



Servicios Laboratorio de Calidad
Instructivo de Determinación de fósforo total en agua

Código: SLC-I002
Versión: 06
Fecha: 03/07/2025

1. Objetivo

Establecer la metodología para la determinación del fósforo total en agua por el método del ácido ascórbico y digestión con ácido sulfúrico y ácido nítrico ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$), de acuerdo con el SM 4500-P B 4, E. Ed. 24th de 2023.

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 Laboratorio de Calidad Ambiental del IDEAM (LCA – IDEAM) para el recurso hídrico superficial; el rango de aplicación es de: 0,05 mg P / L – 1,00 mg P / L.

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

Tabla 1. Resultados Verificación del método

FECHA DE INFORME DE VERIFICACIÓN: 20 / 11 / 2018			
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
LÍMITE DE DETECCIÓN INSTRUMENTAL	0,018	-----	Absorbancia
LÍMITE DE DETECCION DEL MÉTODO	0,05	mg P / L	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	0,05	mg P / L	
PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE % CV	12,18	%	Nivel de concentración bajo (0,10 mg P/L)
	3,30	%	Nivel de concentración medio (0,50 mg P/L)
	4,74	%	Nivel de concentración alto (0,90 mg P/L)
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	6,90	%	Nivel de concentración bajo (0,10 mg P/L)
	0,32	%	Nivel de concentración medio (0,50 mg P/L)
	1,30	%	Nivel de concentración alto (0,90 mg P/L)
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO	0,05-1,00	mg P / L	Sin dilución de la muestra
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	77,24	%	Nivel de concentración bajo
	104,41	%	Nivel de concentración alto

Fuente: Propia, 2018.

3. Definiciones

- **Blanco de Reactivos o Blanco de Método (MB):** agua ultra pura que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia

por determinar, pero que contiene los mismos solventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra.

- **Blanco Fortificado de Laboratorio (LFB):** es una muestra de agua a la que se ha añadido una concentración conocida del analito de interés. Se utiliza para evaluar el desempeño de laboratorio, y la recuperación del analito en un blanco de matriz. Son los estándares de control de la técnica.
- **Control de Verificación Continua (CCV):** Es un blanco fortificado (estándar) que se utiliza para verificar que la calibración del equipo no se ha afectado durante el análisis de un lote de muestras.
- **Duplicado de muestra o matriz fortificada por laboratorio (LFMD):** es una segunda porción de la muestra o muestra fortificada. Si se recolecta suficiente volumen de muestra, esta segunda porción de muestra se agrega y procesa de la misma manera que el LFM. Si no hay suficiente muestra para un duplicado LFM, entonces use una porción de una muestra alternativa (duplicado) para recopilar datos sobre la precisión.
- **Exactitud:** proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando.
- **Intervalo de Trabajo:** conjunto de concentraciones del analito en la muestra dentro de las cuales el método permite obtener valores de medición confiables o adecuados para el propósito; al tratarse de un intervalo, se encuentra compuesto por un límite inferior y un límite superior o máxima concentración que puede ser cuantificada.
- **Límite de Cuantificación (LCM):** Es la concentración de analito que produce una señal 10 veces mayor que la señal del blanco, de modo que se puede cuantificar con un nivel de confianza aceptable para su propósito.
- **Límite de Detección del Método (LDM):** concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco o de 3 veces este.
- **Límite de Detección Instrumental (LDI):** Es la concentración de analito que produce una señal superior a la relación señal/ruido del instrumento.
- **Muestra (M):** cada sistema físico que sea sometido a la metodología de análisis.
- **Matriz Fortificada de Laboratorio (LFM):** es una muestra real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito de interés. Esta adición debe realizarse antes de la preparación de la muestra.
- **Niveles de detección:** Son aquellos que permiten determinar la concentración del analito, presente en la muestra.
- **Precisión:** proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.
- **Recuperación (Rec):** Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como porcentaje (% Rec)



