



TÍTULO: FOSFORO SOLUBLE EN AGUA POR EL METODO DEL
ACIDO ASCORBICO.

CÓDIGO: TP0094

VERSIÓN: 03

COPIA N°: _____

ELABORADO POR:

ANDREA MILENA LASSO P.
ING. QUÍMICA

REVISADO Y
ACTUALIZADO POR:

ROCIO BOJACA B.
QUÍMICA U.N.

APROBADO POR:

MARTA ELENA DUQUE S.
COORDINADORA PFQA

* Este documento debe ser revisado por lo menos cada **dos años**.

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia		
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGÍA - GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL		
	Código: TP0094	Fecha de elaboración: 16/07/2007	Versión: 03
FÒSFORO SOLUBLE EN AGUA POR EL MÈTODO DEL ÀCIDO ASCÒRBICO		Hoja No.:	

1. Introducción

El fósforo se encuentra en aguas naturales y residuales casi exclusivamente como fosfatos, los cuales se clasifican en ortofosfatos, 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.

En el Laboratorio del IDEAM se analizan con éste método muestras de agua superficial, en un rango de concentraciones entre 0.03 y 1.0 mg P-PO₄/L

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 espuma¹.

Según el Decreto 475 del 10 marzo de 1998 del Ministerio de Salud, en el artículo 8 parte b) se especifica como criterio de calidad química para agua con implicaciones de tipo económico o acción indirecta sobre la salud, un valor máximo admisible de 0,2 mg/L de fosfatos.

¹ Seoanez Mariano et al. Ingeniería del medio Ambiente aplicada al medio natural continental. Ediciones Mundiprensa. 1996. Madrid, España. p. 291-292.



2. Definiciones

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

g = gramos

µg = microgramos

µm = micrometros

s = Desviación estándar

UV - VIS = Ultravioleta - Visible

3. Aspectos de Salud y Seguridad Laboral

Revise antes de iniciar la práctica el Manual de Higiene Seguridad y las Hojas de Seguridad números: 14, 23, 44, 152, 157, y 235 que reposan en los AZ, en el mueble de la entrada en el área de recepción de muestras. Estas hojas de seguridad también puede encontrarlas, en el PSO en el puesto de trabajo.

En el desarrollo de todo el análisis utilice de manera obligatoria los siguientes implementos de seguridad: bata, guantes, respirador para ácidos, gafas protectoras.

4. Limitaciones e Interferencias

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

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.



5. Cuadro de resultados de la validación del método

NOMBRE DEL METODO:	Fósforo reactivo disuelto en agua por el método del ácido ascórbico		
CÓDIGO DEL PSO:	TP0094		
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN:	Enero 2000		
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACION
LIMITE DE DETECCION	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

Los datos del cuadro se obtuvieron de la validación realizada por Blanca Moreno en enero de 2000.

6. Toma y preservación de la muestra

Colecte la muestra en envase de vidrio ámbar y no le adicione ningún preservante, refrigérelas inmediatamente. 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.



7. Aparatos, reactivos y materiales

7.1 Aparatos

- Espectrofotómetro UV-VIS marca Hewlett Packard modelo 8453, detector de arreglo de diodos, ancho de banda de 0.1 nm, provisto de una celda de vidrio con paso de luz de 1.0 cm, el cual incluye sistema óptico revertido de haz sencillo, fuente de radiación visible (tungsteno), monocromador y detector de fotodiodos con arreglo de diodos.
- Balanza analítica electrónica con aproximación de 0.0001 g.

7.2 Reactivos

Solicite los reactivos diligenciando el formato AF0041.

7.2.1 *Agua UP*, obtenida mediante el purificador Labconco WaterPro PS.

7.2.2 *Ácido sulfúrico*, H_2SO_4 , 5N: *Ácido sulfúrico*, H_2SO_4 , 5N: En un vaso de precipitado de 400 mL, agregue 200 mL de agua ultra pura y adicione lentamente y con agitación 70 mL de H_2SO_4 concentrado, como se produce una reacción exotérmica, espere hasta que se enfríe la solución, en ese momento transfiera cuantitativamente la solución a un balón de 500 mL y complete con agua ultra pura. antenga en frasco de vidrio a temperatura ambiente.

7.2.3 *Solución de tartrato de antimonio y potasio*: Disuelva 0.6858 g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ en 200 mL de agua ultra pura, en un balón aforado de 250 mL lleve a volumen. Almacene a temperatura ambiente en frasco de vidrio, por un período de tiempo no mayor de 3 meses. No utilice este reactivo después del tiempo recomendado, ya que forma un precipitado azul en la muestra que se va a analizar, minutos después de adicionar el reactivo combinado, registrando valores más bajos en los resultados. Refrigerar.

