggiungere 200 µL di soluzione SDS.

III - 0,047 g di sodio dicloro isocianurato (Kodak n. 10511) vengono sciolti in 8 mL di acqua deionizzata ultrapura. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.

IV - miscela ossidante: 32 mL della soluzione **I** vengono miscelati con 8 mL della soluzione **III**. Questo reattivo deve essere preparato al momento dell'analisi.

Reagenti per il fosforo

V - 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.

Al momento del travaso di questo reattivo nel contenitore per reattivi dello strumento AQ2 aggiungere 200 µL di soluzione SDS in circa 40 mL di reattivo.

VI - 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.

Soluzione per lavaggio alcalino ed EDTA

2 g di sodio idrossido ed 1 g di Na_2EDTA sciolti in 100 mL di acqua ultrapura.

I reagenti per il fosforo sono stabili per un mese se conservati in cella frigorifera a 4°C ed al buio.

In tabella 1 e 2 sono riportate per confronto le concentrazioni nel campione dei reattivi per la determinazione del azoto ammoniacale e del fosforo reattivo con le metodiche adottate nei laboratori del CNR-ISE:

- determinazione spettrofotometrica manuale;
- determinazione colorimetrica automatica mediante SEAL AQ2e

Tabella 1: confronto fra quantità di reattivi e loro concentrazioni molari (mM) utilizzate nei metodi spettrofotometrico manuale ed automatico per la determinazione dell'azoto ammoniacale nell'intervallo analitico 0,050 – 1,500 mg N L⁻¹.

Azoto ammoniacale		Salicilato di Sodio	Nitroprussiato di Sodio	Idrossido di Sodio	Citrato di Sodio	Sodio dicloro isocianurato (DIC)
		Reattivo II		Reattivo IV		
Molarità dei reattivi (mM)		1100	7	400	500	5
Metodo manuale	Vol reattivo mM campione	1000 µL		1000 µL		
Vol campione: 25 mL		40	0,3	20	22	0,2
Metodo automatico SEAL AQ2 (N690_L)	Vol reattivo mM campione	40 µL		40 µL		
Vol campione: 500 µL		100	0,5	30	44	0,4

Tabella 2: confronto fra quantità di reattivi e loro concentrazioni molari (mM) utilizzate nei metodi spettrofotometrico manuale ed automatico per la determinazione del fosforo reattivo nell'intervallo analitico 0,015 – 0,400 mg P L⁻¹.

Fosforo reattivo		Ammonio molibdato tetraidrato	Acido Solforico	Antimonio potassio tartrato	Acido Ascorbico
		Reattivo V		Reattivo VI	
Molarità dei reattivi (mM)		10	3752	2	400
Metodo manuale	Vol reattivo mM campione	750 µL		750 µL	
Vol campione: 25 mL		0,4	100	0,05	11
Metodo automatico SEAL AQ2	Vol reattivo mM campione	30 µL		30 µL	
Vol campione: 500 µL		0,8	200	0,1	21,4

Si sottolinea che i reagenti utilizzati per i metodi spettrofotometrico manuale ed automatico sono i medesimi, le uniche differenze sono nei rapporti in volume tra i reattivi e campione.

PARAMETRI DEL METODO

Sono riportati in seguito i principali parametri relativi ai metodi SEAL AQ2 per la determinazione dell'azoto ammoniacale da 0,05-1,5 e da 1-5 mg N L⁻¹ ed il fosforo reattivo 0,015 – 0,400 mg P L⁻¹.

