



INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO PESQUERO.

INFORME DE INVESTIGACIÓN

Número

101212-13

Páginas

101214

Fecha de aprobación

27 MAR 2013

Dirección

DIRECCIÓN DE PESQUERIAS PELAGICAS Y MEDIO AMBIENTE

Programa / Gabinete

Ambiente Marino

Actividad

MAR B (Proyecto Marea Roja) y Anexo a DPC 4 y DPC 18 (Proyecto DiPlamCC).

CUARTO EJERCICIO INTERNACIONAL DE INTERCOMPARACIÓN DE ANÁLISIS DE NUTRIENTES: "THE 2012 INTER-COMPARISON STUDY OF REFERENCE MATERIAL OF NUTRIENTS (RMNS) IN SEAWATER". RESULTADOS Y CONCLUSIONES DE LA PARTICIPACIÓN DEL LABORATORIO DE PRODUCCIÓN PRIMARIA Y BIOTOXICIDAD.

Ver el Resumen en el cuerpo del Informe

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR

Institución

Cargo

PREPARADO POR

Firma:

CARIGMAN, MARIO
Nombre: OSVALDO

APROBADO POR

Jefe de Programa / Gabinete

Director de área
Lic. DANIEL ALBERTUCHE
J/C Dirección
Pesq. Pelágicas y Medio Ambiente

Dr. OTTO C. WÖHLER
DIRECTOR
Dirección Nacional de Investigación
INIDEP

Director del INIDEP



Cuarto Ejercicio Internacional de Intercomparación de análisis de nutrientes: “The 2012 Inter-comparison Study of Reference Material of Nutrients (RMNS) in Seawater”. Resultados y conclusiones de la participación del Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad.

Carignan Mario Osvaldo

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

Resumen

La elevada exactitud y precisión requerida en la determinación de nutrientes en agua de mar y la necesidad de obtener valores con mínima discrepancia entre análisis replicados, realizados por diferentes laboratorios para una misma muestra, ha mostrado la necesidad de contar con materiales de referencia internacional para estas determinaciones. En el año 2003, el Instituto de Investigación Meteorológica de Japón (MRI) comenzó una serie de estudios con material de referencia para nutrientes, que incluía su preparación a partir de agua de mar natural y el análisis de los mismos a través de comparaciones entre distintos laboratorios. En el año 2012, el MRI realizó el cuarto ejercicio de intercomparación analítica en el cual participaron 69 laboratorios internacionales, siendo uno de ellos el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad del INIDEP. El compromiso asumido incluyó analizar en cinco muestras de referencia, utilizando la metodología de análisis automático por flujo segmentado, la concentración de los iones nitrato, nitrito, fosfato y silicato, considerados como micronutrientes esenciales disueltos en agua de mar y cuya determinación es de uso general en oceanografía química. El uso de esta metodología es práctica corriente en el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad desde el año 1980, siendo esta la primera oportunidad de confrontar nuestra práctica analítica con el resto de la comunidad científica asociada al ejercicio de intercomparación. Las metodologías utilizadas fueron las de uso corriente en el INIDEP, las cuales son, con modificaciones menores, aquellas propuestas por los coordinadores del ejercicio de intercomparación. Los resultados obtenidos mostraron que los valores informados por nuestro laboratorio, están centrados próximos al valor medio de la distribución que resulta del análisis de los valores obtenidos por todos los laboratorios participantes. El error asociado a cada una de las diferentes determinaciones fue muy bajo, indicando además, una elevada precisión en la respuesta analítica de las metodologías en uso.

La exactitud y precisión obtenidas en las determinaciones realizadas, indican la importancia y necesidad del uso sostenido en el tiempo de Buenas Prácticas de Laboratorio, tanto en el tratamiento de la muestra como en su procesamiento analítico posterior, así como la necesidad de utilizar material de referencia internacional que permita la intercomparabilidad de los datos reportados.

Introducción:

El estudio actual en oceanografía química, no es solo describir la distribución de las especies químicas conocidas como nutrientes, sino dar también alguna información sobre las variaciones en micro y macro escalas espaciales y temporales de los componentes en cuestión. El trabajo analítico involucrado en su determinación, requiere ser realizado dentro de altos estándares de precisión y exactitud para poder detectar las pequeñas, aunque significantes, variaciones en la distribución de estos iones, cuyas concentraciones se encuentran muchas veces cerca del límite de detección de métodos analíticos sencillos. Estos métodos están basados en la ley física de Lambert-Beer que describe la relación existente entre la concentración de una determinada especie iónica en solución y el color desarrollado mediante una reacción específica y cuantitativamente eficiente. Concurrentemente, la cantidad de muestra necesaria para el análisis de un constituyente individual, debe ser tan pequeña como sea posible debido al tamaño limitado de los equipos de muestreo y al requerimiento de que, en la mayoría de los casos, a partir de la

Cuarto ejercicio internacional de intercalibración de análisis de nutrientes.



misma muestra varios parámetros químicos y biológicos son determinados por diferentes especialistas.

La variabilidad espacio-temporal de estos constituyentes, ha mostrado ser de gran magnitud en diversos lugares del océano. Esta variabilidad solo puede ser estudiada realizando muestreos espaciados muy cercanamente, significando esto el análisis de un número elevado de muestras individuales, que no puede ser resuelto en un tiempo realista sin la utilización de procedimientos automáticos. Muchas de estas dificultades han sido resueltas a partir de la aplicación de métodos automáticos para análisis químicos del agua de mar.

Desde el final de la década 1960-1970, el uso de analizadores automáticos de nutrientes se extendió a toda la comunidad de químicos marinos. Estos sistemas han evolucionado hasta hoy para convertirse en el método elegido para la determinación de nutrientes en agua de mar. Sin embargo, existe evidencia que la calidad de los datos reportados en diferentes lugares del mundo utilizando estas técnicas, no es homogénea y que serios errores sistemáticos ocurren cuando un sistema es utilizado como una “caja negra” por personal poco entrenado.

Por lo tanto, para lograr datos de alta calidad, es esencial coordinar esfuerzos entre distintos laboratorios analíticos con el fin de conseguir una aproximación metodológica general basada en buenas prácticas de análisis de nutrientes por métodos automáticos.

El “Global Ocean Ship-Based Hydrographic Investigation Program” (GO-SHIP) (<http://www.go-ship.org>) es un programa de IOC-UNESCO creado en el año 2007 con el objeto de reunir a todos los científicos interesados en el estudio de la oceanografía física, el ciclo del carbono, la biogeoquímica marina y los ecosistemas, para desarrollar una red global de datos hidrográficos de alta calidad, sostenida en el tiempo (Hood, M., 2009).

Uno de los objetivos de GO-SHIP, es realizar ejercicios de intercalibración periódicos entre laboratorios de todo el mundo siguiendo los criterios de exactitud y precisión propuestos por el Programa Hidrográfico del World Ocean Circulation Experiment (WOCE) (Hydes *et al.*, 2010). Pero para desarrollar una matriz de datos globales comparables, es necesario contar con estándares certificados de nutrientes que sean utilizados de manera general por todos los laboratorios. En el año 2009 se creó el “Joint ICES-IOC Study Group on Nutrient Standards (SGONS)” cuya tarea fue desarrollar materiales de referencia para la determinación de nutrientes (Aoyama *et al.*, 2012). Este desarrollo y la organización de los experimentos de intercalibración son actualmente conducidos por el Meteorological Research Institute de Japón (MRI). Este Instituto realizó en los años 2003 y 2006 dos ejercicios internacionales de determinación de nutrientes fuera del marco de GO-SHIP. El tercer y el cuarto ejercicio internacional se desarrollaron durante los años 2008 y 2012 respectivamente.

A finales del año 2011, el laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad de INIDEP, a través del Coordinador Jefe del SGON (Dr. Michio Aoyama, MRI, Japon), fue invitado para participar en el “2012 Inter-comparison Study of Reference Material of Nutrients (RMNS) in Seawater”, siendo el analista responsable quien produce este informe (Mario Carignan). El compromiso de cada asociado al ejercicio consistió en analizar y reportar las concentraciones halladas de nitrato, nitrito, fosfato y silicato disueltos en cinco muestras de material de referencia preparadas por el Meteorological Research Institute, Japón, cuya concentración no fue informada a los analistas.

En este informe se presenta una breve descripción de cada una de las metodologías utilizada en el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad, los resultados analíticos obtenidos y su comparación con los reportados por los demás participantes del ejercicio. Los valores hallados en nuestro laboratorio son cercanos al valor medio calculado para cada constituyente obtenido a partir de las mediciones realizadas por todos los laboratorios participantes. Este resultado, asegura una elevada calidad de los datos obtenidos empleando la buena práctica analítica que desarrollamos en el laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad de INIDEP .



Materiales y métodos

El total de participantes (Tabla 1) alcanzó el número de 67 laboratorios (6 de Latinoamérica), algunos de los cuales corresponden a Institutos u organizaciones con un alto prestigio histórico (CSIRO, BIO, IFREMER, AWI, PML, Scripps, NOAA, WHOI, etc.).

Tabla 1. Laboratorios participantes del 2012 Inter-comparison Study of Reference Material of Nutrients (RMNS) in seawater, y analistas responsables.