4. Siglas

g = gramos

CCV = Control de Verificación Continua

HNO₃ = Ácido nítrico

H₂SO₄ = Ácido sulfúrico

LCM = Límite de Cuantificación del Método

LDM = Límite de Detección del Método

LFB = Blanco Fortificado de Laboratorio

LFM = Muestra Fortificada de Laboratorio

MB = Blanco de Reactivos o Blanco del Método

mg P / L = miligramos de fósforo por litro

nm = nanómetros

% Rec = Porcentaje de Recuperación

RPD = porcentaje de diferencia relativa

SM = Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

s = Desviación estándar

UV - VIS = Ultravioleta – Visible

5. Documentos relacionados en el SGI

- M-S-LC-I008 Instructivo de manejo Espectrofotómetro UV-VIS Hewlett Packard 8453.
- M-S-LC-I038 Instructivo de confirmación o validación de métodos analíticos.
- M-S-LC-I075 Instructivo Disposición final de residuos.
- M-S-LC-I051 Instructivo de Aseguramiento de Calidad Analítica.
- M-S-LC-F003 Formato Solicitud de lavado de material.
- SLC-F007 Formato Control diario del manejo de equipos.
- M-S-LC-F011 Formato entrega muestras a analistas.
- M-S-LC-F021 Formato Condiciones ambientales.
- M-S-LC-F039 Formato Solicitud de reactivos, vidriería y materiales.
- SLC-F054 Formato Captura de datos primarios.

6. Desarrollo de la actividad

6.1 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 se encuentran en el laboratorio.

Utilizar los Elementos de Protección Personal adecuados para la realización de la marcha analítica, (bata de laboratorio, zapatos antideslizantes, gafas protectoras, respirador para ácidos y guantes de nitrilo).

Tratar los residuos producto del análisis de la determinación, de acuerdo con el instructivo de disposición final de residuos, M-S-LC-I075.

Realizar la adición de los ácidos y la digestión de las muestras en la cabina extractora de vapores inorgánicos.

6.2 Equipos, Reactivos y Materiales

6.2.1 Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS con 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, y consta de lo siguiente:
 - *Sistema óptico revertido de haz sencillo.
 - *Fuente de radiación, lámpara de tungsteno.
 - *Monocromador
 - *Detectores fotodiodos y a su vez arreglo de diodos.
- Planchas de calentamiento
- Balanza analítica electrónica con resolución de 0,0001 g.
- Cabina extractora para vapores inorgánicos.

6.2.1.1 Verificación de Equipos

Comprobar que los equipos se encuentran en óptimas condiciones, antes de operarlos. Diligenciar el formato M-S-LC-F007 de control diario de manejo del equipo.

- Verificar la balanza analítica antes de realizar cualquier pesaje, de acuerdo con el Instructivo de Aseguramiento Metrológico M-S-LC-I048.
- Verificar el volumen dispensado por las pipetas y transferpipetas según el volumen requerido.

6.2.2 Materiales

- Celda de cuarzo o vidrio, según como se haya realizado la validación. En este laboratorio se utiliza celda de cuarzo cuadrada de 1 cm.
- Balones aforados clase A de 100, 200, 250 mL.
- Erlenmeyer de 125 mL.
- Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas aforadas clase A, de 4, 6, 10, 20 mL.
- Pipetas volumétricas de 5, 10 mL y 20 mL
- Transferpipeta adecuada para medir 1,8 mL. (Preparación del CCV)
- Probeta de 25 mL y 50mL.
- Pipeta Pasteur.
- Microespátula
- Papel para limpiar lentes

6.2.3 Reactivos

Solicitar los reactivos diligenciando el formato M-S-LC-F039. Etiquetar las soluciones y registrar la preparación en el formato M-S-LC-F064 Control de preparación de soluciones.

- Agua ultrapura. Usar agua ultrapura para preparar todas las soluciones y diluciones.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), concentrado.
- Ácido Nítrico (HNO_3), concentrado.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), 5N: En un vaso de precipitado de 400 mL, agregar 200 mL de agua ultrapura, adicionar lentamente y con agitación 70 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, debido a que la reacción es exotérmica, esperar hasta la solución esté a temperatura ambiente, en ese momento transferir cuantitativamente la solución a un balón de 500 mL y completar con agua ultrapura. Mantener en frasco de vidrio a temperatura ambiente.
- **Solución Stock de Fósforo de 50 mg P/L:**
 - A partir de la sal: Disolver en agua ultrapura 0,2195 g de KH_2PO_4 anhidro y diluir a 1000 mL en balón volumétrico. Almacenar en nevera a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en frasco de vidrio. 1,00 mL = 50,0 μg P-PO_4^{3-} . Cambiar la solución cada seis meses.
 - A partir de la Solución Estándar de Fosfatos de 1000 mg PO_4/L , trazable: Tomar 76,7 mL de esta solución y diluir en 500 mL en balón volumétrico. Almacenar en nevera a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en frasco de vidrio. 1,00 mL = 50,0 μg P-PO_4^{3-} . Esta solución no tiene vencimiento.