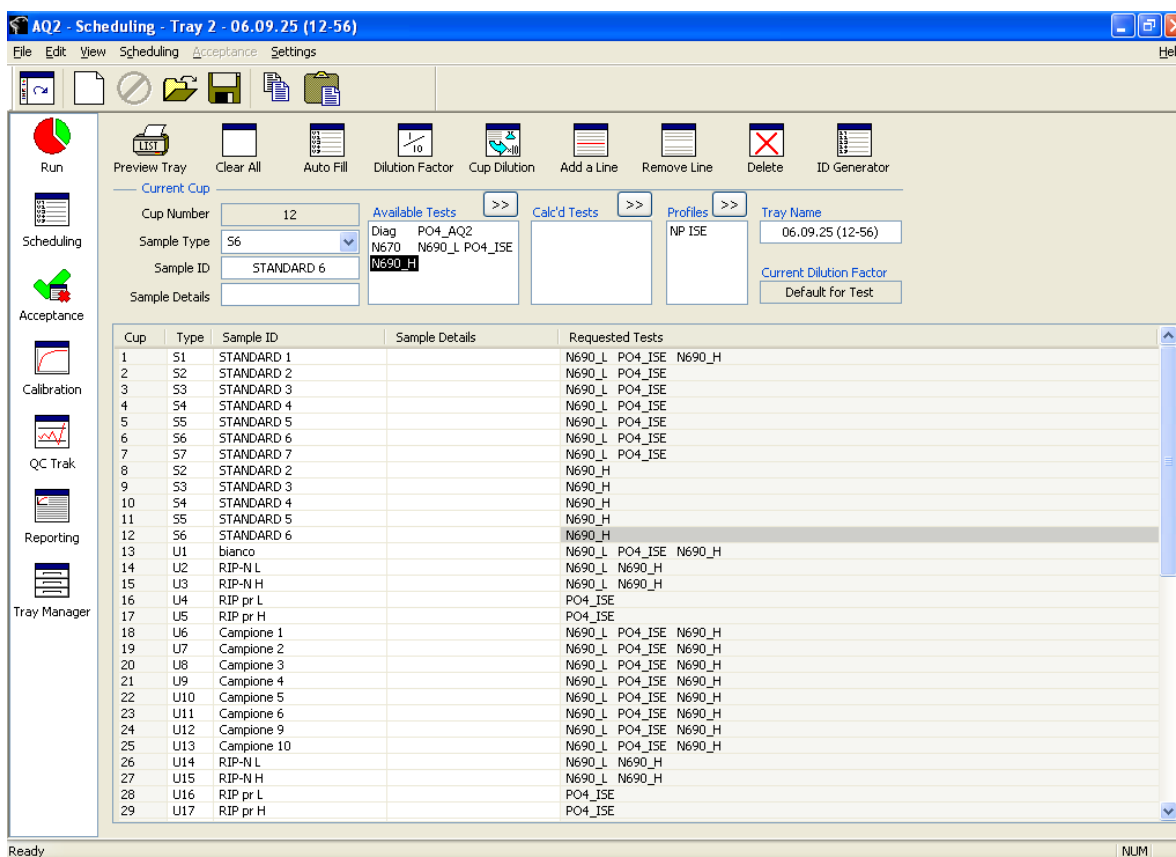
PARAMETRI per ciascun metodo	Impostazione AQ2		
	NH4-ISE 690nm	NH4-1-5 mg/L ISE	PR-ISE 880nm
<i>Short name</i>	N690_L	N690_H	PO4_ISE
<i>Units</i>	mg N L ⁻¹ (ppm)	mg N L ⁻¹ (ppm)	mg P L ⁻¹ (ppm)
<i>Decimal places</i>	3	3	3
<i>Test types</i>	End point	End point	End point
<i>Sample volume (μL)</i>	500	120	500
<i>Water volume (μL)</i>	0	0	0
<i>Number of mixes</i>	2	2	2
<i>Cuvette primes</i>	2	2	4
<i>Cuvette washes</i>	2	2	2
<i>Baseline on washes</i>	NO	NO	NO
<i>Reaction time (secondi)</i>	800	800	180
<i>Wavelength (nm)</i>	690	690	880
<i>Polynomial order</i>	2	2	1
<i>Number of reagents</i>	2	2	2
<i>1. volume (μL)</i>	40	240	30
<i>2. volume (μL)</i>	40	240	30
<i>Delay (secondi)</i>	30	30	0
<i>Exclude the blank (SI)</i>	NO	NO	NO

PROCEDIMENTO

Le seguenti note analitiche sono indicative e relative alla strumentazione precedentemente citata, che si presuppone approfonditamente conosciuta dall'utilizzatore; per ulteriori informazioni tecniche vedere quindi gli specifici manuali relativi alla strumentazione ed al *software* SEAL AQ2. Prima di iniziare il ciclo analitico è necessario riempire di acqua ultrapura il contenitore da 4 L per i lavaggi e controllare che il contenitore di scarico non sia pieno. Accendere lo strumento almeno 30 minuti prima iniziare le determinazioni, verificare la data di scadenza dei reattivi e procedere al lavaggio della cuvetta con il *daily startup* che permette, oltre al lavaggio delle linee e della cuvetta, di controllare il buon funzionamento del rivelatore colorimetrico, lo stato dei filtri interferenziali e di effettuare la correzione della linea di base.

Un ciclo di analisi è solitamente composto da una sequenza di 5-6 *standard* multielemento (N-NH₄ e P-PO₄), due carte di controllo (prelevate in doppio) per ogni metodo e scelte in modo da ricoprire due differenti intervalli di concentrazione e tre bianchi di acqua ultrapura; i campioni analizzati possono essere 20÷30. Al termine dei campioni ripetere le calibrazioni allo scopo di controllare eventuali derive strumentali; è consigliabile porre in coda agli *standard* un campione di bianco.