Lab.	Analista	Afiliación	País
1	Mario Carignan	Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)	Argentina
2	Daniel Atilio Molina	Servicio de Hidrografía Naval, Laboratorio de química y contaminación marina	Argentina
3	David Terhell	CSIRO Marine and Atmospheric Research	Australia
4	Gary Prove	Queensland Health Forensic and Scientific Services	Australia
5	Marc Knockaert	Department of MARCHEM, Management of Unit of the North Sea Mathematical Models, Royal Belgian Institute of Natural Sciences (MUMM)	Belgium
6	Steven Bell	Bermuda Institute of Ocean Sciences	Bermuda
7	Elisabete de Santis Braga	Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços nos Oceanos (LABNUT-IOUSP), Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo	Brazil
8	Rodolfo Paranhos	Institute of Biology, Rio de Janeiro Federal University	Brazil
9	Carol Anstey	Fisheries and Oceans Canada Bedford Institute of Oceanography	Canada
10	Chris Payne	University of British Columbia, Department of Earth & Ocean Sciences	Canada
11	Janet Barwell-Clarke, Wendy Richardson	Institute of Ocean Sciences	Canada
12	Ivanice Monteiro	Instituto Nacional de Desenvolvimento das Pescas	Cape Verde
14	Minhan Dai	State Key laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University	China
15	Zengxia Zhao	Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences	China
16	Yingying Hu	National Marine Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration	China
17	Jun Sun	College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology	China
18	Martin M. Larsen, Dorete W. Jensen	National Environmental Research Institute-Aarhus University	Denmark
19	Roger Kerouel	Institut Français de Recherché Pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER)	France



20	Emilie Rabiller, Olivier Pierre- Duplessix	Institut Français de Recherché Pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire Environnement Ressources de Normandie (LERN)	France
21	Olivier Grosso	Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Centre d'Océanologie de Marseille-Laboratoire d'Océanographie Physique et Biogéochimique	France
22	Pascal Morin	Centre national de la recherche scientifique (CNRS) & Univ. Pierre et Marie Curie, Roscoff	France
23	Patrick Raimbault	Mediterranean Institute of Oceanology (MIO) Campus de Luminy	France
24	Monika Schütt	Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry	Germany
25	Toste Tanhua	GEOMAR Helmholtz Centre for Marine Research	Germany
26	Günther Nausch	Leibniz-Institute for Baltic Sea Research Warnemünde (IOW)	Germany
27	Sieglinde Weigelt-Krenz	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH), Laboratorium Sülldorf	Germany
28	Kai-Uwe Ludwichowski	Alfred-Wegener-Institut for Polar - and Marine Research	Germany
29	Sólveig Rósa Ólafsdóttir	Marine Research Institute	Iceland
30	Muhamed Ashraf P	Central Institute of Fisheries Technology	India
31	V.V.S.S. Sarma	National Institute of Oceanography	India
32	Nurit Kress	Israel Oceanographic & Limnological Res, National Institute of Oceanography	Israel
33	Michele Giani, Claus Falconi	Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale	Italy
34	Hiromi Kasai	Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency	Japan
35	Takeshi Miyao	Japan Meteorological Agency, Marine Division	Japan
36	Akihiko Murata, Minoru Kamata	1: Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC) 2: Marine Works Japan (MWJ)	Japan
37	Takeshi Yoshimura	Environmental Science Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry	Japan
38	Hiroaki Saito	Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency	Japan
39	Jan van Ooijen	Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ)	Netherlands
40	Mike Crump	National Institute of Water and Atmospheric Research (NIWA)	New Zealand
41	Are Olsen	Institute of Marine Research (IMR)	Norway
42	Pavel Tishchenko	Hydrochemistry Laboratory, Pacific Oceanological Institute, FEB RAS	Russia
43	Vladimir Shulkin	Pacific Geographical Institute Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences	Russia



44	Nabil Fayad	King Abdullah University of Science and Technology (KAUST)	Saudi Arabia
45	Howard Waldron	University of Cape town	South Africa
46	Dong Jin Kang	Oceanographic Measurement & Instrument Calibration Service Center, Korean Ocean Research & Development Institute	South Korea
47	Suk Hyun Kim	Korea Ocean Research & Development Institute	South Korea
48	Marta Álvarez	Spanish Institute of Oceanography (IEO) A Coruña centre	Spain
49	Sinhué Torres-Valdés	Ocean Biogeochemistry and Ecosystems National Oceanography Centre, Southampton	UK
50	Malcolm Woodward	Plymouth Marine Laboratory	UK
51	Alison Taylor	Marine Scotland - Science	UK
52	Claire Mahaffey	University of Liverpool	UK
53	Clemens Engelke	Scottish Environment Protection Agency – Marine Chemistry	UK
54	Tim Brand	Scottish Association for Marine Science	UK
55	Fay Couceiro	School of Earth and Environmental Science, University of Portsmouth	UK
56	Susan Becker	Scripps Institution of Oceanography	USA
57	Jia-Zhong Zhang	Atlantic Oceanographic and Meteorological Laboratory (AOML), National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)	USA
58	Cristopher Schmidt	Geochemical and Environmental Research Group, Texas A&M University	USA
59	Marguerite Blum	Monterey Bay Aquarium Research Institute	USA
60	Katherine Kroglund	School of Oceanography, University of Washington	USA
61	Calvin Mordy	National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) / Pacific Marine Environmental Labs in Seattle	USA
63	Paul Henderson	Woods Hole Oceanographic Institution	USA
64	Kathleen Ruttenberg	University of Hawaii	USA
65	Susan Curless	Hawaii Ocean Time-series	USA
66	Joe C. Jennings, Jr.	College of Oceanic and Atmospheric Sciences, Oregon State University	USA
67	Ethan Norris	Raytheon Polar Services	USA
68	Georges L. Paradis	Marine Science Institute, University of California Santa Barbara	USA
69	Aristide Márquez	Oriente University, Oceanographic Institute of Venezuela, Department of Oceanography. Laboratory of nutritious elements	Venezuela

Muestras de referencia



Las cinco muestras utilizadas en el análisis de cuatro especies iónicas de interés en Oceanografía Química (Nitrato, Nitrito, Fosfato y Silicato) fueron provistas por el Meteorological Research Institute, Japón. Las mismas fueron enviadas en condiciones estériles y envasadas al vacío en sobres sellados con el fin de mantener su integridad como material de referencia. Las muestras se enviaron numeradas, informándose para cada una de ellas su salinidad y rango de concentración de cada especie a fin de permitir el ajuste de cada metodología (Tabla 2). Las mismas permanecieron selladas a 4 °C y solo fueron abiertas en el momento del análisis luego de dejar que su temperatura alcance la temperatura del laboratorio. El análisis de las mismas se realizó por triplicado, informándose la concentración hallada ($\mu\text{moles L}^{-1}$ y $\mu\text{moles Kg}^{-1}$) y el error asociado a la determinación de cada analito

Tabla 2. Salinidad y rango de concentración de las muestras testigo

	Salinidad (PSU)	Nitrito ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Silicato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)
Muestra 1	34.45 \pm 0.01	< 0.5	17 - 25	1.3 - 1.9	48 - 72
Muestra 2	34.45 \pm 0.01	< 0.5	33 - 48	2.4 - 3.3	110 - 160
Muestra 3	34.27 \pm 0.01	< 0.5	23 - 35	1.8 - 2.6	48 - 72
Muestra 4	34.70 \pm 0.01	< 0.5	< 1.0	< 1.0	< 5.0
Muestra 5	34.45 \pm 0.01	< 0.5	33 - 48	2.4 - 3.3	110 - 160

Calibración del material volumétrico utilizado y Preparación de estándares analíticos.

El Sistema de análisis por flujo segmentado, determina la concentración de una especie dada en términos de su masa por unidad de volumen (o peso) de solución (a la temperatura de análisis) relativo a una serie de soluciones estándares, de concentración conocida. Estos estándares primarios son preparados utilizando sales de grado analítico de los iones en cuestión y agua de grado ultrapuro. Para lograr mediciones de alta calidad las sales deben ser secadas previamente a su pesada en balanzas analíticas a temperatura controlada, teniendo en cuenta el empuje realizado por el aire del medio. Su disolución en agua ultrapura hasta alcanzar un volumen determinado y las posteriores diluciones (estándares secundarios y de trabajo), debe ser realizada en material volumétrico previamente calibrado gravimétricamente. Estos pesos también deben ser corregidos por el empuje del aire (peso en vacío) y la densidad del agua a la temperatura de trabajo.

En nuestro caso particular, el material volumétrico utilizado fue de polimetilpenteno (PMP) o vidrio Pirex, pero la mayor estabilidad de este último material respecto a la expansión térmica, lo hizo recomendable para la preparación de estándares.

El efecto del empuje del aire durante la determinación gravimétrica es una de las fuentes principales de error si no se aplica la corrección correspondiente. El empuje actúa tanto sobre la masa de material a medir como sobre las pesas que forman parte del sistema de contrapesos de una balanza analítica. Debido a que el material de las pesas (acero inoxidable) tiene una densidad diferente al vidrio Pirex utilizado en el material volumétrico y también al agua y las sales sólidas utilizadas en la preparación de estándares, el empuje recibido es diferente y la corrección correspondiente debe ser introducida aplicando la siguiente ecuación:

$$m = w \left(\frac{1 - \rho(\text{aire}) / \rho(\text{pesas})}{1 - \rho(\text{aire}) / \rho(\text{muestra})} \right)$$



Donde m es la masa de una muestra de peso w y ρ la densidad. En nuestro caso la densidad del aire a presión = 1 atmósfera (a nivel del mar) y temperatura = 298.15 K (25 °C) es aproximadamente igual a $0.00120 \text{ g cm}^{-3}$ y la densidad del acero inoxidable 8.0000 g cm^{-3} . Los resultados correspondientes a la calibración del material volumétrico utilizado y su correspondiente corrección gravimétrica (muestra = agua) se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinación de los valores de volumen exacto correspondientes al material volumétrico utilizados en el experimento.