Teniendo en cuenta el siguiente cálculo:

$$95\text{g PO}_4/\text{L} \rightarrow 31\text{g P/L}$$

$$1\text{g PO}_4/\text{L} \rightarrow x$$

$$x = \frac{31}{95} = 0,326 \text{ g P/L} = 326 \text{ mg P/L}$$

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{50 \text{ mg P/L} * 500 \text{ mL}}{326 \text{ mg P/L}} = 76,7\text{mL}$$

- **Solución mezcla de Fósforo Orgánico e Inorgánico de 0,60 mg P-PO₄³⁻/L:** Esta mezcla se compone de: 300 µg hexametafosfato de sodio/L, 90 µg fósforo orgánico (ácido adenílico)/L, 0,8 mg NH₃-N/L, 5,0 mg NO₃-N/L, y 400 mg Cl⁻/L.

Primero hay que preparar por separado, soluciones concentradas de los compuestos anteriores para luego sí preparar la mezcla final. Entonces, se tomará un volumen adecuado de estas soluciones, tal que al diluir en 1000 mL obtengamos la concentración que necesitamos en la mezcla final. Preparar:

- i) Hexametafosfato de sodio: Pesar 30 mg y llevar a 1 litro.
- ii) Ácido adenílico: Pesar 22,5 mg y llevar a 250 mL.
- iii) Cloruro de amonio: Pesar 0,0955 g y llevar a 100 mL.
- iv) Nitrato de potasio: Pesar 0,1804 g y llevar a 100 mL.
- v) Cloruro de sodio: 0,3280 g.

Preparación de la mezcla final de fósforo orgánico e inorgánico de 0,60 mg P-PO₄³⁻/L:

En un balón de 1 litro adicionar: 5 mL de la solución i) hexametafosfato de sodio; 0,5 mL de la solución ii) ácido adenílico; 1,6 mL de la solución iii) cloruro de amonio; 10 mL de la solución iv) nitrato de potasio y 0,3280 g de Cloruro de Sodio. Mezclar muy bien y aforar.

- **Fenolftaleína en solución alcohólica:** Disuelva 1 g de fenolftaleína en 100 mL de alcohol etílico y adicione 100 mL de agua ultrapura.
- **Hidróxido de sodio, NaOH 10 N:** Disuelva 400 g de NaOH en un vaso de precipitado de un litro, lleve a temperatura ambiente y complete a un litro con agua ultrapura, en un balón clase B.
- **Solución de Tartrato de Antimonio y Potasio:** Disolver 0,6858 g de K(SbO)C₄H₄O₆·½H₂O en 200 mL de agua ultrapura, en un balón aforado de 250 mL llevar a volumen. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio por un período 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 ultrapura. Almacenar refrigerado en frasco de vidrio por un periodo 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 ultrapura. 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. Preparación Reactivo Combinado

Número de muestras aprox.	Volumen preparado (mL)	H ₂ SO ₄ 5 N (mL)	Solución de Tartrato de Antimonio y Potasio (mL)	Solución de Molibdato de Amonio (mL)	Ácido ascórbico 0,1 M (mL)
7	30	15	1,5	4,5	9
10	40	20	2	6	12
12	50	25	2,5	7,5	15
20	80	40	4	12	24
25	100	50	5	15	30

Fuente: SM 4500-P E

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.

6.2.3.1 Procedimiento de Preparación de Estándares

- **Estándares de la curva de calibración**

A partir de la solución patrón de fosfato de 50 mg P/L, preparar el estándar intermedio de 10 mg P/L para la preparación posterior de las concentraciones indicadas en la Tabla 3, con las cuales se debe elaborar la curva de calibración.