Per la preparazione della sequenza (*Tray*) si accede dall'icona *Scheduling* e si sceglie il nome della nuova sequenza (finestra *Tray Selection*). La tipologia del campione deve essere specificata nella colonna *Type* (U per i campioni e S per gli *standard*). Nella colonna del *sample ID* si riporta il nome del campione e nella colonna *Required tests* si inserisce il metodo analitico da utilizzare. Salvare le modifiche al termine delle operazioni.



Esempio di impostazione della sequenza analitica

Per dare inizio alla sequenza analitica è necessario cliccare sull'icona *Run*, selezionare la sequenza appena salvata e procedere con lo *start*.

CALIBRAZIONE

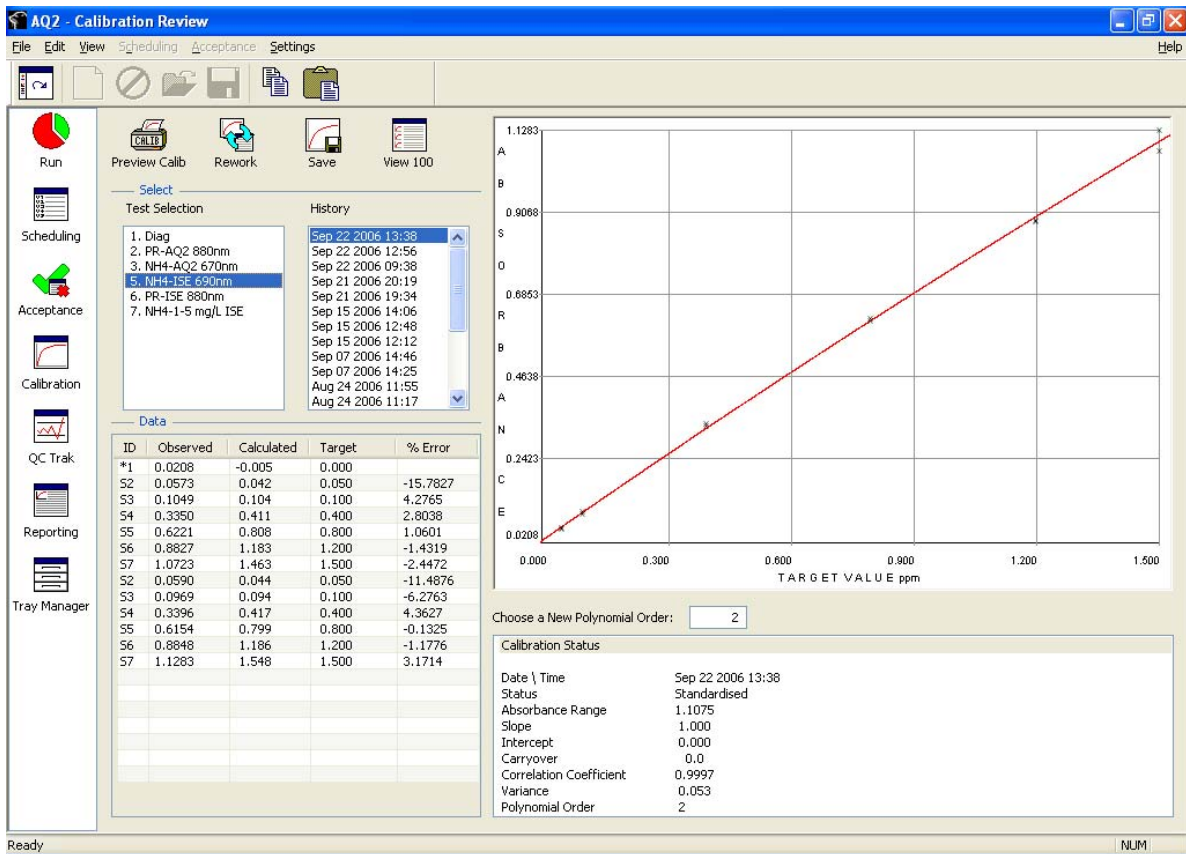
Le calibrazioni vengono eseguite per regressione lineare per il fosforo reattivo e quadratica per l'azoto ammoniacale, utilizzando *standard* multielemento letti due volte per ogni gruppo di analisi, all'inizio ed alla fine della corsa. Per lo zero corrispondente allo *standard* S1, viene utilizzata acqua deionizzata associandogli il valore nominale di zero; questo permette al programma di costruire il grafico della calibrazione partendo per le ascisse dalla concentrazione di zero. Adottando S1 come zero questo punto viene utilizzato nella regressione calcolandone l'intercetta; per forzare la calibrazione a passare per lo zero è necessario escludere S1 nella finestra di programmazione dei parametri di calibrazione *Settings*-> *Test Parameters*-> *Select test* (scegliendo il test da modificare poi) -> *Standards*-> *Exclude the blank*.