Matraz (Pirex)	V_{nominal} (mL)	w (g)	Temperatura (K)	$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ (g cm^{-3})	m (g)	$V_{\text{corregido}}$ (mL)
1	100	99.6656 ± 0.0479 (n=10)	294.65	0.99797	99.7707	99.9737
2	100	99.4609 ± 0.0405 (n=10)	294.65	0.99797	99.5658	99.7684
3	100	99.5165 ± 0.0453 (n=10)	294.65	0.99797	99.6211	99.8238
4	100	99.4287 ± 0.0480 (n=10)	294.65	0.99797	99.5332	99.7357
5	100	99.5453 ± 0.0815 (n=10)	294.65	0.99797	99.6499	99.8526
6	100	99.3232 ± 0.0505 (n=10)	294.65	0.99797	99.4276	99.6299
7	200	200.9305 ± 0.0821 (n=10)	297.65	0.99726	201.1417	201.6943
8	250	247.7289 ± 0.0416 (n=10)	298.15	0.99713	247.9893	248.7031
9	1000	996.08 ± 0.16 (n=10)	297.15	0.99738	997.1271	999.75

Matraz (PMP)	V_{nominal} (mL)	w (g)	Temperatura (K)	$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ (g cm^{-3})	m (g)	$V_{\text{corregido}}$ (mL)
1	100	99.8623 ± 0.0455 (n=10)	296.15	0.99762	99.9673	100.2058
2	100	99.8553 ± 0.0428 (n=10)	296.15	0.99762	99.9603	100.1987
3	100	100.0234 ± 0.0447 (n=10)	296.15	0.99762	100.1286	100.3674
4	50	49.8478 ± 0.0258 (n=10)	296.15	0.99762	49.9002	50.0192
5	50	50.0403 ± 0.0249 (n=10)	296.15	0.99762	50.0929	50.2124
6	1000	997.64 ± 0.84 (n=10)	297.15	0.99738	999.69	1001.31

Pipeta (Pirex)	V_{nominal} (mL)	w (g)	Temperatura (K)	$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ (g cm^{-3})	m (g)	$V_{\text{corregido}}$ (mL)
1	2	1.9942 ± 0.0075 (n=10)	295.15	0.99786	1.9915	1.9958



2	1	1.0144 ± 0.0041 (n=10)	295.15	0.99786	1.0155	1.0176
3	1	1.0364 ± 0.0039 (n=10)	295.15	0.99786	1.0375	1.0397
4	4	4.0048 ± 0.0066 (n=10)	294.65	0.99797	4.0090	4.0172
5	10	9.9816 ± 0.0112 (n=10)	294.65	0.99797	9.9921	10.0124
6	2	1.9986 ± 0.0063 (n=10)	294.65	0.99797	2.0007	2.0048
7	3	2.9968 ± 0.0048 (n=10)	294.65	0.99797	2.9999	3.0061
8	4	4.0042 ± 0.0091 (n=10)	294.65	0.99797	4.0084	4.0166
9	3	3.0041 ± 0.0068 (n=10)	294.65	0.99797	3.0073	3.0134
10	5	4.9843 ± 0.0043 (n=10)	294.65	0.99797	4.9945	5.0047
11	20	19.8768 ± 0.0184 (n=10)	294.65	0.99797	19.9175	19.9580

La preparación de estándares primarios para emplear en una calibración, esta basada en el uso de materia químicamente pura y libre de humedad. La exactitud en su preparación, asegurará una calibración confiable del equipo de medición. Esta tarea requiere la dilución serial de cada estándar primario en diferentes rangos de estándares secundarios o de trabajo, cuya concentración debe ser escogida de acuerdo con el rango de concentración esperado para las muestras naturales. En nuestro caso, para la preparación de los estándares primarios de nitrato, nitrito y fosfato se utilizó material volumétrico Pirex gravimétricamente calibrado.

Para el caso particular del ion silicato, dado que el vidrio Pirex esta constituido principalmente por borosilicato, para evitar el proceso de contaminación originado a partir del material volumétrico, se utilizó en la preparación del estándar primario y sus diluciones, matraces de polimetilpenteno (PMP). En la Tabla 4 se muestran los iones determinados, la sal de grado analítico utilizada para preparar el estándar primario, su peso nominal, su masa corregida considerando el empuje y su concentración final.

Tabla 4. Valores de concentración de los estándares primarios utilizados en el experimento.

Ion determinando	Sal STD primario	M (g mol ⁻¹)	w (g)	ρ (g cm ⁻³)	m (g)	V matraz (mL)	Conc (µM)
Nitrito	NaNO ₂	69.00	0.3400	2.168	0.3401	999.75	4930.2353
Nitrato	KNO ₃	101.11	0.5051	2.109	0.5053	999.75	4998.7946
Fosfato	KH ₂ PO ₄	136.09	0.6840	2.338	0.6844	999.75	5030.3001
Silicato	Na ₂ SiF ₆	188.06	0.9398	2.679	0.9401	1001.31	4992.3855



Breve descripción de los fundamentos analíticos inherentes a cada metodología empleada.

Nitrato + Nitrito: Nitrato + Nitrito y Nitrito son analizados siguiendo una modificación del método de Grasshoff *et al.* (1983). El ion nitrato contenido en la muestra de interés es reducido a nitrito en una columna de cadmio recubierto con cobre en presencia de NH_4Cl ($\text{pH} = 8.5$). El NH_4Cl actúa complejando el ion Cd^{2+} generado en la reacción evitando su precipitación como $\text{Cd}(\text{OH})_2$ y manteniendo el potencial redox a un valor constante. El nitrito formado por reducción de nitrato y el presente inicialmente en la muestra, reaccionan con sulfanilamida ácida generando iones diazonio. Estos iones finalmente reaccionan con N-1-naftil-etilendiamina para producir un compuesto azoico de color rojo cuya absorción es proporcional a la concentración de Nitrato + Nitrito. Con la reducción de nitrato a nitrito, ambas especies reaccionan y son medidas simultáneamente; sin reducción, solo nitrito reacciona. De tal manera, para el análisis de este último ion no participa el proceso redox y no es necesaria la presencia de NH_4Cl . La concentración final de nitrato es obtenida por diferencia entre ambas concentraciones.

Fosfato: El método utilizado para el análisis de este ion es una modificación del procedimiento original de Murphy y Riley (1962). Ácido molíbdico es agregado a la muestra para formar ácido fosfomolíbdico el cual es reducido a ácido fosfomolibdoso de color azul, utilizando ácido L-ascórbico como reductor y tartrato de potasio y antimonio como catalizador.

Silicato: El método utilizado es análogo al descrito para fosfato y es esencialmente el desarrollado por Grasshoff y Erhardt (1983). El agregado de ácido molíbdico lleva a la formación de ácido silicomolíbdico, el cual es finalmente reducido por ácido L-ascórbico a ácido silicomolibdoso de color azul. La inhibición de la reacción paralela entre fosfato y el ácido molíbdico se produce por el agregado de ácido oxálico.

Calibración de las diferentes metodologías de cuantificación

La calibración del analizador debe ser realizada para cada corrida analítica. Es necesario tomar en cuenta que existen entre diferentes análisis, corrimientos en la sensibilidad del sistema debido a cambios en algunas condiciones tales como: 1) la temperatura del ambiente de trabajo, 2) el envejecimiento de los reactivos utilizados y 3) en el caso particular de la determinación de nitrato, la variación en la eficiencia de la columna reductora del par electroquímico Cd-Cu.

La respuesta relativa del sistema y su calibración son generalmente evaluados por: 1) medición de una serie de estándares secundarios al comienzo de cada corrida, 2) medición a intervalos regulares de la posición de la "línea de base" y 3) la medición repetitiva a intervalos regulares de tiempo de un estándar secundario.

Sin embargo, previamente a comenzar el trabajo analítico sobre muestras de concentración desconocida es necesario evaluar la linealidad metodológica para las condiciones de trabajo; siendo particularmente relevante en el caso donde se evalúan muestras de elevada concentración de los analitos en cuestión. Esto está relacionado directamente con el hecho de que toda medición colorimétrica está regida por la Ley de Lambert-Beer, cuyo comportamiento es lineal dentro de un determinado rango de absorbancias.

En nuestro caso, la linealidad para cada metodología se evaluó a partir de la preparación de estándares de trabajo de concentración creciente, su análisis (por triplicado) y el ajuste por mínimos cuadrados de la relación existente entre la concentración y la señal colorimétrica expresada en milivolts (mV)

Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución serial de las soluciones estándar primarias obtenidas a partir de sales de grado analítico de los iones de interés y sus valores de concentración se presentan en la Tabla 5.



Tabla 5. Valores de concentración de los estándares de trabajo utilizados en la calibración metodológica, el estudio de su linealidad y el cálculo de concentración de las muestras testigo.

