

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para la determinación del fósforo soluble en agua, por el método colorimétrico de ácido ascórbico SM 4500-P, B.

2. ALCANCE

Este método de análisis aplica a muestras de aguas residuales domésticas e industriales, aguas superficiales, lluvias y subterráneas.

Esta técnica se aplica en el GLCA para el recurso hídrico superficial; el rango de aplicación es de: 0,03 mg P-PO₄ / L – 100 mg P-PO₄ / L.

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos en la validación del método:

Tabla 1. RESULTADOS VALIDACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL METODO:		Fósforo Reactivo Disuelto En Agua Por El Método Del Ácido Ascórbico	
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN:		Enero 2000	
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACION
LIMITE DE DETECCIÓN	0.03	mg P-PO ₄ / L	Corresponde al límite de cuantificación.
PRECISION EN TÉRMINOS DE %CV	8.5	%	Std bajo 0.1 mg P-PO ₄ / L
	1.7	%	Std alto 1.0 mg P-PO ₄ / L
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	1.4	%	Std bajo 0.1 mg P-PO ₄ / L
	4.2	%	Std alto 1.0 mg P-PO ₄ / L
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	0.03 - 1.0	mg P-PO ₄ / L	Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	0.03 - 100	mg P-PO ₄ / L	Para una dilución de 100 veces
RECUPERACION EXPRESADO COMO %	123	%	Std bajo 0.1 mg P-PO ₄ / L
	79	%	Std alto 1.0 mg P-PO ₄ / L

3. DEFINICIONES


mg P-PO₄/L = miligramos de fósforo como orto fosfato por litro.

g = gramos

µg = microgramos

µm = micrómetros

s = Desviación estándar

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN FÓSFORO SOLUBLE POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SM 4500-P E	Código: M-S-LC-I020
		Versión : 01
		Fecha: 14/12/2017
		Página: 2 de 10

UV - VIS = Ultravioleta - Visible

4. ASPECTOS DE SALUD Y SEGURIDAD LABORAL

Antes de iniciar el análisis revisar el Manual de Higiene, Salud Ocupacional y Seguridad en el Laboratorio y las hojas de Seguridad que reposan en el mueble ubicadas a la entrada; en el área de recepción de muestras.

Utilizar los implementos de seguridad de acuerdo con lo señalado en el instructivo: bata, zapatos antideslizantes, guantes, respirador para ácidos y gafas protectoras

Los residuos producto del análisis de la determinación, se tratan de acuerdo al documento disposición de muestras y residuos de análisis.

5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-VIS
- Balanza analítica

5.1.1 Verificación de Equipos

- Verificar la balanza analítica con las masas antes de realizar cualquier pesaje.
- Verificar el volumen dispensado por las pipetas y transferpipetas según el volumen requerido

5.2 REACTIVOS

Solicitar los reactivos diligenciando el formato para tal fin.

- Agua ultra pura.
- **Ácido sulfúrico (H₂SO₄), 5N:** En un vaso de precipitado de 400 mL, agregar 200 mL de agua ultra pura, adicionar lentamente y con agitación 70 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, como se produce una reacción exotérmica, esperar hasta la solución este fría, en ese momento transferir cuantitativamente la solución a un balón de 500 mL y completar con agua ultra pura. Mantener en frasco de vidrio a temperatura ambiente.
- **Solución de Tartrato de Antimonio y Potasio:** Disolver 0.6858 g de K(SbO)C₄H₄O₆·½H₂O en 200 mL de agua ultra pura, en un balón aforado de 250 mL llevar a volumen. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio por un periodo de tiempo no mayor a 3 meses. No utilizar este reactivo después del tiempo recomendado ya que forma un precipitado azul en las muestras, minutos después de adicionar el reactivo combinado, registrando valores más bajos en los resultados.
- **Solución de Molibdato de Amonio:** Disolver 20 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en 500 mL de agua ultra pura. Almacenar refrigerado en frasco de vidrio por un

período de tiempo no mayor a 6 meses. Este reactivo puede formar un precipitado blanco con el tiempo, que no interfiere en la calidad del análisis. Agitar muy bien antes de utilizar.