Le assorbanze dei singoli *standard* vengono confrontate nel tempo inserendoli in un file Excel per assicurare la confrontabilità dei dati prodotti e per valutare la stabilità della risposta strumentale.

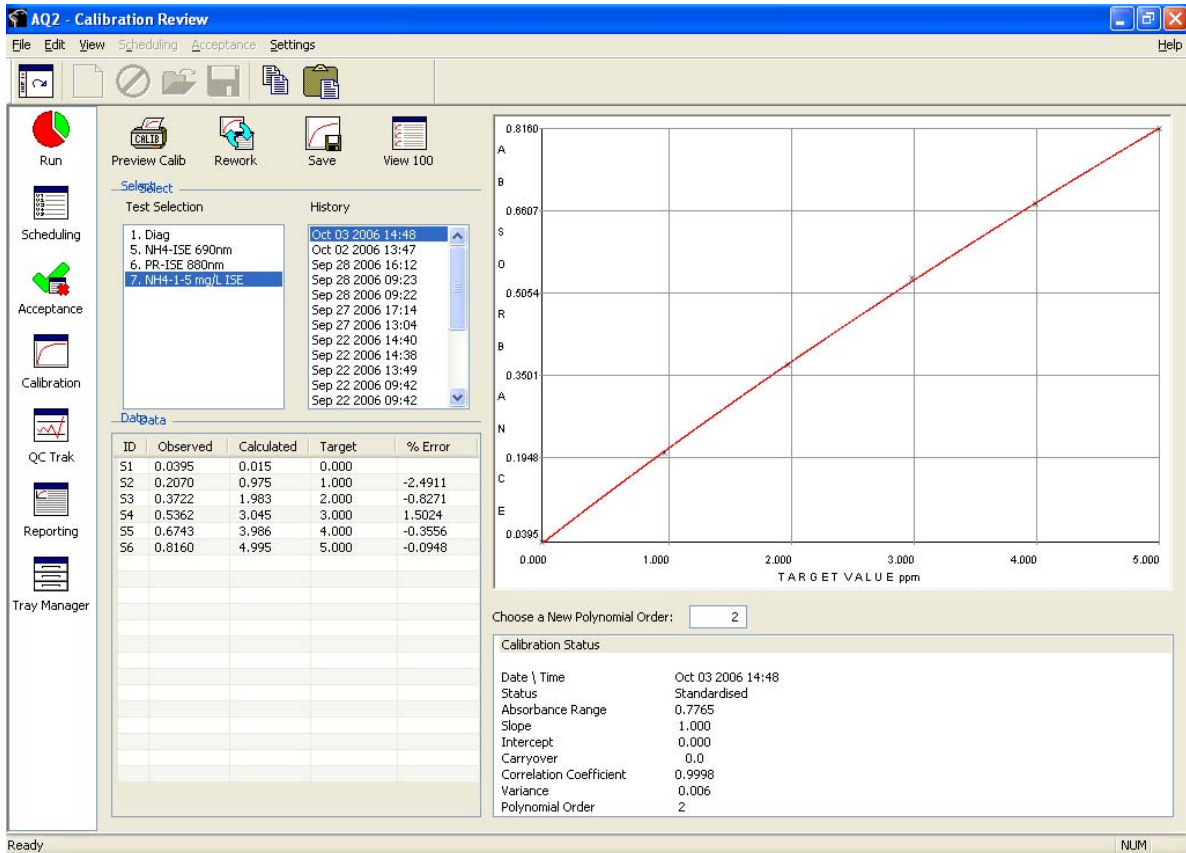
Per visualizzare la calibrazione, sia durante la corsa che al termine dell'analisi, bisogna cliccare



sull'icona *Calibration*, selezionando poi il metodo e l'analisi da controllare.