Ion determinando	Rango (μM)	Conc. STD 1°(μM)	Conc. STD 2°(μM)	$V_{\text{STD } 2^\circ}$ (mL)	V_{final} (mL)	Conc. STD trabajo (μM)
Nitrito	0 - 1.5	4930.2353	24.8740	1.0176	99.9737	0.2532
		4930.2353	24.8740	1.9958	99.7684	0.4976
		4930.2353	24.8740	3.0134	99.8238	0.7509
		4930.2353	24.8740	4.0172	99.7357	1.0019
		4930.2353	24.8740	5.0047	99.6299	1.2495
Nitrato	0 - 1.5	4998.7946	25.2200	1.0176	99.9737	0.2567
		4998.7946	25.2200	1.9958	99.7684	0.5045
		4998.7946	25.2200	3.0134	99.8238	0.7613
		4998.7946	25.2200	4.0172	99.7357	1.0158
		4998.7946	25.2200	5.0047	99.6299	1.2669
	0 - 50	4998.7946	496.2950	1.0176	99.9737	5.0516
		4998.7946	496.2950	1.9958	99.7684	9.9280
		4998.7946	496.2950	3.0134	99.8238	14.9818
		4998.7946	496.2950	4.0172	99.7357	19.9900
		4998.7946	496.2950	5.0047	99.6299	24.9303
		4998.7946	496.2950	19.9580	201.6943	49.4640
Fosfato	0 - 1.25	5030.3001	25.3792	1.0176	99.9737	0.2583
		5030.3001	25.3792	1.9958	99.7684	0.5077
		5030.3001	25.3792	3.0134	99.8238	0.7661
		5030.3001	25.3792	4.0172	99.7357	1.0222
		5030.3001	25.3792	5.0047	99.6299	1.2749



	0 – 4.0	5030.3001	100.5000	1.0176	201.6943	0.5070
		5030.3001	100.5000	1.0176	99.7684	1.0251
		5030.3001	100.5000	1.9958	99.8238	2.0093
		5030.3001	100.5000	3.0134	99.7357	3.0365
		5030.3001	100.5000	4.0172	99.9737	4.0383
Silicato	0 – 5.0	4992.3855	99.6642	1.0176	99.7684	1.0165
		4992.3855	99.6642	2.0342	99.7684	2.0331
		4992.3855	99.6642	3.0134	100.3674	2.9923
		4992.3855	99.6642	4.0172	100.2058	3.9955
		4992.3855	99.6642	5.0047	100.1987	4.9780
	0 - 200	4992.3855	4992.3855	1.0176	201.6943	25.1879
		4992.3855	4992.3855	1.0176	100.2058	50.6982
		4992.3855	4992.3855	1.9958	100.1987	99.4404
		4992.3855	4992.3855	3.0134	100.3674	149.8898
		4992.3855	4992.3855	4.0172	100.2058	200.1422

Determinación de los valores “blanco” de cada metodología.

El “blanco” analítico es el valor medido para la concentración aparente de un ion cuando el mismo no está presente en la muestra. El valor del “blanco” (que puede ser positivo o negativo) es restado al valor medido de concentración de la muestra incógnita para dar el valor neto de concentración de analito en la misma.

Interferencias que contribuyen al valor “blanco”.

a) Contaminación del agua de “línea de base”. Todas las soluciones que se utilizan como línea de base (sea agua pura o agua de mar natural o artificial) tienen el potencial de ser contaminadas durante el proceso de manipulación y almacenaje.

b) Variación en el índice de refracción. La señal colorimétrica es siempre generada por una celda de flujo ópticamente imperfecta. Conforme varía la salinidad (entre muestras o muestra vs agua de línea de base), la señal óptica cambia. Señales transientes pueden presentarse al comienzo y final de los picos de absorbancia cuando la luz incidente es reflejada por la interfase entre el líquido y las burbujas de aire componentes del flujo segmentado o por diferencia de densidades entre interfases de distinta salinidad (Efecto Schlieren).



c) Turbidez. La presencia de partículas suspendidas en la matriz de la muestra, genera dispersión de luz que es observada como cambios en la absorción.

d) Blanco de reactivos. La presencia de contaminantes en los reactivos utilizados puede generar cambios en las propiedades ópticas de los mismos. En el caso del análisis continuo por flujo segmentado, el blanco de reactivos afecta por igual a las muestras y a la línea de base y es usualmente descontado.

Formula general aplicada para el cálculo del valor "blanco".

Primero definiremos los componentes ópticos de las señales de línea de base y picos de las muestras:

RB: blanco de reactivos.

Rib: señal de índice de refracción de la interfase agua de mar-línea de base.

RIs: blanco de índice de refracción de la muestra

Cb: altura (mV) correspondiente a la concentración del determinando en la línea de base.

Cs: altura (mV) correspondiente a la concentración neta del determinando en la muestra.

T: turbidez de la muestra

HS: Altura neta de un estándar de calibración de concentración conocida.

S: Sensibilidad ($HS/[concentración\ del\ estándar]$)

Hb: altura de la línea de base con todos los reactivos agregados.

HbPW₀: altura de línea de base de agua ultrapura con todos los reactivos agregados.

Hb(RIs): altura de la línea de base de agua salina con reactivos de índice de refracción agregados*.

HbPW₀(RIs): altura de línea de base de agua ultrapura con reactivos de índice de refracción agregados*.

*Los reactivos de índice de refracción son todos aquellos utilizados en la reacción analítica menos el reactivo esencial de desarrollo de color.

Siguiendo esta notación podemos expresar la altura de una señal de la siguiente manera:

La altura (mV) de la línea de base es:

$$Hb = Cb + Rb + Rib \quad (1)$$

La altura (mV) para un pico correspondiente a una muestra:

$$Hs = Cs + RB + RIs + T \quad (2)$$

La altura de la señal de una muestra relativa a la línea de base es:

$$Hs_{medida} = Hs - Hb$$

Reemplazando por (1) y (2) tenemos:

$$Hs_{medida} = Cs + Rb + RIs + T - (Cb + Rb + Rib)$$

$$Hs_{medida} = (Cs - Cb) + (RIs - Rib) + T$$

La altura correspondiente a la concentración neta en la muestra es entonces:

$$Cs = Hs_{medida} + Cb - (RIs - Rib + T)$$



C_b es determinado por diferencia entre la señal de línea de base y la señal colorimétrica generada por agua ultrapura recién obtenida (PW_0).

Tanto agua ultrapura como agua salina (artificial o natural envejecida) pueden ser utilizadas como líneas de base.

En nuestro caso utilizamos agua de mar artificial con la idea principal de minimizar el efecto Schlieren. Por lo tanto aquí los cálculos aplicables fueron:

- 1) Cálculo de la Sensibilidad.
- 2) Medición de " $(C_b + Rlb)$ ":

$$(Hb + HbPW_0) = A$$

- 3) Medición de " Rlb ":

$$Hb(RIs) - HbPW_0(RIs) = B$$

- 4) Altura del "blanco" verdadero (C_b)

$$C_b = (A - B).$$

Resultados y Discusión

Evaluación de la linealidad de las metodologías empleadas

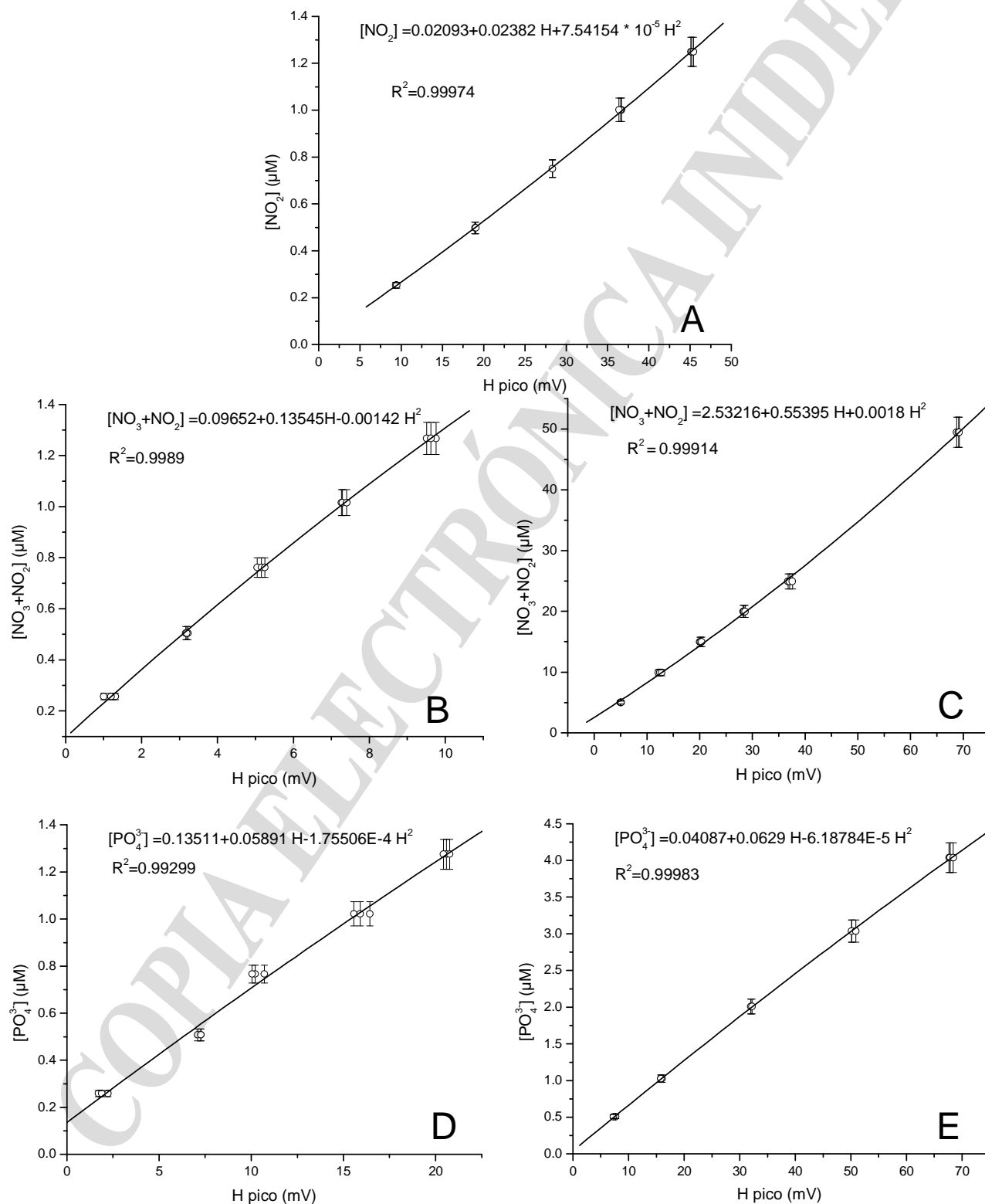
En la Figura 1 se presentan los mejores ajustes obtenidos para las relaciones entre la altura de pico (mV) medida en estándares de trabajo y su concentración. Aunque el mejor ajuste se logró utilizando una relación polinómica, con excepción de la determinación de silicato (rango 0-200 μM) (Figura 1G), todos ellos muestran una relación cercana a la linealidad con valores de R^2 próximos a la unidad. Las distintas replicas a diferentes concentraciones se mantienen en un error $< \pm 5\%$, indicando una elevada repetibilidad en la determinación de todos los analitos. En el caso particular de la determinación de silicato mencionada, el corrimiento de la linealidad es consecuente con un apartamiento de la señal fotométrica de lo predicho por la Ley de Lambert-Beer a valores elevados de concentración, indicando que el método utilizado no es apropiado para concentraciones superiores a 50 μM (Figura 1G)