Tabla 3. Preparación de estándares de calibración

Tomar de:	Solución stock de 50 mg P/L	Solución intermedia de 10 mg P/L	Solución estándar de 1,0 mg P/L	Volumen final
Para preparar:				
Solución intermedia de 10 mg P/L	20 mL	-----	-----	100 mL
Estándar de 1,0 mg P/L	-----	10 mL	-----	100 mL
Estándar de 0,80 mg P/L	4 mL	-----	-----	250 mL
Estándar de 0,50 mg P/L	-----	10 mL	-----	200 mL
Estándar de 0,30 mg P/L	-----	6 mL	-----	200 mL
Estándar de 0,10 mg P/L	-----	-----	20 mL	200 mL
Estándar de 0,05 mg P/L	-----	-----	10 mL	200 mL

Fuente: Propia, 2018

Nota: Preparar una curva de calibración cada vez que cambie la solución stock.

• **Límite de Cuantificación del Método (LCM) y estándar de Control de Verificación Continua (CCV):**

El LCM es 0,05 mg P/L, este se prepara como se describió en la tabla anterior (Tabla 3) y el CCV es de 0,45 mg/L y se prepara tomando 1,8 mL del stock de 50 mg/L y llevando a 200 mL con agua ultrapura. (Tabla 4)

Tabla 4. Preparación del LCM y del CCV

Tomar de:	Solución stock de 50 mg P/L	Solución estándar de 1,0 mg P/L	Volumen final
Para preparar:			
LCM: 0,05 mg P/L	-----	10 mL	200 mL
CCV: 0,45 mg P/L	1,8	-----	200 mL

Fuente: Propia, 2024

El LCM tiene una aceptación de hasta el 50% de error, pero el error permitido para el CCV debe ser $\leq 10\%$.

6.3 Limitaciones e interferencias

- La presencia de turbidez y color en la muestra debe corregirse elaborando un blanco de muestra. Ver numeral 6.6.3 de este instructivo.
- 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.
- 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.
- Cromo hexavalente y nitritos interfieren en los resultados 3% más bajo en concentraciones de 1 mg/L y de 10 a 15% más bajos en concentraciones de 10 mg/L.
- Sulfitos y silicatos no interfieren en concentraciones de 1,0 a 10 mg/L.
- No se encontró en la literatura metodología para corregir las anteriores interferencias.

6.3.1 Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad permanentes en el laboratorio no interfieren en el desarrollo adecuado de la determinación de fósforo reactivo disuelto. En el área de análisis se cuenta con un termo higrómetro para registrar temperatura y humedad diariamente y se registran en el Formato condiciones ambientales M-S-LC-F021.

6.4 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 5. Control de Calidad Método 4500-P B, E

Límite de Detección del Método	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	X	3

Fuente: SM Tabla 4020: I

⁽³ Consulte 4020 B 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} .
- Con cada lote de muestras se debe correr el LCM que para este caso es de 0,05 mg P/L y el CCV de 0,45 mg P/L. El LCM tiene una aceptación de hasta el 50% de error y el error permitido para el CCV es de máximo el 10%.
- Llevar los registros de los controles de LCM y CCV en las cartas de control relacionadas en el Instructivo de Calidad Analítica.
- Los límites de recuperación para fósforo total corresponden al promedio de 20 datos más 3 veces la desviación estándar y representados en % Rec:
Límite Superior de Control (LSC) = prom + 3s
Límite Inferior de Control (LIC) = prom – 3s
- El LFM debería ser igual al LFB para poder ver las diferencias por efecto de la muestra con respecto al blanco fortificado. Pero hay que tener en cuenta que el resultado final esté dentro de la curva de calibración en lo posible.
- Procesar el fortificado de matriz y su duplicado con cada lote de muestras.
- Incluir un duplicado para cada tipo de matriz con cada lote de 20 muestras o menos. El porcentaje de diferencia relativa (RPD) de los duplicados no debe ser mayor al 10%; si la variación excede este límite, repetir el análisis para el grupo de muestras contraladas por este duplicado.
- Los duplicados evalúan la limpieza del material de vidrio, la purga adecuada de la celda y la repetibilidad del método.
- También se debe leer la mezcla de fósforo orgánico descrita en el numeral 6.2.2 Reactivos. El tiempo de vigencia de la solución o mezcla, aún no se ha comprobado. Se sugiere pasarla con cada lote de muestras mientras se determina su vencimiento. De acuerdo con los resultados obtenidos, se

puede sugerir que cada 15 días o cada dos lotes o una vez al mes, se realiza una lectura de esta solución.