7.2.4 *Solución de molibdato de amonio*: Disuelva 20 g de Heptamolibdato de amonio tetrahidratado, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ en 500 mL de agua ultra pura. Almacene refrigerado en frasco de vidrio, por un período de tiempo no mayor de 6 meses. Este reactivo puede formar un precipitado blanco con el tiempo, que no interfiere en la calidad del análisis. Agite muy bien antes de utilizarlo.

7.2.5 *Ácido ascórbico*, 0,1 M: Disuelva 1,76 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua ultra pura. Guarde en frasco de vidrio ámbar, esta solución es estable por cerca de una semana, refrigerada a 4°C. Llenar el formato TP0094 de preparación que se encuentra en la carpeta del PSO en el sitio de trabajo.



7.2.6 *Reactivo combinado*: Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de agregarlos. Mezcle los siguientes reactivos en estricto orden y proporciones, agitando después de la adición de cada uno de los reactivos:

Número de muestras aprox.	Volumen preparado	H ₂ SO ₄ 5 N (mL)	Tartrato (mL)	Molibdato (mL)	Acido 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 prepara este reactivo en un recipiente de vidrio transparente se puede observar una coloración amarilla que indica que quedó bien preparado. Si nota algo de turbidez, agite y deje en reposo por unos minutos hasta que ésta desaparezca. Este reactivo es estable por 4 horas.

7.2.7. *Solución patrón de fosfato de 50 mg(P-PO₄)/L*: Coloque 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. Disuelva en agua ultra pura 0,2195 g de KH₂PO₄ anhidro y diluya a 1000 mL en balón volumétrico. Almacene en la nevera a 4 °C en frasco de vidrio perfectamente rotulado. 1,00 mL = 50,0 µg PO₄³⁻-P.

7.3 Materiales

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



8. Procedimiento de 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.

Lave toda la vidriería con jabón neutro libre de fósforo, enjuague con agua de la llave, posteriormente déjelo en HCl diluido al 5% y enjuague muy bien con agua destilada. Consultar el procedimiento TP0125 Lavado Material de Vidrio.

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

9. Procedimiento de preparación de estándares

9.1 Estándares de curva calibración.

A partir de la solución patrón de fosfato de 50 mg P-PO₄/L, prepare los estándares de las siguientes concentraciones 0,03-0,10-0,50 y 1,00 mg P-PO₄/L y elabore la curva de calibración, con éstas concentraciones.

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

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia		
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGÍA - GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL		
	Código: TP0094	Fecha de elaboración: 16/07/2007	Versión: 03
FÒSFORO SOLUBLE EN AGUA POR EL MÈTODO DEL ÀCIDO ASCÒRBICO		Hoja No.:	

- Prepare un estándar de 0,03 mg/L a partir de la solución intermedia de 0,30 mg/L, tome 10 mL de ésta solución y lleve a volumen en un balón aforado de 100 mL, con agua ultra pura.

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

9.2 Estándares de control

Cada vez que pase un lote de muestras incluya estándares de control de 0,10 mg/L y de 1,00 mg/L, prepárelos teniendo en cuenta las especificaciones descritas en la preparación de estándares para la curva de calibración.

10. Procedimiento de análisis

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

- Encienda el Espectrofotómetro UV-VIS con la lámpara de tungsteno (roja en el equipo), 45 minutos antes de iniciar las lecturas, tenga en cuenta el Manual TM0166, cuyo diagrama de flujo está ubicado en la pared al lado del equipo. la lectura de fósforo soluble debe hacerse a 880 nm. Cargue la curva correspondiente a la última preparación de reactivos.
- Verifique que la celda de vidrio de 1 cm este perfectamente limpia, si la observa manchada de color azul déjela en jabón libre de fósforo y enjuáguela perfectamente con agua desionizada, si continua la mancha lávela con ácido sulfúrico 5N y enjuague con agua desionizada.
- Cuando vaya a iniciar la determinación de fósforo, transfiera una alícuota de 25 mL de blanco y estándares, adicione 4 ml del reactivo combinado al blanco y estándares mezcle completamente, después de mínimo 10 minutos, pero antes de 30 minutos, lea en el espectrofotómetro.
- Para iniciar las lecturas fotométricas, coloque el blanco de reactivos en la celda, léalo como blanco, verifique la observación de una línea recta horizontal en el rango de la longitud de onda de los 880nm, inmediatamente léalo como estándar y como muestra y codifíquelo como BLANCO, la absorbancia debe registrar cifras exponenciales de 10^{-3} y 10^{-4} , continúe con los estándares en orden creciente desde los de más baja concentración, léalos como estándares y enseguida como muestras. La gráfica de absorbancia contra concentración de fosfato da una línea recta que pasa por el origen.