- **Ácido Ascórbico, 0,1 M:** Disolver 1,76 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua ultra pura. Guardar en frasco de vidrio ámbar, esta solución es estable por una semana, refrigerada a 4°C.
- **Reactivo Combinado:** Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de agregarlos. Mezclar los siguientes reactivos en estricto orden y proporciones, agitando después de la adición de cada uno de los reactivos:

TABLA 2. PROPORCIONES DE REACTIVOS

Número de muestras aprox.	Volumen preparado	H ₂ SO ₄ 5 N (mL)	Tartrato (mL)	Molibdato (mL)	Ácido ascórbico (mL)
25	100 mL	50	5	15	30
20	80 mL	40	4	12	24
12	50 mL	25	2.5	7.5	15
7	30 mL	15	1.5	4.5	9

Nota: Si se prepara este reactivo en un recipiente de vidrio transparente se puede observar una coloración amarilla que indica que quedó bien preparado. Si se nota algo de turbidez, agitar y dejar en reposo por unos minutos hasta que ésta desaparezca. Este reactivo es estable por 4 horas.

- **Solución Patrón de Fosfato de 50 mg (P-PO₄)/L:** Colocar 0.25 g de fosfato diácido de potasio también denominado fosfato monobásico de potasio KH₂PO₄ grado analítico a secar a 105°C durante dos (2) horas. Disolver en agua ultra pura 0,2195 g de KH₂PO₄ anhidro y diluir a 1000 mL en balón volumétrico. Almacenar en nevera a 4°C en frasco de vidrio. 1,00 mL = 50,0 µg PO₄⁻³P.


5.3 MATERIALES

- Balones aforados clase A de 100 mL.
- Erlenmeyer de 100 mL.
- Pipetas aforadas clase A, de 1, 2, 5, 10, 20 y 25 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.
- Probeta de 25 mL y 50mL.
- Pipeta Pasteur.
- Microespátula.
- Celda de vidrio.
- Papel para limpiar lentes.

6. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

La presencia de turbidez y color en la muestra debe corregirse elaborando un blanco.

Los sólidos suspendidos se deben remover por filtración a través de membrana con diámetro de poro de 0,45 µm.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN FÓSFORO SOLUBLE POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SM 4500-P E	Código: M-S-LC-I020
		Versión : 01
		Fecha: 14/12/2017
		Página: 4 de 10

Los arseniatos reaccionan con el reactivo de molibdato y producen un color azul similar al formado con el fosfato. Concentraciones de arseniatos tan bajas como 0.1 mg As/L interfieren en la determinación de fosfatos. Concentraciones tan bajas como 0.1 mg As/L interfieren con la determinación del fosfato

El cromo hexavalente y NO₂⁻ interfieren y dan resultados alrededor del 3% bajo concentraciones de 1 mg/L y de 10% a 15% bajo concentraciones de 10 mg/L.

El sulfito (Na₂S) y silicatos no interfieren a concentraciones de 1.0 y 10 mg/L.

No se encontró en la literatura metodología para corregir las anteriores interferencias.

7. CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Las prácticas de control de calidad se consideran parte integrante de cada método, para este método se incluye la siguiente tabla.

Tabla 3. CONTROL DE CALIDAD MÉTODO 4500-P E

Blanco del Método (MB)	Blanco Fortificado en Laboratorio (LFB)	Matriz Fortificada en Laboratorio (LFM) y Duplicado Matriz Fortificada en Laboratorio (LFMD)	Otro
X	X	X	3

Tomado del SM Tabla 4020: I (3.Consulte 4020B del SM para más Requisitos de control de calidad).