- Cuando los resultados se encuentren entre el límite de alarma y control, revisar todo el procedimiento para determinar qué 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 controlado por el estándar que no cumplió. No realizar más análisis hasta verificar qué sucedió, comunicar la anomalía al Líder de fisicoquímica. Repetir iniciar nuevamente la marcha analítica cuando el Líder de fisicoquímica lo indique.
- Tomar las acciones respectivas en el caso que se presenten tendencias de datos en la carta de control, de acuerdo con lo definido en el Instructivo de Aseguramiento de Calidad Analítica.

6.5 Desarrollo

6.5.1 Principio

El fósforo total (P) se determina en una muestra sin filtrar y en ella están presentes todas las formas de fósforo. Debido a que el fósforo puede estar presente en combinación con la materia orgánica, es necesario para determinar el fósforo total, preparar la muestra mediante un método de digestión capaz de oxidar la materia orgánica efectivamente, para liberar el fósforo como orto fosfato, para su posterior determinación por el Método del Ácido Ascórbico. La concentración de fósforo total se registra como mg P / L.

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 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 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 entonces Ministerio de Protección social, Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en el artículo 7, cuadro 4, se especifica un valor máximo admisible de 0,5 mg/L, expresado como fosfatos, como criterio de calidad para agua para consumo humano con implicaciones sobre la salud.

6.5.2 Toma y preservación de muestras

Colectar las muestras en envases de plástico o vidrio y preservarlas con ácido sulfúrico concentrado hasta un $\text{pH} < 2$. Las muestras así preservadas tienen un tiempo máximo de espera para el análisis de 28 días.

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.

6.5.3 Limpieza de vidriería y material de campo

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 y plástico M-S-LC-I015.

Utilizar la vidriería a la que se le haya efectuado control de calidad y reservar esta vidriería únicamente para las determinaciones de Fósforo Total.

6.5.4. Ejecución de la técnica

6.5.4.1. Digestión de muestras

Para la determinación de fósforo total, realizar hidrólisis ácida preliminar a los blancos, estándares y muestras:

- Transferir a un Erlenmeyer de 200 o 250 mL, 50 mL de la muestra bien mezclada; adicionar en la cabina extractora de inorgánicos 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 mL de ácido nítrico concentrado.
- Colocar las muestras sobre las planchas de calentamiento en la cabina extractora de vapores ácidos, graduarlas en un valor de calentamiento de 15, vigilar constantemente para que no se evaporen totalmente; inmediatamente salgan humos blancos es el momento de finalizar la digestión hasta un volumen final de 1,0 mL.
 - En algunas muestras en este punto se puede formar un precipitado u observarse la presencia de sólidos finos, es decir la muestra no está bien digerida. En este caso, diluir la muestra 2 ó 5 veces y realizar nuevamente la digestión. Tener en cuenta de rotular el valor de las diluciones, en todos los pasos.
- Cuando finalice la digestión, dejar enfriar las muestras dentro de la cabina extractora de vapores inorgánicos y con un frasco lavador de orificio fino enjuagar las paredes del erlenmeyer con agua ultrapura, hasta un volumen que no sobrepase los 30 mL; adicionar 0,05 mL (1 gota) de solución indicadora de fenolftaleína y llevar hasta un color rosa profundo con NaOH

10N. Posteriormente neutralizar con ácido sulfúrico 5N, hasta desaparición del color.

- Transferir la solución neutralizada, filtrando si es necesario para eliminar el material particulado o la turbidez, a un balón aforado de 50 ml. Añadir los lavados del filtro al balón y completar el volumen. Agitar varias veces para una perfecta homogenización.
- La muestra ya está lista para la determinación de fósforo por el Método del ácido ascórbico. (Ver 6.6.3 Análisis de la muestra)
- Cuando en una muestra observe una buena digestión, pero ésta presenta algo de color o turbidez, realizar corrección de turbidez (Ver 8.4.3), en el momento de la lectura en el espectrofotómetro.

6.5.4.2. Curva de Calibración

La curva de calibración se realiza con estándares preparados con agua ultrapura o Tipo I, por tal motivo la digestión siempre va a ser total y sin color ni turbiedad.