Esempi di calibrazione dell'azoto ammoniacale metodo 0,05 -1.5 ppm (N690_L)



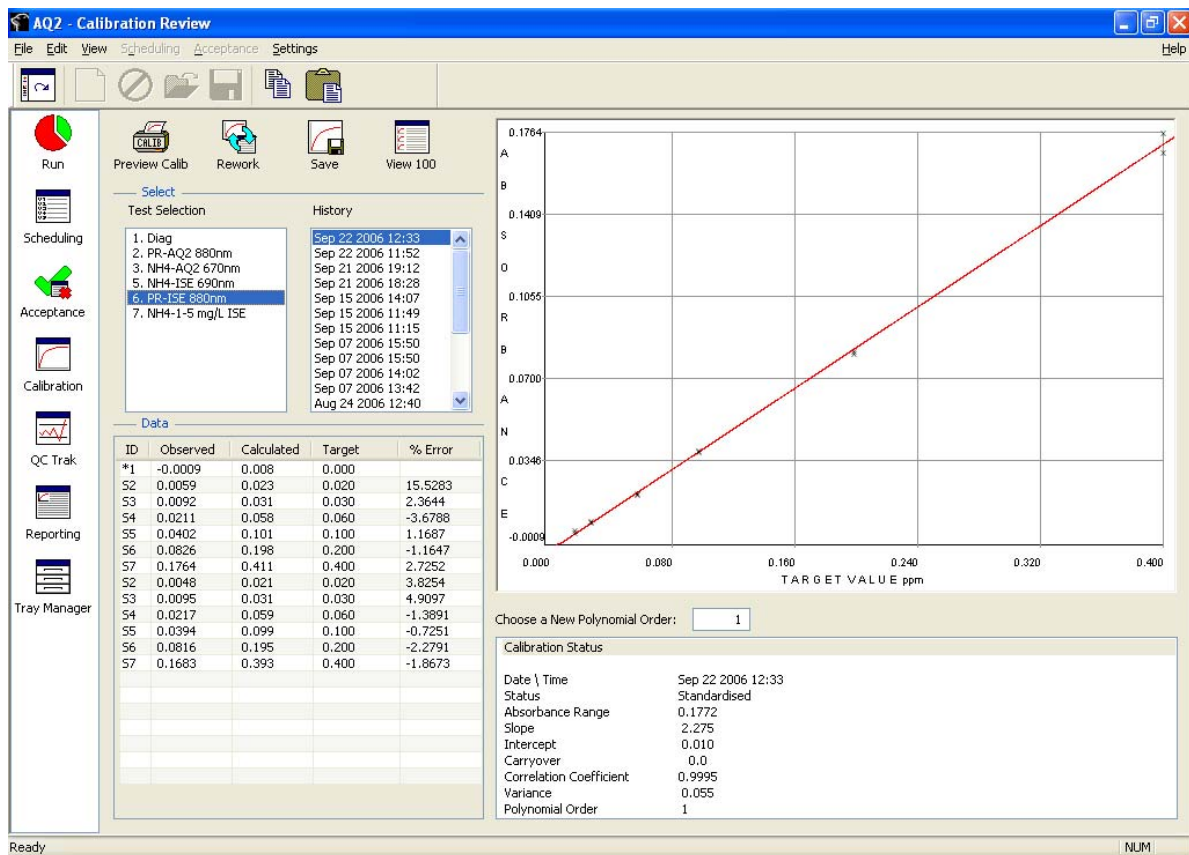
Esempi di calibrazione dell'azoto ammoniacale metodo 1 -5 ppm (N690_H)

Dai parametri di regressione riportati insieme al grafico (*Calibration Status*), tra cui la pendenza, l'intercetta ed il coefficiente di regressione si ottengono informazioni circa la bontà della calibrazione; è possibile inoltre valutare la possibilità di eliminare degli *standard* dalla calibrazione sulla base dell'errore % associato ad ogni *standard* calcolato sulla base della differenza tra il valore calcolato dalla regressione e quello nominale dello *standard*. Normalmente gli *standard* con errore % maggiore del 10% vengono scartati.

Tra i parametri del *Calibration Status* compare la voce *Carryover* a cui viene associato sempre il valore zero in quanto questa funzione viene attivata solo quando la calibrazione è eseguita per diluizione automatica, questo è un indice dell'effetto di trascinamento che si potrebbe verificare passando dallo *standard* più concentrato ad un campione di bianco (definito S0).

L' *Absorbance Range* è calcolato come differenza tra l'assorbanza dello *standard* più alto letto per ultimo e l'assorbanza del bianco (S1). La voce *Variance* indica la varianza associata alla calibrazione.

NOTA: Il programma riesce ad elaborare massimo 16 *standard* nella stessa sequenza, è conveniente calibrare all'inizio della sequenza utilizzando anche S1 necessario per la corretta rappresentazione grafica, ricalibrare poi al termine della sequenza senza inserire l'azzeramento S1.



Esempi di calibrazione del fosforo reattivo (PO4_ISE)

Preparazione degli standard: dopo essiccazione in stufa alla temperatura di 110 °C per almeno un'ora, pesare la quantità indicata dei sali con qualità analitica eventualmente corretta per il grado di purezza. Preparare le soluzioni *standard* come indicato nelle tabelle delle diluizioni delle soluzioni madre e procedere con le determinazioni come descritto nel procedimento.