Determinación de los valores blanco

Como se observa en la Figura 2 A, B y C, los valores blanco obtenidos para nitrato, nitrito y fosfato, utilizando agua de mar artificial son aceptablemente bajos, indicando que tanto el agua ultrapura como los reactivos analíticos cumplen los requisitos necesarios para ser utilizados en la determinación de estos iones. En el caso particular de silicato (Figura 2 D), el valor hallado es elevado. Este resultado es explicado por el hecho que el anión silicato es una base débil muy difícil de ser retenida por los sistemas de intercambio iónico utilizados en los equipos de obtención de agua ultrapura. En nuestro caso, dado que no contamos con un sistema que genere calidad superior de agua, debemos considerar este valor aceptable teniendo en cuenta que este hecho origina en el análisis continuo la presencia de picos negativos en todos los casos donde la concentración de la muestra es inferior a la concentración de la línea de base.



Figura 1. Ajuste polinómico para la relación entre la concentración de los diferentes analitos y la respuesta fotométrica del analizador. Las barras verticales indican el error ($\pm 5\%$) asociado a la determinación. A) Determinación de nitrito, B) Determinación de nitrato + nitrito (rango de trabajo: 0 – 1.4 μM), C) Determinación de nitrato + nitrito (rango de trabajo: 0 – 50.0 μM), D) Determinación de Fosfato (rango de trabajo: 0 – 1.25 μM), E) Determinación de Fosfato (rango de trabajo: 0 – 4.0 μM), F) Determinación de Silicato (rango de trabajo: 0 – 5.0 μM), G) Determinación de Silicato (rango de trabajo: 0 – 200.0 μM)



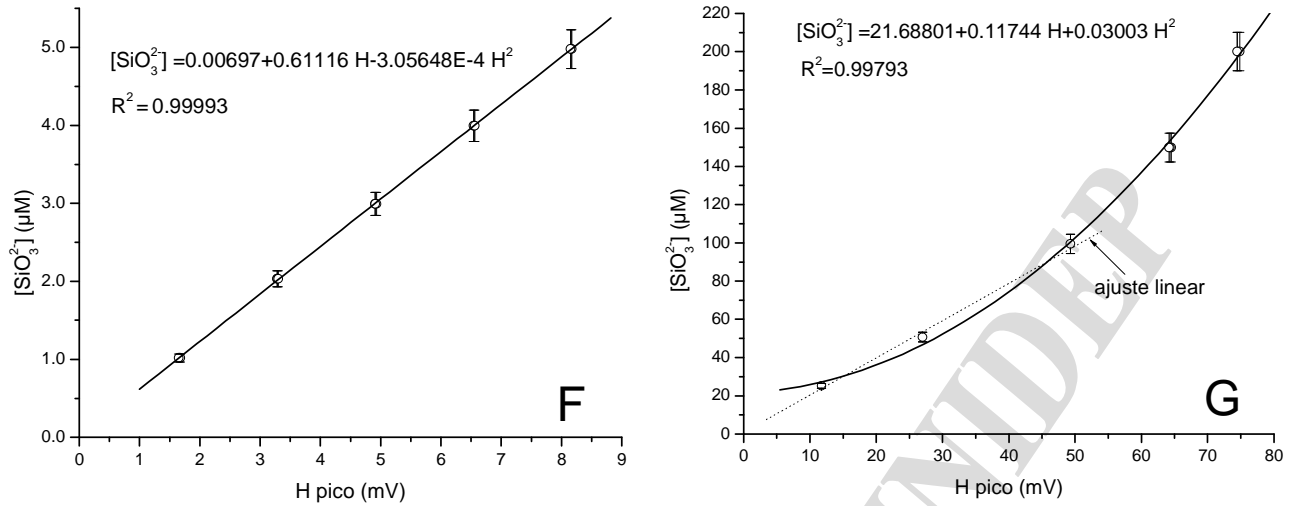
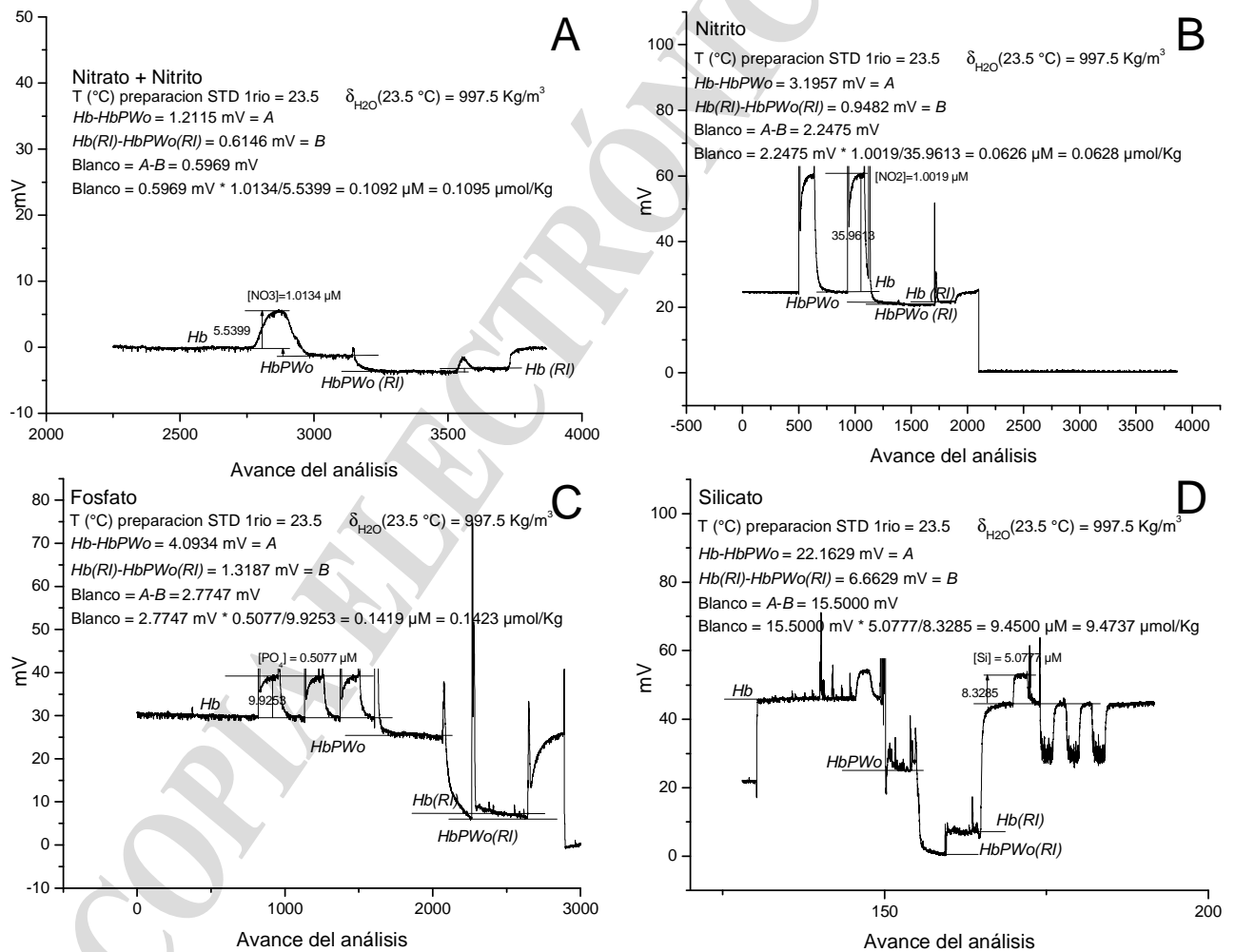


Figura 2. Gráficos avance del análisis (seg) vs señal del detector (mV) utilizados en la determinación del valor blanco para el análisis de los cuatro iones de interés.