Con los estándares preparados en el numeral 5.2.1.1 proceder de la siguiente forma:

- Encender el espectrofotómetro UV-VIS con la lámpara de tungsteno (roja en el equipo) 50 minutos antes de iniciar las lecturas. La lectura de fósforo total debe hacerse a 880 nm.
- Verificar que la celda de 1 cm esté perfectamente limpia; si esta manchada de color azul, dejarla en jabón libre de fósforo y enjuagar perfectamente con agua desionizada. Si continúa manchada lavarla con ácido sulfúrico 5 N y enjuagar con agua desionizada.
- Para leer una curva nueva se debe crear un método. Para el manejo detallado del equipo remitirse al documento M-S-LC-I008 Instructivo Espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos, HP 8453. Ver además el Anexo 2 de este documento.
- Transferir una alícuota de 25 mL del blanco y de los estándares ya digeridos, a erlenmeyer rotulados. Adicionar 4 mL del reactivo combinado al blanco y a cada uno de los estándares; mezclar completamente para el desarrollo del color azul, y 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** para verificar la observación de una línea recta horizontal en el rango de la longitud de onda de los 880 nm sin interferencias de señal. De presentarse alguna alteración, volver a hacer la lectura como blanco, hasta que sea normal.

- Leer el blanco como **estándar** y como **muestra** y codificar como **blanco**. La absorbancia debe registrar cifras exponenciales de 10^{-3} y 10^{-4} . Si no se cumple, volver a leer como estándar y como muestra.
- Leer los estándares en orden creciente, como **estándares** y enseguida como **muestras**. La gráfica de absorbancia contra concentración de fósforo da una línea recta que pasa por el origen.
- El equipo solicita la rotulación de cada muestra, que debe indicar el valor nominal del estándar, con las unidades.
- Almacenar los datos en la carpeta del año correspondiente, en la subcarpeta Fósforo total. Para grabar la nueva curva se debe guardar en tres carpetas: **Método, Estándares y Muestras** con la fecha en que se realizó el análisis **aaaa/mm/dd**
- Antes de aceptar los datos, hacer la verificación de Control y aseguramiento de calidad, numeral 7 de este instructivo.
- Imprimir el reporte como **método** y también como **resultados**.
- Entregar al encargado de la auditoria de verificación.
- Registrar con la fecha los datos sobre la curva de calibración aprobada por la auditoría de verificación en el seguimiento respectivo que realiza el laboratorio.

6.5.4.3. Análisis de la Muestra

Solicitar las muestras a analizar con el suficiente tiempo para que se aclimaten.

- **Pretratamiento de la muestra.** Realizar la digestión (Ver numeral 6.6.1).
- **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 que presenta esta característica, adicionar a 25 mL de muestra, 4mL 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.
- **Muestra Fortificada de Laboratorio (LFM) y su duplicado.** Escoger una muestra con suficiente volumen para realizar el fortificado, teniendo en cuenta que la adición no sobrepase en concentración, el 50% del rango de la curva. El volumen de adición no puede pasar el 5% del volumen total de la muestra. El duplicado se sirve de este mismo balón y la Diferencia Porcentual Relativa (RPD) entre el fortificado y su duplicado no deben sobrepasar el 10%.

- El LFM debería ser igual al LFB para poder ver las diferencias por efecto de la muestra con respecto al blanco fortificado. Pero hay que tener en cuenta que el resultado final esté dentro de la curva de calibración en lo posible.

Tabla 6. Preparación de matriz fortificada

Para preparar	Tomar	Volumen final de muestra
0,05 mg P/L	1 mL de 10 mg P/L o 10 mL de 1,0 mg P/L	200 mL
0,25 mg P/L	5 mL de 10 mg P/L	200 mL
0,45 mg P/L	1,8 mL de 50 mg P/L	200 mL

Fuente: Propia, 2024

Nota: Como LFM debería ser igual al LFB, se sugiere 0,05 mg P/L y 0,45 mg P/L. La de 0,25 mg P/L se coloca para casos en los que al adicionar 0,45 mg P/L se sale de la curva de calibración y 0,05 mg P/L es muy bajito y no se alcanza a ver el efecto de la matriz.