- Los blancos se analizan para determinar si la calidad del agua y de los reactivos es óptima. Estos deben registrar absorbancia con cifras exponenciales de 10⁻³ y 10⁻⁴.
- Verificar los estándares de control, si el resultado analítico cae fuera de los límites de control normales, revisar los estándares de calibración, los reactivos, material de vidrio y los blancos. El análisis solo se puede reanudar cuando se corrija el problema.
- Los duplicados evalúan la limpieza del material de vidrio, la purga adecuada de la celda, la replicabilidad del método. Realizar el duplicado de una muestra al azar. Incluir al menos un duplicado para cada tipo de matriz diariamente con cada lote de 20 muestras o menos., el porcentaje de la diferencia entre los duplicados no debe ser mayor al 10%, si la variación excede este límite, repetir el análisis.
- Realizar por duplicado una muestra adicionada al azar. Incluir al menos un duplicado para cada tipo de matriz diariamente con cada lote de 20 muestras o menos.
- Llevar los registros de los estándares de control de 0.10 mg P/L y 1,00 mg P/L en una carta de control para la determinación de fósforo soluble - método del ácido ascórbico.
- Cuando los resultados se encuentren entre el límite de alarma y control, revisar todo el procedimiento para determinar que ocurrió. Si cualquier dato cae fuera de los límites de control debe ser reexaminado y si es necesario, se debe repetir el análisis de todo el grupo de muestras. No realizar más análisis hasta verificar que sucedió, comunicar la anomalía al líder de fisicoquímica, iniciar nuevamente la marcha analítica cuando el líder de análisis lo ordene.

8. DESARROLLO

8.1 PRINCIPIO

El fósforo se encuentra en aguas naturales y residuales casi exclusivamente como fosfatos, los cuales se clasifican en ortofosfato, fosfatos condensados (piro-, meta-, y otros polifosfatos) y fosfatos orgánicos. El análisis de fósforo envuelve dos pasos generales: (a) conversión de la forma de fósforo de interés a ortofosfato disuelto, y (b) determinación colorimétrica del ortofosfato disuelto.

El fósforo disuelto se determina en el filtrado de una muestra pasada a través de un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro.

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato para formar un heteropoliácido -ácido fosfomolibdico- que es reducido por ácido ascórbico a un complejo azul de molibdeno intensamente coloreado; sólo las formas de ortofosfato forman dicho color azul en esta prueba.

La presencia de fósforo soluble en los cursos de agua proviene del uso de fertilizantes, jabones, detergentes, o del suelo. A mediano plazo pueden producir en las aguas continentales proliferación de algas y otros vegetales acuáticos (eutrofización). Los polifosfatos utilizados en los detergentes o en el tratamiento de aguas perjudican la depuración, al impedir la floculación y el desendurecimiento, al tiempo que pueden producir gran cantidad de espuma.

Según la resolución 2115 del 2007 del Ministerio de protección social, ambiente, vivienda y desarrollo territorial en el artículo 7, cuadro 4 se especifica las características químicas como criterio de calidad para agua con implicaciones sobre la salud, un valor máximo admisible de 0,5 mg/L de nitritos.

8.2 TOMA Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Colectar la muestra en envase de vidrio ámbar y no adicionar ningún preservante, refrigerar inmediatamente. Las muestras con bajas concentraciones de fósforo no se deben almacenar en botellas plásticas a menos que se congelen, debido a que los fosfatos se pueden adsorber en las paredes plásticas.


Las muestras refrigeradas tienen un tiempo máximo de espera para el análisis de 48 horas. La muestra debe ser filtrada antes de realizar el análisis, filtrar toda la botella ya que se comparte el filtrado con los análisis de nitritos y sulfatos, siempre y cuando el volumen de muestra sea suficiente para los tres analitos.

8.3 LIMPIEZA DE VIDRIERÍA

La contaminación con fosfato es común debido a su absorción en las superficies de vidrio por esta razón se debe evitar el uso de detergentes comerciales que contienen fosfato.

Lavar toda la vidriería con jabón neutro libre de fósforo, enjuagar con agua de la llave, posteriormente dejar en HCl diluido al 5% y enjuagar muy bien con agua destilada. Consultar el procedimiento Lavado material de vidrio.