SOLUZIONI MADRE SINGOLO ELEMENTO (N-NH₄ e P-PO₄)

N1 in matraccio da 1000 mL
fissato prima di portare a volume con 1000 µL di HCl 10%
 $0,76378 \text{ g NH}_4\text{Cl in } 1000 \text{ mL} = 200 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$

N2 in matraccio da 200 mL
fissato prima di portare a volume con 200 µL di HCl 10%
10,0 mL madre N1 in 200 mL = 10 mg N-NH₄ L⁻¹

P1 in matraccio da 1000 mL
fissato prima di portare a volume con 1000 µL di HCl 10%
 $0,87874 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ in } 1000 \text{ mL} = 200 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$

P2 in matraccio da 500 mL
fissato prima di portare a volume con 500 µL di HCl 10%
5 mL madre P1 in 500 mL = 2 mg P-PO₄ L⁻¹

L'aggiunta dell'acido cloridrico 10% prima di portare a volume acidifica le madri N1, N2, P1 e P2 al valore di circa pH 3, rendendo queste soluzioni conservabili per circa sei mesi.

STANDARD N-NH₄ e P-PO₄ per i metodi N690_L e PO4_ISE

Gli *standard* vengono preparati partendo dalle soluzioni madre precedentemente descritte per diluizione in matraccio da 200 o da 100 mL; lo schema delle diluizioni è il seguente.

	S2 L	S3 L	S4 L	S5 L	S6 L	S7 L
Matraccio	200 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Madre N1	-	-	-	400 µL	600 µL	750 µL
Madre N2	1000 µL	1000 µL	4000 µL	-	-	-
Madre P1	-	-	-	-	100 µL	200 µL
Madre P2	2000 µL	1500 µL	3000 µL	5000 µL	-	-
mg N L⁻¹	0,050	0,100	0,400	0,800	1,200	1,500
mg P L⁻¹	0,020	0,030	0,060	0,100	0,200	0,400

STANDARD N-NH₄ per il metodo N690_H

Gli *standard* impiegati per il metodo dell'ammonio 1-5 ppm sono a singolo elemento e si preparano a partire dalla soluzione madre N1, la cui preparazione è stata precedentemente descritta. Lo schema di preparazione è il seguente:

	S2 H	S3 H	S4 H	S5 H	S6 H
Matraccio	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Madre N1	500 µL	1000 µL	1500 µL	2000 µL	2500 µL
mg N L⁻¹	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000

Gli *standard* da S2 La S4 L sono utilizzabili per una settimana; gli altri possono essere utilizzati per due o tre settimane; tutti gli *standard* si conservano a temperatura ambiente in recipienti da 125 mL in policarbonato con tappo a vite e bocca larga di facile accesso per il prelievo; ogni recipiente verrà utilizzato sempre e solo per quello *standard*.

Il pH di questi *standard* ha caratteristiche acide, ed indicativamente compreso tra pH 3,5 per lo S4 L e pH 4.7 per lo S6 L.

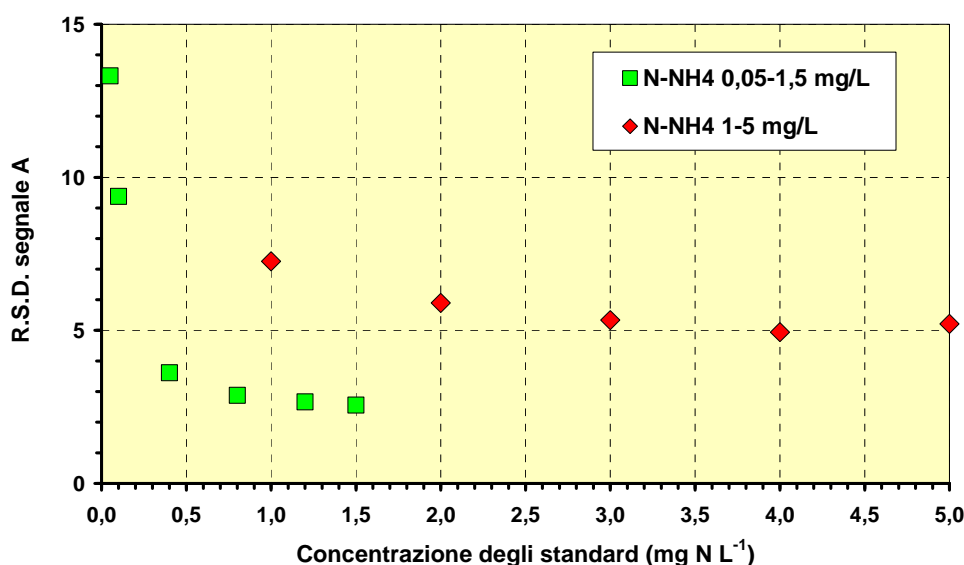
La stabilità della risposta analitica è stata valutata dall'archivio di tutti i segnali ottenuti dagli *standard* utilizzati per le calibrazioni, eseguite con questo metodo sull'analizzatore SEAL AQ2 da aprile 2006 a dicembre 2007.