- Antes de iniciar con el procesamiento de muestras:**
 - 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 total debe hacerse a 880 nm. Cargar la curva correspondiente a la última curva de calibración.
 - Verificar que la celda de vidrio de 1 cm esté perfectamente limpia; si está manchada de color azul, dejarla en jabón libre de fósforo y enjuagar perfectamente con agua desionizada. Si continúa manchada lavarla con ácido sulfúrico 5N y enjuagar con agua desionizada.
 - Para leer un grupo de muestras utilizar la última curva de calibración del método. Para el manejo detallado del equipo remitirse al documento M-S-LC-I008 Instructivo Espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos, HP 8453. Ver además el Anexo 2 de este documento.
- Procesamiento y lectura de las muestras.**
 - Transferir una alícuota de 25 mL del blanco, del LCM, CCV y de cada muestra ya digeridos, en erlenmeyers de 125 mL y adicionar a cada uno 4,0 mL del reactivo combinado, mezclar completamente para el desarrollo del color azul y después de mínimo 10 minutos, pero antes de 30 minutos, leer en el espectrofotómetro.
 - Al pasar un grupo de muestras, correr inicialmente un blanco de reactivos, leer como blanco verificar la observación de una línea recta horizontal en el rango de la longitud de onda de los 880 nm sin interferencias de señal. Volver a leer el blanco como muestra. La absorbancia debe registrar cifras exponenciales de 10^{-3} y 10^{-4} . Etiquetar la lectura en el software como blanco.
 - Continuar la lectura del LCM, CCV, las muestras, un duplicado de muestra, un fortificado de muestra, duplicado del fortificado y una mezcla de fósforo orgánico e inorgánico. Leer cada uno como muestra. Etiquetar la lectura

en el software con el valor de los controles LCM, CCV o con el consecutivo de muestra, según corresponda.

- Si las muestras presentan color o turbidez, se debe hacer corrección preparando un blanco de muestra cómo se describió anteriormente, en este mismo numeral.
- Utilizar el duplicado de muestra y el fortificado con su duplicado como controles de grupos de veinte muestras, en cada lote.
- Verificar que la absorbancia de la muestra no sobrepase el rango de absorbancia obtenida en la curva de calibración para el estándar de más alta concentración (1,0 mg/L). Si esto sucede se debe realizar dilución de la muestra.
- Grabar los resultados en la carpeta **Muestras**. El nombre de los archivos va a ser la fecha en que se realizó la lectura de las muestras en formato dd/mm/aaaa. En esta carpeta queda registrado el nombre del analito, nombre del método, archivo (fecha) de la curva, ecuación de calibración, Límite de Cuantificación/detección del método, fecha y hora del análisis, nombre del operador, firma, nombre de la muestra, factor de dilución, concentración (mg/L) y absorbancia.
- Imprimir el reporte como resultados en el formato SLC-F054 Captura de datos primarios.
- Realizar el redondeo de las lecturas con cuatro cifras significativas, máximo tres cifras decimales, de acuerdo con lo contenido a este respecto en el Instructivo de Aseguramiento de Calidad Analítica M-S-LC-I051.
- **Actividades finales:**
 - Apagar la lámpara y el equipo, si no es requerido para otra técnica analítica.
 - Enjuagar el material y dejarlo en la zona de lavado; diligenciar el formato de solicitud de lavado de material M-S-LC-F003.
 - Diligenciar el formato de recepción de muestras y control de análisis M-S-LC-F002 con la fecha de realización de análisis y firma del analista responsable de la técnica.
 - Colocar el formato en el AZ correspondiente de la técnica analítica para la revisión de los resultados del líder físico-químico y el visto bueno de la calidad del resultado.
 - Registrar los resultados en las cartas de control digitales, verificar que los valores se encuentren dentro de los límites de control. Escribir las observaciones del comportamiento del estándar en las cartas de control en el formato de captura de datos.
 - Registrar los datos obtenidos en la carpeta digital de correlación de variables FOSFORO.xls, en la columna de Fósforo Total y la fecha en que se digitan estos resultados.
 - Una vez los resultados estén revisados y aprobados, digitar el registro de los resultados en la base de datos del IDEAM.

- Realizar las observaciones que sobre Control y aseguramiento de calidad se han definido en este instructivo y en el Instructivo de Aseguramiento de Calidad Analítica.

6.5.4.4. Cálculos y Resultados

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

$$\frac{mgP}{L} = \frac{1}{m} * Absorbancia * FD$$

Donde:

m = Pendiente, obtenida a partir de la curva de calibración.