Utilizar la vidriería a la que se le haya efectuado control de calidad y reserve esta vidriería únicamente para las determinaciones de fósforo.

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN FÓSFORO SOLUBLE POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SM 4500-P E	Código: M-S-LC-I020
		Versión : 01
		Fecha: 14/12/2017
		Página: 6 de 10

8.4 EJECUCIÓN DE LA TÉCNICA

8.4.1 Procedimiento de Preparación de Estándares

8.4.1.1 Estándares de curva calibración

A partir de la solución patrón de fosfato de 50 mg P-PO₄/L, preparar los estándares de las siguientes concentraciones 0.03, 0.10, 0.50 y 1.00 mg P-PO₄/L y elaborar la curva de calibración, con éstas concentraciones.

- Preparar un estándar intermedio de 10 mg/L a partir de la solución patrón de 50 mg/L, tomar 20 mL y llevarlos a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.
- Preparar un estándar de 1,00 mg/L a partir de la solución intermedia de 10 mg/L, tomar 10 mL de ésta solución y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.
- Preparar un estándar de 0,50 mg/L a partir de la solución intermedia de 10 mg/L, tomar 5 mL de ésta solución y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.
- Preparar una solución intermedia de 0,30 mg/L a partir de la solución intermedia de 1,00 mg/L, tomar 30 mL de ésta solución y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.
- Preparar un estándar de 0,10 mg/L a partir de la solución intermedia de 1,00 mg/L, tome 10 mL de ésta solución y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.
- Preparar un estándar de 0,03 mg/L a partir de la solución intermedia de 0,30 mg/L, tomar 10 mL de ésta solución y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.

Nota: Preparar una curva de calibración cada vez que cambie de solución de coloración (lote de reactivo), solución patrón de fosfatos

8.4.2 Procedimiento de Análisis


8.4.2.1 Curva de Calibración. Con los estándares preparados en el numeral anterior proceder de la siguiente forma:

- Encender el espectrofotómetro UV-VIS con la lámpara de tungsteno (roja en el equipo) 45 minutos antes de iniciar las lecturas. La lectura de fósforo soluble debe hacerse a 880 nm. Cargar la curva correspondiente a la última preparación de reactivos.
- Verificar que la celda de vidrio de 1cm esté perfectamente limpia, si esta manchada de color azul, dejarla en jabón libre de fósforo y enjuagar perfectamente con agua desionizada, si continua manchada lavarla con ácido sulfúrico 5N y enjuagar con agua desionizada.
- Al iniciar la determinación del fósforo, transferir una alícuota de 25 mL del blanco y de los estándares, adicionar 4 mL del reactivo combinado al blanco y a los estándares, mezclar completamente, después de mínimo 10 minutos, pero antes de 30 minutos, leer en el espectrofotómetro.

- Para iniciar las lecturas fotométricas, colocar el blanco de reactivos en la celda, leer como blanco, verificar la observación de una línea recta horizontal en el rango de la longitud de onda de los 880 nm, inmediatamente leer como estándar y como muestra y codificar como blanco, la absorbancia debe registrar cifras exponenciales de 10^{-3} y 10^{-4} , continuar con los estándares en orden creciente desde los de más baja concentración, leer como estándares y enseguida como muestras. La gráfica de absorbancia contra concentración de fosfato da una línea recta que pasa por el origen.
- Almacenar los datos en la carpeta del año correspondiente, en la subcarpeta fósforo soluble. Grabar la curva, los estándares y las muestras de dicha curva de calibración, archivar por fecha en que se realizó el análisis, dos dígitos para día, mes y año (dd/mm/aa), en las carpetas curvas, estándares y muestras respectivamente. Imprimir el reporte y entregar al encargado de la auditoria de verificación.