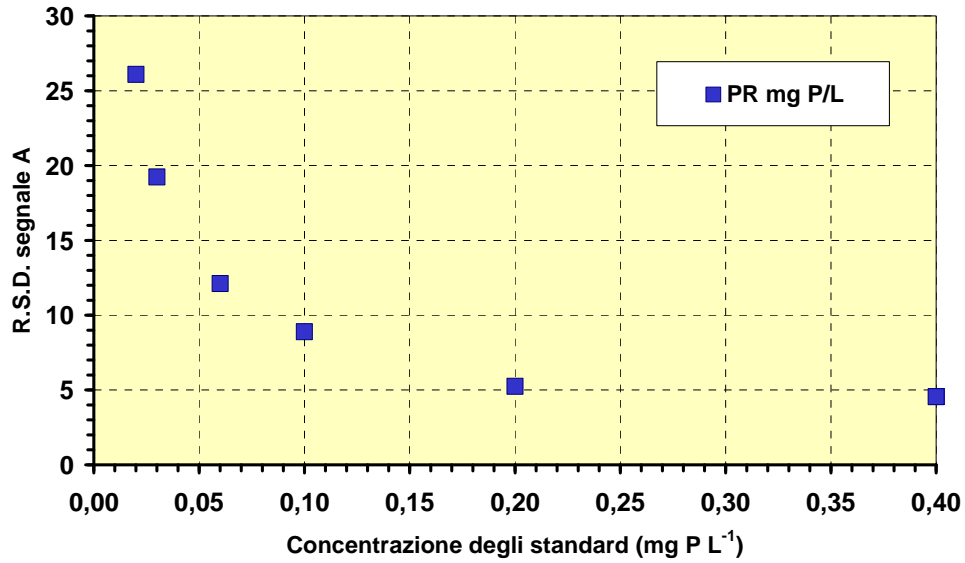
I valori di assorbanza media ($u A$) ottenuti per ogni *standard* vengono riportati nelle sottostanti tabelle e figure assieme alla loro variabilità espressa come deviazione *standard* relativa (R.S.D.). Si noti il tipico andamento in diminuzione con l'aumentare della concentrazione; per l'azoto ammoniacale 0,05 – 1,5 mg N L⁻¹ i valori di R.S.D. decrescono sensibilmente dal 10-15 % per le basse concentrazioni (0,05-0,1 mg N L⁻¹) al 4-3 % per le altre concentrazioni, mentre per l'intervallo 1 – 5 mg N L⁻¹ decrescono da 7 al 5 %. L'elevata variabilità del bianco (S1 L ed H) è dovuta ai bassi valori dell'assorbanza ed è considerata normale per questi livelli di segnale.

<i>Standard</i> mg N L ⁻¹	S1 L 0,000	S2 L 0,050	S3 L 0,100	S4 L 0,400	S5 L 0,800	S6 L 1,200	S7 L 1,500
u A media	0,0132	0,0534	0,0928	0,3308	0,6249	0,9072	1,0973
R.S.D.	35	13	9	4	3	3	3
n° dati	310	165	173	170	107	174	173

<i>Standard</i> mg N L ⁻¹	S1 H 0,00	S2 H 1,00	S3 H 2,00	S4 H 3,00	S5 H 4,00	S6 H 5,00
u A media	0,0301	0,1907	0,3477	0,5008	0,6490	0,7879
R.S.D.	31	7	6	5	5	5
n° dati	82	90	91	90	88	90

<i>Standard</i> mg P L ⁻¹	S1 L 0,000	S2 L 0,020	S3 L 0,030	S4 L 0,060	S5 L 0,100	S6 L 0,200	S7 L 0,400
u A media	-0,0011	0,0051	0,0090	0,0216	0,0392	0,0859	0,1765
R.S.D.	80	26	19	12	9	5	5
n° dati	320	211	209	216	219	224	226





Le equazioni delle regressioni ottenute per ciascun intervallo analitico dai valori riportati nelle precedenti tabelle, sono qui riportate assieme ai coefficienti di correlazione (r^2).