*Análisis de las muestras de referencia enviadas por el MRI, Japón.*

Los resultados correspondientes al análisis de las diferentes muestras de referencia enviadas y el error asociado a la determinación, se presentan en la Tabla 6. Aquí se expresa la concentración de cada analito en $\mu\text{moles L}^{-1}$ y $\mu\text{moles Kg}^{-1}$. La expresión en $\mu\text{moles L}^{-1}$ si bien es ampliamente utilizada, no es estricta, si se considera que el volumen de una solución varía con la temperatura al igual que otras propiedades de soluciones no ideales. Para que esta expresión tenga validez y sea comparable entre muestras debe unificarse la temperatura de análisis para todas ellas. Esto es muy difícil de lograr en la práctica ya que requiere que todos los laboratorios mantengan la misma temperatura. Por esta razón, es más apropiado expresar la concentración en función de la masa de solución. La masa es independiente de la temperatura y es fácilmente calculable a partir de la densidad de la solución.

Tabla 6. Concentración (μM y $\mu\text{moles Kg}^{-1}$) y error asociado ($n = 3$), correspondientes al análisis de las cinco muestras testigo enviada por el Meteorological Research Institute, Japón. La temperatura de análisis fue fijada en 296.65 K.

	Nitrato + Nitrito ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nitrito ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Silicato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Muestra 1	22.74 \pm 0.24	22.37 \pm 0.24	0.37 \pm 0.00	1.64 \pm 0.01	52.05 \pm 0.12
Muestra 2	43.64 \pm 0.12	43.60 \pm 0.12	0.04 \pm 0.00	3.06 \pm 0.03	125.04 \pm 0.00
Muestra 3	31.68 \pm 0.11	31.64 \pm 0.11	0.04 \pm 0.00	2.22 \pm 0.01	56.38 \pm 0.11
Muestra 4	0.06 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	0.61 \pm 0.00
Muestra 5	46.14 \pm 0.14	46.10 \pm 0.14	0.04 \pm 0.00	3.14 \pm 0.03	131.42 \pm 0.26

	Nitrato + Nitrito ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Nitrito ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	Silicato ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)
Muestra 1	22.22 \pm 0.23	21.86 \pm 0.23	0.36 \pm 0.00	1.58 \pm 0.01	50.86 \pm 0.12
Muestra 2	42.64 \pm 0.12	42.60 \pm 0.12	0.04 \pm 0.00	3.00 \pm 0.03	122.18 \pm 0.00
Muestra 3	30.96 \pm 0.11	30.92 \pm 0.11	0.04 \pm 0.00	2.16 \pm 0.01	55.10 \pm 0.11
Muestra 4	0.06 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	0.60 \pm 0.00
Muestra 5	45.09 \pm 0.14	45.05 \pm 0.14	0.04 \pm 0.00	3.08 \pm 0.03	128.42 \pm 0.25

Comparación entre los resultados obtenidos en el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad y los informados por los restantes laboratorios participantes.

En la Figura 3 se presentan los valores hallados por todos los laboratorios participantes, para cada analito en las cinco muestras de referencia. Los mismos están ordenados de manera creciente de concentración, indicándose con una marca los correspondientes a nuestro laboratorio. Como se puede observar, los valores informados por INIDEP, están centrados en el valor medio de los obtenidos por todos los laboratorios participantes. Esto indica la exactitud de las determinaciones realizadas, consecuencia del uso de Buenas Prácticas de Laboratorio que se mantienen desde el año 1980 en el análisis de micronutrientes.

La forma sigmoidea en los gráficos es la resultante de una forma de presentación cuyo objeto es que cada participante ubique sus datos y no tiene ninguna relación con cuestiones metodológicas: si concentramos todos los datos presentados por todos los laboratorios en un solo punto del eje de abscisas, en realidad ahí podremos observar la nube total de datos distribuidos alrededor de un valor central y la dispersión de los mismos resultante del experimento global.