8.4.2.2 Procesamiento de la Muestra

- Solicitar las muestras a analizar diligenciando el formato correspondiente.
- **Filtración preliminar.** Filtrar las muestras para la determinación de fósforo disuelto reactivo a través de membranas de acetato de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$. Las muestras de difícil filtración se deben filtrar con un prefiltro de fibra de vidrio.
- **Corrección por turbidez o color.** El color natural del agua generalmente no interfiere a la longitud de onda empleada. Para aguas altamente coloreadas o turbias, preparar un blanco de la muestra filtrada que presenta esta característica, adicionar a 25 mL de muestra, 4 mL de reactivo combinado modificado (mezclando exclusivamente 50 mL de H_2SO_4 5N y 15 mL de molibdato de amonio). Leer este blanco como muestra, registrar el código de la muestra y la palabra blanco y a continuación leer la muestra a la que se le ha adicionado el reactivo combinado completo. Reportar el valor de concentración de esta muestra mediante cálculo adicional sustrayendo los valores de concentración de muestra y su blanco correspondiente.
- **Procesamiento de la muestra:** Adicionar a cada muestra 4,0 mL del reactivo combinado, mezclar completamente y leer en el espectrofotómetro.
- Al pasar un grupo de muestras, correr inicialmente un blanco de reactivos, leer como blanco y como muestra, enseguida pasar un estándar de fosfato de baja y luego uno de alta concentración.
- El equipo solicita el código o la rotulación de cada muestra, el cual corresponde al asignado en el consecutivo de radicación al ingreso al laboratorio; dado que en la pantalla se puede observar la absorbancia registrada para cada muestra, verificar que la muestra no sobrepase el rango de absorbancia obtenida en la curva de calibración para el estándar de más alta concentración (1,00 mg/L).
- Almacenar los resultados primarios en el disco duro del computador del espectrofotómetro, en el que queda registrado el nombre del analito, nombre del método, archivo de la curva, ecuación de calibración, LPC, fecha y hora del análisis, nombre del operador, firma, nombre de la muestra, factor de dilución, concentración (mg/L) y absorbancia. Imprimir el reporte y entregar al oficial de calidad. Reportar la concentración redondeando el resultado con 2 cifras significativas.
- Registrar los resultados con 2 cifras significativas en la carta de control, verificar que los valores se encuentren dentro del rango de 2 (s) desviaciones estándar por encima o por debajo, respecto del valor teórico esperado.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO. DETERMINACIÓN FÓSFORO SOLUBLE POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SM 4500-P E	Código: M-S-LC-I020
		Versión : 01
		Fecha: 14/12/2017
		Página: 8 de 10

8.4.5 Cálculo de Resultados

El espectrofotómetro arroja resultados en mg PO₄-P mg /L de acuerdo al factor de dilución digitado en el momento de la lectura, aplicando la siguiente fórmula:

$$PO_4-P \text{ mg /L} = \text{Pendiente} \times \text{Absorbancia} \times \text{FD}$$

Pendiente = Obtenida a partir de la curva de calibración.

Absorbancia = Lectura realizada por el espectrofotómetro.

mg/LP-PO₄= Concentración de fosfatos calculada y registrada por el espectrofotómetro UV-VIS.

FD= factor de dilución.

9. DIAGRAMA

Ver anexo1

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y BIBLIOGRAFÍA

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.4500-P E. 22 ed., New York, 2012.

- Instructivo Lavado material de vidrio.
- Disposición final de residuos.
- Manual de Higiene, Salud Ocupacional y Seguridad en el Laboratorio
- Aseguramiento de calidad.
- Verificación y auditoria de datos analíticos
- Aseguramiento de control de calidad analítica
- Solicitud de muestras para análisis
- Solicitud de reactivos, vidriería y materiales
- Rótulos de reactivos

11. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	14/12/2017	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI

ELABORÓ: Adriana Dueñas Moreno Contratista Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	REVISÓ: Carlos Martín Velásquez Ramírez Contratista Líder Técnico Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	APROBÓ: Nelson Omar Vargas Martínez Subdirector de Hidrología
--	---	---

ANEXO 1. Diagrama