Intervallo analitico 0,015 – 1,500 mg N L⁻¹ regressione quadratica con bianco (S1 L)

$$\text{mg N L}^{-1} = 1,195 A + 0,166 A^2 - 0,014 \quad r^2 = 0,999970$$

Intervallo analitico 0,05 – 5,00 mg N L⁻¹ regressione quadratica con bianco (S1 H)

$$\text{mg N L}^{-1} = 5,980 A + 0,731 A^2 - 0,175 \quad r^2 = 0,999974$$

Intervallo analitico 0,015 – 0,400 mg P L⁻¹ regressione lineare con bianco (S1 L)

$$\text{mg P L}^{-1} = 2,223A + 0,009 \quad r^2 = 0,999439$$

ELABORAZIONE E TRASCRIZIONE DEI RISULTATI

Al termine dell'analisi di una sequenza analitica si deve procedere al seguente controllo ed elaborazione dei risultati ottenuti:

- controllo delle calibrazioni verificando la qualità della regressione e la corrispondenza delle letture ottenute nella calibrazione iniziale e finale, con lo scopo di evidenziare eventuali derive strumentali. Gli *standard* scartati si eliminano durante l'operazione di *Acceptance*




Acceptance

, cancellandoli con *cancel*



Cancel

e rielaborando i risultati evidenziando la colonna dei

dati e premendo l'icona *Rework by test* . Per accattare definitamene i dati dell'analisi bisogna cliccare sull'icona *Accept all*, in questo modo la sequenza può essere stampata ed archiviata;

- verifica dell'accordo tra concentrazioni nominali degli *standard* e valore ottenuto dalla calibrazione questi valori non devono scostarsi troppo dal valore nominale con scostamenti entro 3-5 %, eliminarli se se superano il 15 %;
- confronto tra le assorbanze degli *standard* della sequenza con il valore medio delle assorbanze calcolato dai segnali ottenuti nella serie storica delle precedenti calibrazioni archiviata in foglio Excel; questo confronto permette di valutare la confrontabilità degli *standards* nel tempo e la stabilità delle calibrazioni prodotte dall'analizzatore AQ2, al fine di valutare anche la frequenza ottimale di calibrazione;
- 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 e per il calcolo degli LOD ed LOQ;
- verifica 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 ottenuti nei periodo precedentemente considerato nella carta di controllo;
- stampa del *report* utilizzando l'impostazione *ISE Report* e trascrivendo poi sulle schede dei campioni i dati espressi in concentrazione mg L^{-1} arrotondando al terzo decimale corrispondente al $\mu\text{g L}^{-1}$.

SPEGNIMENTO DELLO STRUMENTO E LAVAGGIO CELLE DI REAZIONE E VIALS

Terminate le determinazioni si consiglia di estrarre al più presto le celle di reazione dal comparto riscaldato a 37 °C al fine di evitare l'evaporazione del colorante formatosi con formazione di depositi poi difficilmente asportabili. Le celle di reazione devono essere subito risciacquate in acqua deionizzata e lasciate immerse per 12-24 ore; si consiglia di svuotare anche i vials risciacquandoli ed immergendoli anch'essi in acqua deionizzata. Prima del riutilizzo risciacquarli bene in acqua deionizzata ed asciugarli in stufa ventilata per almeno 12 ore.

Prima di spegnere l'analizzatore eseguire un lavaggio della cuvetta utilizzando la soluzione esterna per il lavaggio alcalino (NaOH – Na₂EDTA) utilizzando il comando dal menù *settings* ->*maintenance* ->*cuvette* ->*extra wash* (per eseguire l'*extra wash* bisogna lasciare inserite le capsule di reazione), in seguito lavare almeno una volta con acqua ultrapura o eseguire un il *daily startup*.

Togliere i reattivi riponendoli in cella frigorifera asciugando l'eventuale condensa formatasi nel vano refrigerato porta reattivi, svuotare il contenitore da 5 litri dello scarico.

Al termine di queste operazioni uscire dal *software* AQ2 e spegnere lo strumento.

Riferimenti bibliografici.

Fresenius W.,K.E. Quentin and W. Schneider (Eds.) 1988. Water Analysis. Springer-Verlag, Berlin. 804 pp.

SEAL Applications AQ2 Method No UKAS-500-A Rev. 2. 2005. Ammonia-N in drinking and surface waters, and domestic and industrial wastes. Range 0.1 – 1.0 mg N L⁻¹.

SEAL Applications AQ2 Method No UKAS-501-A Rev. 2. 2005. Ammonia-N in drinking and surface waters, and domestic and industrial wastes. Range 2 – 10 mg N L⁻¹.

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.