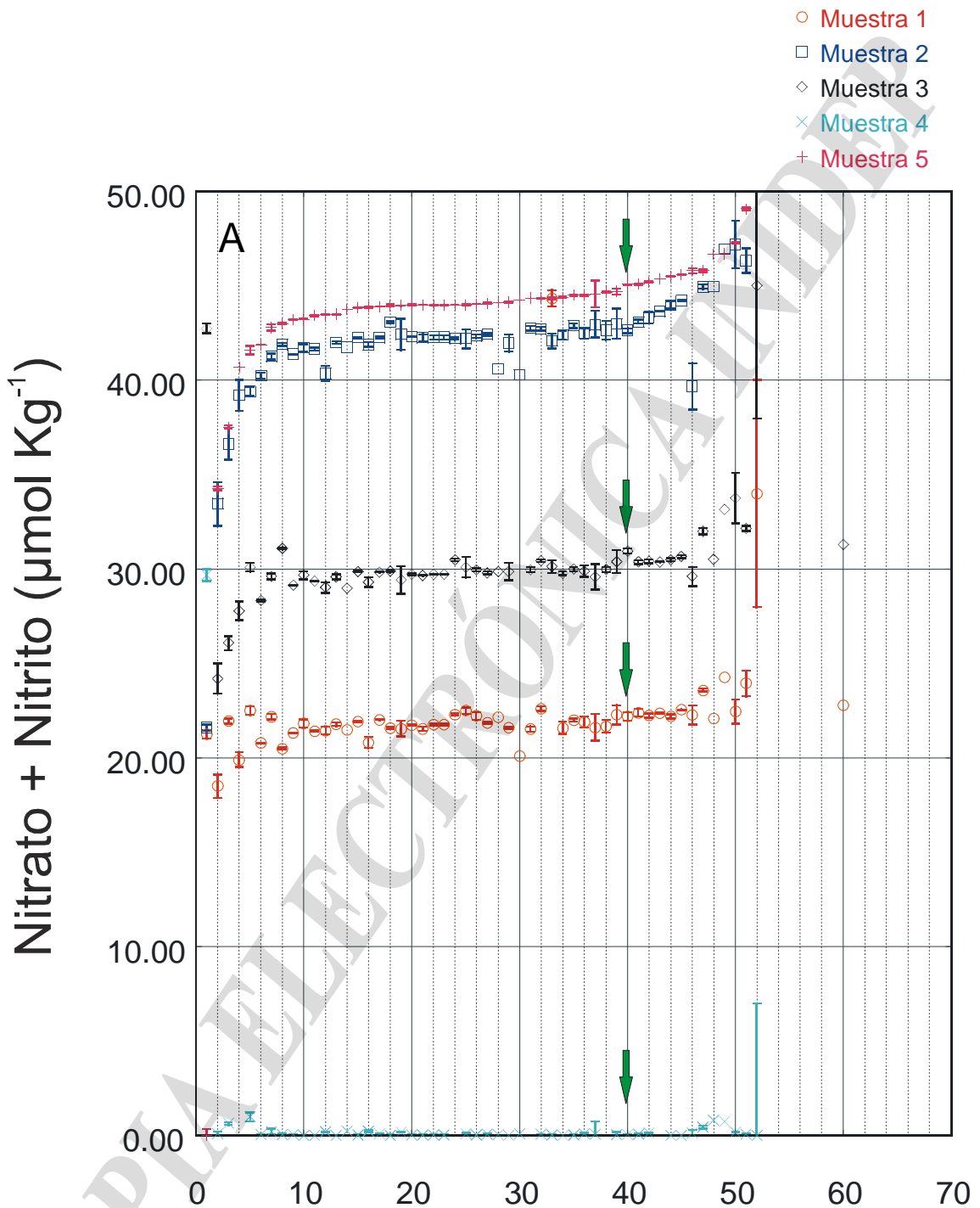


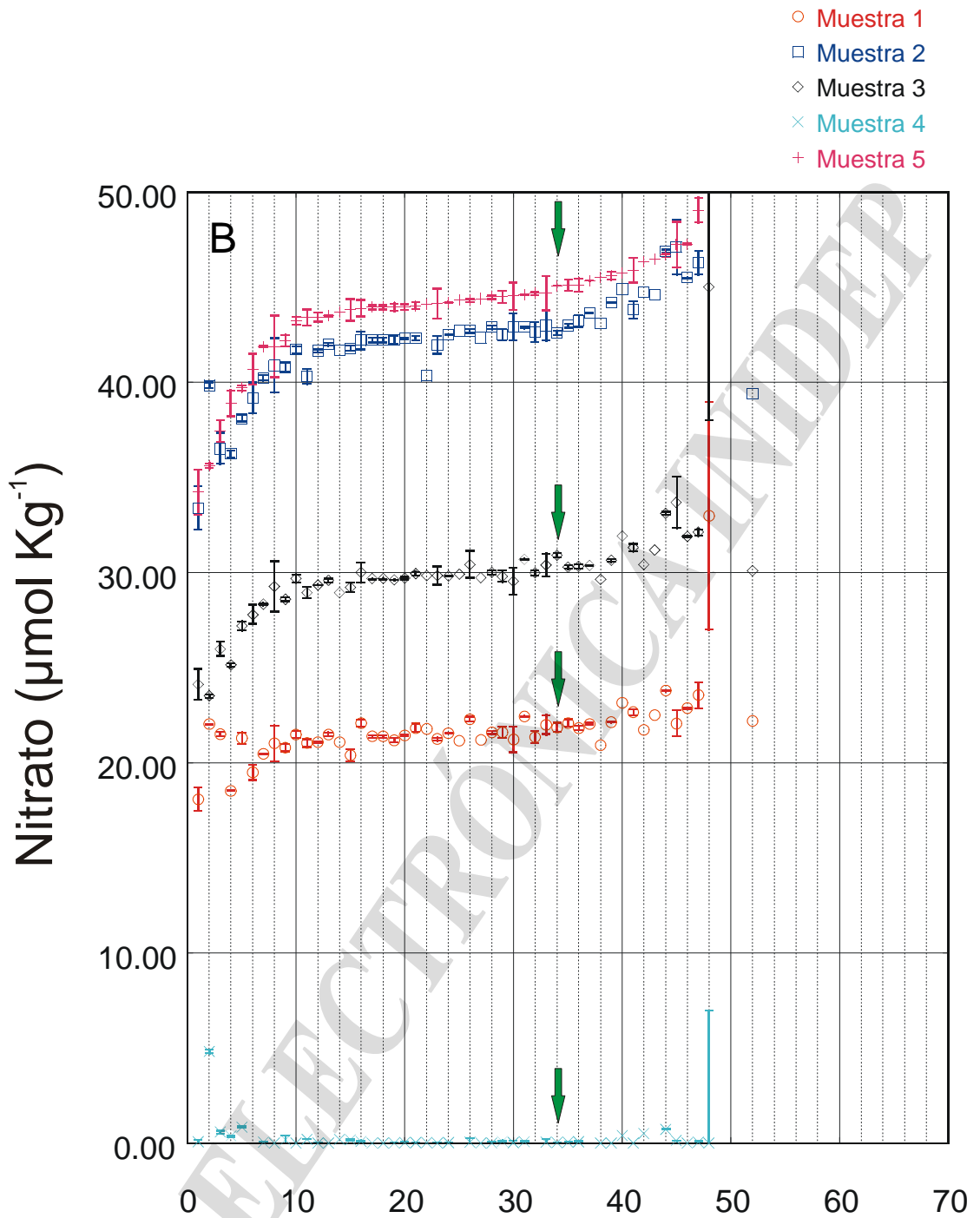
Es importante hacer una aclaración respecto de la determinación de silicato: los resultados informados para las muestras 1, 2, 3 y 5 mostraron (aunque baja) una subestimación respecto del valor medio general (Figura 3 E). Esto se relaciona con el hecho de que nuestra metodología está ajustada al rango de trabajo entre 0 y 10 μM ya que las muestras en nuestra área de trabajo presentan valores que oscilan entre 1 y 7 μM , llegando ocasionalmente a valores de 9 μM en aguas profundas (se excluye de este análisis la influencia del Río de la Plata porque para estos casos se utiliza una metodología diferente). Para valores bajos, nuestro método requiere la mayor sensibilidad posible, eso significa no diluir las muestras previamente o durante el análisis para ajustar la concentración al rango óptimo de la metodología disponible. En el caso de las muestras 1, 2, 3 y 5 se determinaron concentraciones que alcanzan entre 5 y 15 veces nuestro límite superior. Claramente aquí el color desarrollado correspondió a un valor de absorbancia donde la Ley de Lambert-Beer se aparta de la linealidad (Figura 1 G), resultando en una subestimación de los valores de concentración. Sin embargo la muestra 4 presentó un valor de concentración de silicato que se encontró dentro de nuestro rango de trabajo (Figura 3 E), resultando entonces que el valor informado fue (al igual que en las otras metodologías) cercano al valor medio resultante de todos los análisis.

COPIA ELECTRÓNICA INAD



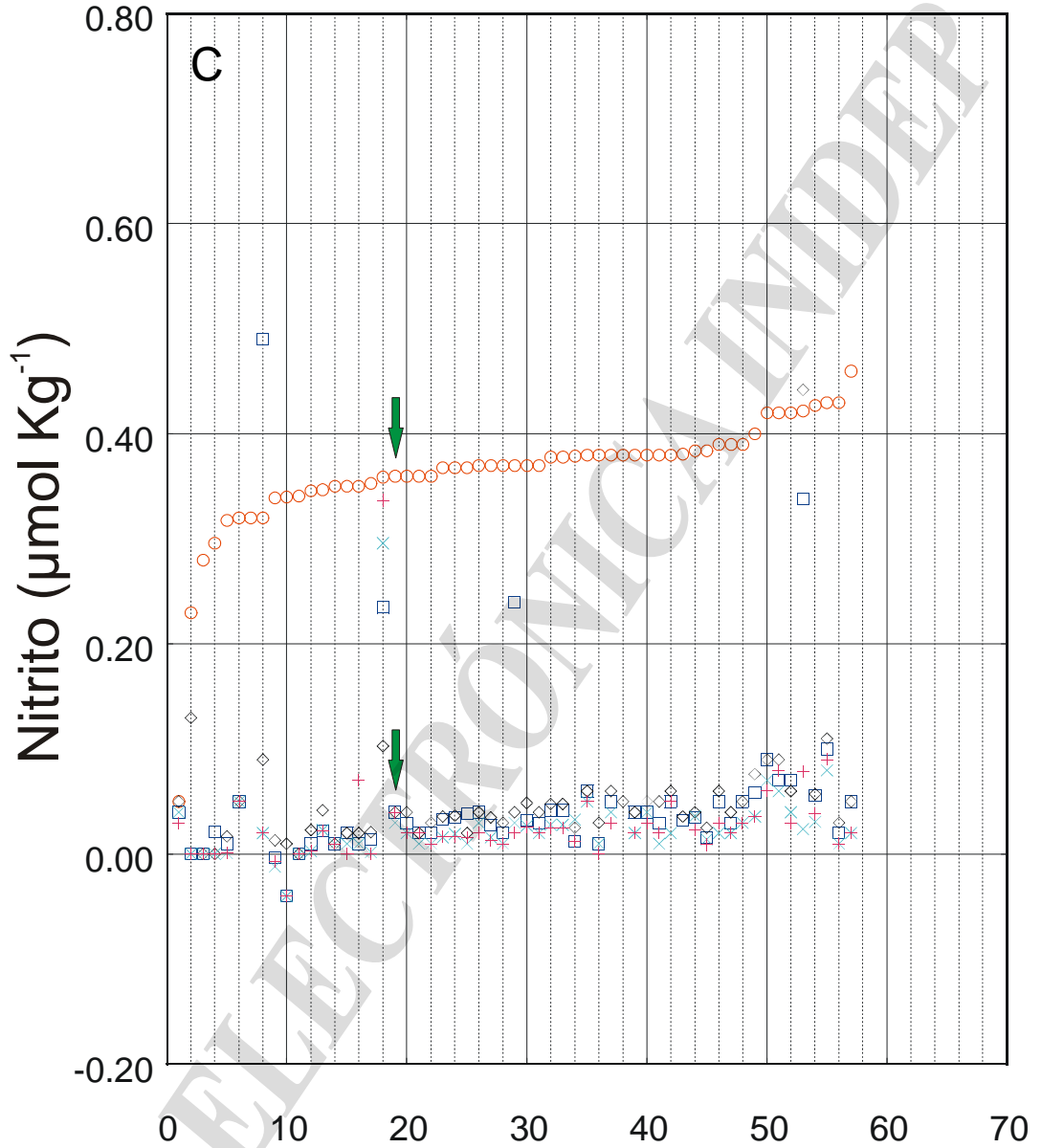
Figura 3. Valores de concentración reportados por los diferentes laboratorios participantes para los analitos de interés en las muestras analizadas. Los mismos aparecen ordenados en forma creciente de concentración utilizando la muestra 5 como referencia: A) Nitrato + Nitrito, B) Nitrato, C) Nitrito, D) Fosfato y E) Silicato. La flecha indica los valores reportados por nuestro laboratorio.