- Almacene los datos en la carpeta del año correspondiente, en la subcarpeta Fósforo Soluble. Grabe la curva, los estándares y las muestras de dicha curva de calibración, archivándola por la fecha en que se realizó, dos dígitos para día, mes y año (dd/mm/aa), en las carpetas Curvas, Estándares y Muestras respectivamente. Imprima el reporte en papel y entréguelo al encargado de la auditoria de verificación.

10.2 Procesamiento de la muestra

- Solicite las muestras a analizar diligenciando el formato AF0061.
- *Filtración preliminar.* Filtre las muestras para la determinación de fósforo disuelto reactivo, a través de membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm . Las muestras de difícil filtración filtrelas 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, prepare un blanco de la muestra filtrada que presenta esta característica, adicione 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). Lea este blanco como muestra, registrando el código de la muestra y la palabra BLANCO y a continuación lea la muestra a la que se le ha adicionado el reactivo combinado completo (*especificado en el numeral 7.2.6*). Reporte 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:* Adicione a cada muestra 4,0 mL del reactivo combinado y mezcle completamente. Lea en el Espectrofotómetro teniendo en cuenta las indicaciones del numeral 10.1.
- Cuando pase un grupo de muestras corra inicialmente un blanco de reactivos, léalo como blanco y como muestra, enseguida pase 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, verifique 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).
- Almacene 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

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia		
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGÍA - GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL		
	Código: TP0094	Fecha de elaboración: 16/07/2007	Versión: 03
FÒSFORO SOLUBLE EN AGUA POR EL MÈTODO DEL ÀCIDO ASCÒRBICO		Hoja No.:	

análisis, nombre del operador, firma, nombre de la muestra, factor de dilución, concentración (mg/L) y absorbancia. Imprima el reporte en papel y entréguelo al oficial de calidad. Reporte la concentración redondeando el resultado con 2 cifras significativas.

- Por cada lote de hasta 20 muestras, se debe elegir una muestra aleatoria para leerla por duplicado, para lotes de mas de 20 muestras de debe leer una por cada 20 muestras según lo indicado en el procedimiento TP0100.
- Registre los resultados con 2 cifras significativas en la carta de control, verifique que los valores se encuentren dentro del rango de 2 (s) desviaciones estándar por encima ó por debajo, respecto del valor teórico esperado.

11. Procesamiento de datos y cálculo de resultados

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

$$\text{mg/L P- PO}_4 = \text{Pendiente} \times \text{Absorbancia}$$

Pendiente = Obtenida a partir de la curva de calibración.

Absorbancia = Lectura realizada por el espectrofotómetro.

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

Escribir el resultado con dos cifras significativas, redondeando de acuerdo a los criterios establecidos en el procedimiento de lineamientos de control de calidad analítica TP0100.

12. Control de calidad (CC) y Aseguramiento de la calidad

Los blancos se analizan para determinar si la calidad del agua y de los reactivos es óptima. Estos deben registrar absorbancias con cifras exponenciales de 10⁻³ y 10⁻⁴.

Verifique los estándares de control, si el resultado analítico cae fuera de los límites de control normales, deben revisarse 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. Analice por duplicado una por cada 20 muestras según lo indicado en el procedimiento TP0100. El porcentaje de la diferencia entre los duplicados no debe ser mayor al 10%, si la variación excede este límite, debe repetirse el análisis.



Lleve 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. Registre las iniciales del analista y la fecha de análisis en las casillas correspondientes y grafique el valor de cada estándar.

Cuando los resultados se encuentren entre el límite de alarma y control, revise todo el procedimiento para determinar que ocurre. 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 realice más análisis hasta verificar que sucede, comuníquelo la anomalía al líder de fisicoquímica, inicie nuevamente la marcha analítica cuando el líder de análisis lo ordene.

13. Referencias

Moreno Blanca Ruth. Informes de Prevalidación y Validación de fósforo soluble. IDEAM. Santafé de Bogotá. 2000.

Seoanez Mariano et al. Ingeniería del medio Ambiente aplicada al medio natural continental. Ediciones Mundiprensa. 1996. Madrid, España. p. 291-292.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 21 ed., 2005 New York.p. (Sección 4-153, 4-154).