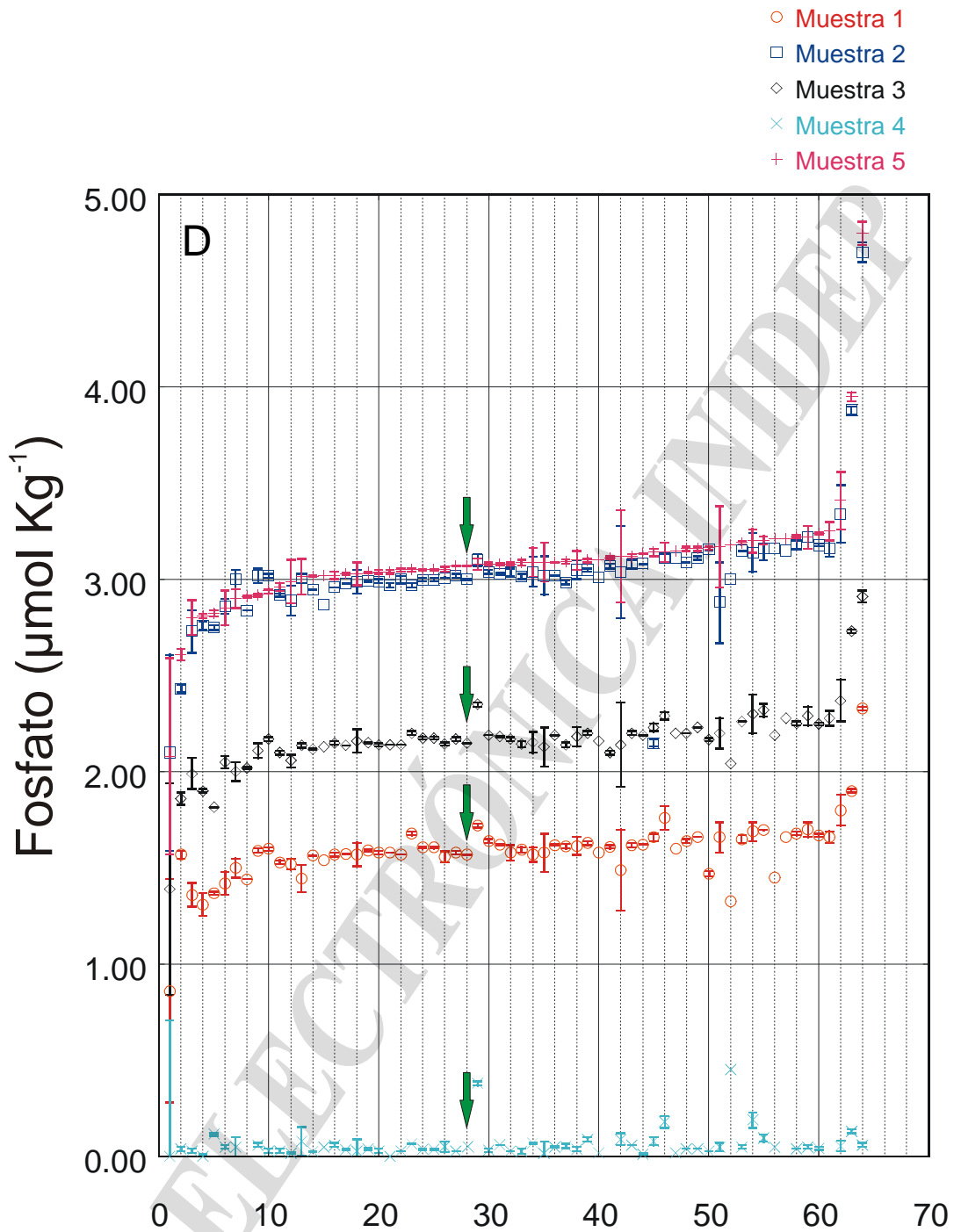


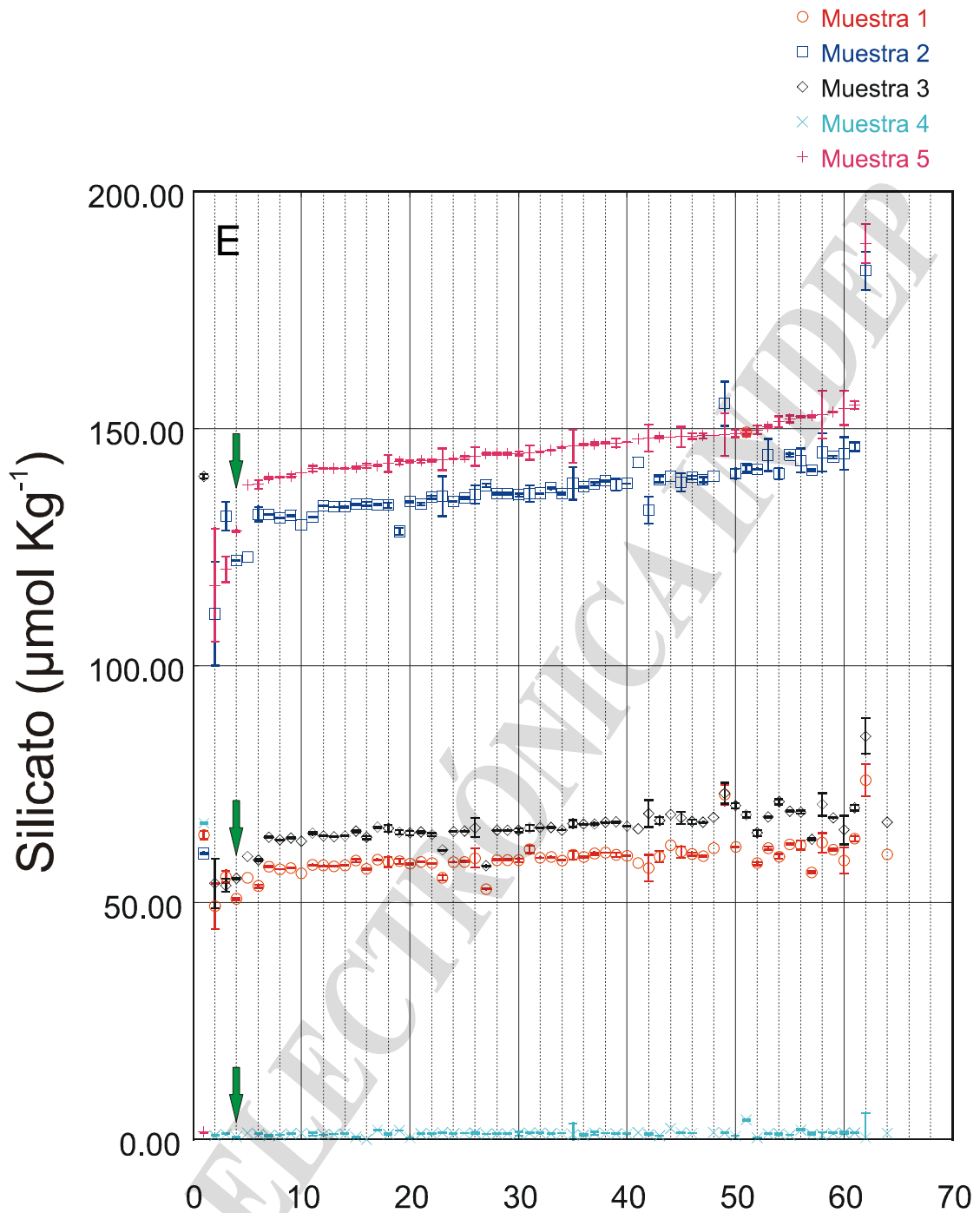




- Muestra 1
- Muestra 2
- ◇ Muestra 3
- × Muestra 4
- + Muestra 5







Conclusiones

- El resultado del análisis en nuestro laboratorio de las muestras de referencia enviadas por el Meteorological Research Institute, (Japón) mostró valores de concentración cercanos al valor medio resultante de la comparación de todos los valores reportados por los 67 laboratorios integrantes del experimento de intercalibración. Esto es indicativo del uso de buenas prácticas en el tratamiento de la muestra y en su procesamiento analítico posterior, siendo reaseguro para los valores informados por nuestro laboratorio en nuestras muestras de interés.
- En el caso particular de la determinación de silicato, la metodología utilizada es aplicable al rango de trabajo entre 0 y 50 μM . Para concentraciones por encima de este valor es necesario



hacer ajustes en la metodología que permitan diluir la muestra a valores adecuados comprendidos dentro de la linealidad.

- Se hace imprescindible el uso de material de referencia para el análisis de nutrientes en agua de mar como seguro de comparabilidad y trazabilidad entre datos obtenidos por distintos laboratorios.
- La participación en este tipo de experimentos de intercomparación de análisis entre laboratorios de diferentes partes del mundo es sin duda relevante y necesaria de continuar, ya que nos indica nuestro posicionamiento como analistas y es útil como control de calidad externo.
- Aunque este punto no es una conclusión en sí de este experimento, es necesario destacar que el equipo de análisis por flujo segmentado que utilizamos en este ejercicio de intercalibración, tiene ya 32 años de uso y que si bien su utilidad se mantiene, los insumos mecánicos que utiliza son originales y algunos de ellos próximos a acabarse. Estos insumos son actualmente inexistentes en el mercado, consecuencia de la evolución de estos analizadores a formas más compactas, razón por la cual parece prudente sugerir a través de este informe la compra a corto plazo de un equipo que reemplace al existente actualmente en el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad.

Bibliografía.

Aoyama, M., Ota, H., Kimura, M., Kitao, T., Mitsuda, H., Murata, A. and Sato, K. 2012. Current Status of Homogeneity and Stability of the Referente Materials for Nutrients in Seawater. *Analytical Sciences* 28, 911-916.

Grasshoff, K. M. and Erhardt K. 1983. Automated Chemical Analysis. En: Grasshoff, M. Erhardt, and K. Kremling (Eds.). *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

Hydes, D., J. Aoyama, M., Aminot, A., Bakker, K., Becker, S., Coverly, S., Daniel, A., Dickson, A. G., Grosso, O., Kerouel, R., van Ooijen, J., Sato, K., Tanhua, T., Woodward, E. M. S. and Zhang, J. Z. 2010. Determination of Dissolved Nutrients (N, P, Si) in Seawater with High Precision and Inter-comparability Using Gas-segmented Continuous Flow Analysers. In *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines*. Hood, E.M., C.L. Sabine, and B.M. Sloyan (Eds). IOCCP Report Number 14, ICPO Publication Series Number 134. Available online at: <http://www.go-ship.org/HydroMan.html>.

Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and the International CLIVAR Project Office. Hood, M. (ed.), *Ship-based Repeat Hydrography: A Strategy for a Sustained Global Programme*. (IOC Technical Series, 89. IOCCP Reports, 17. ICPO Publication 142.) UNESCO, 2009.

Murphy, J. and Riley, I. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-6.