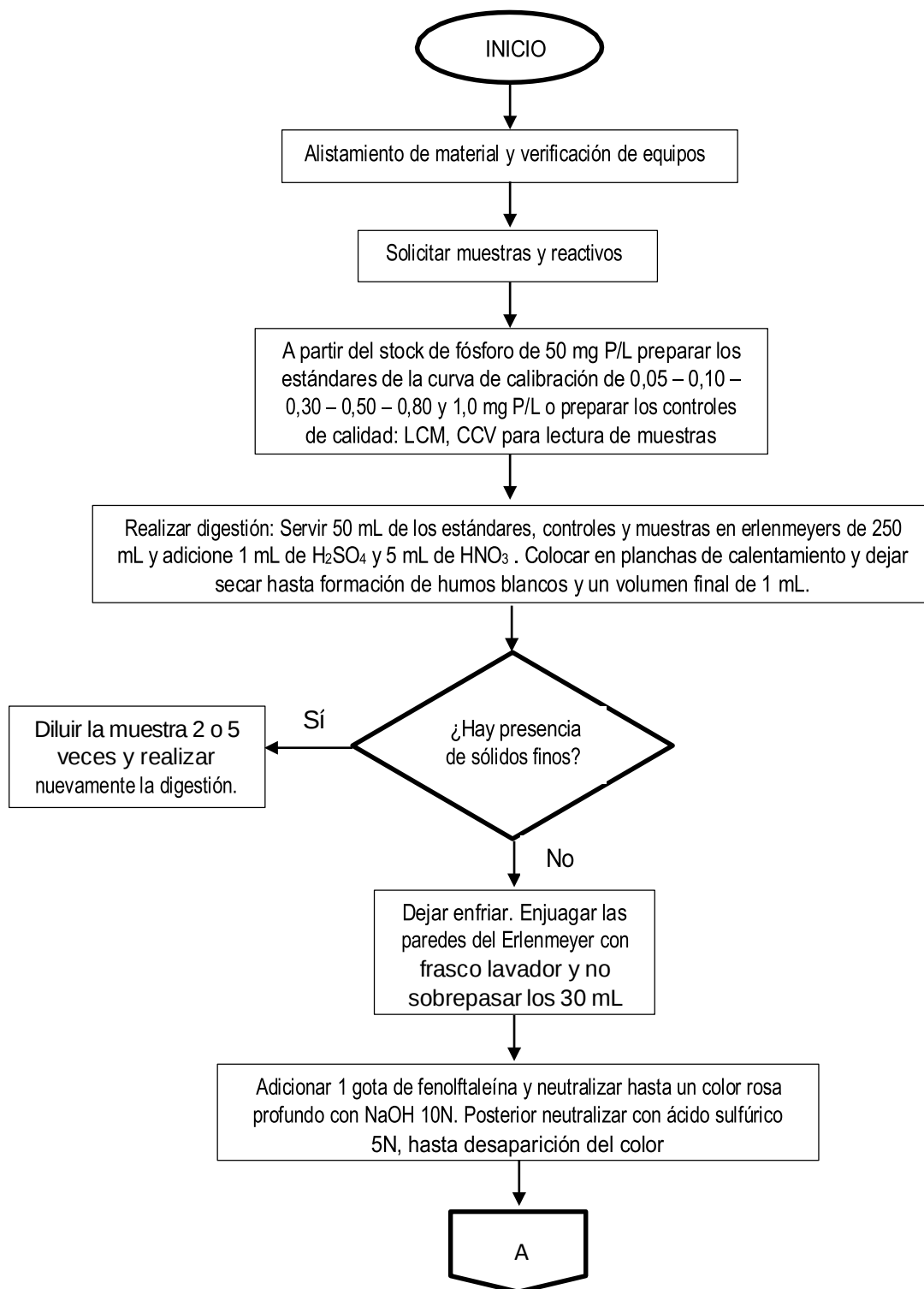
Absorbancia = Lectura realizada por el espectrofotómetro.

mgP/L = Concentración de fósforo calculada y registrada por el espectrofotómetro UV-VIS.

FD = factor de dilución.

6.6. Diagrama

Imagen 1. Diagrama de flujo – Marcha analítica.



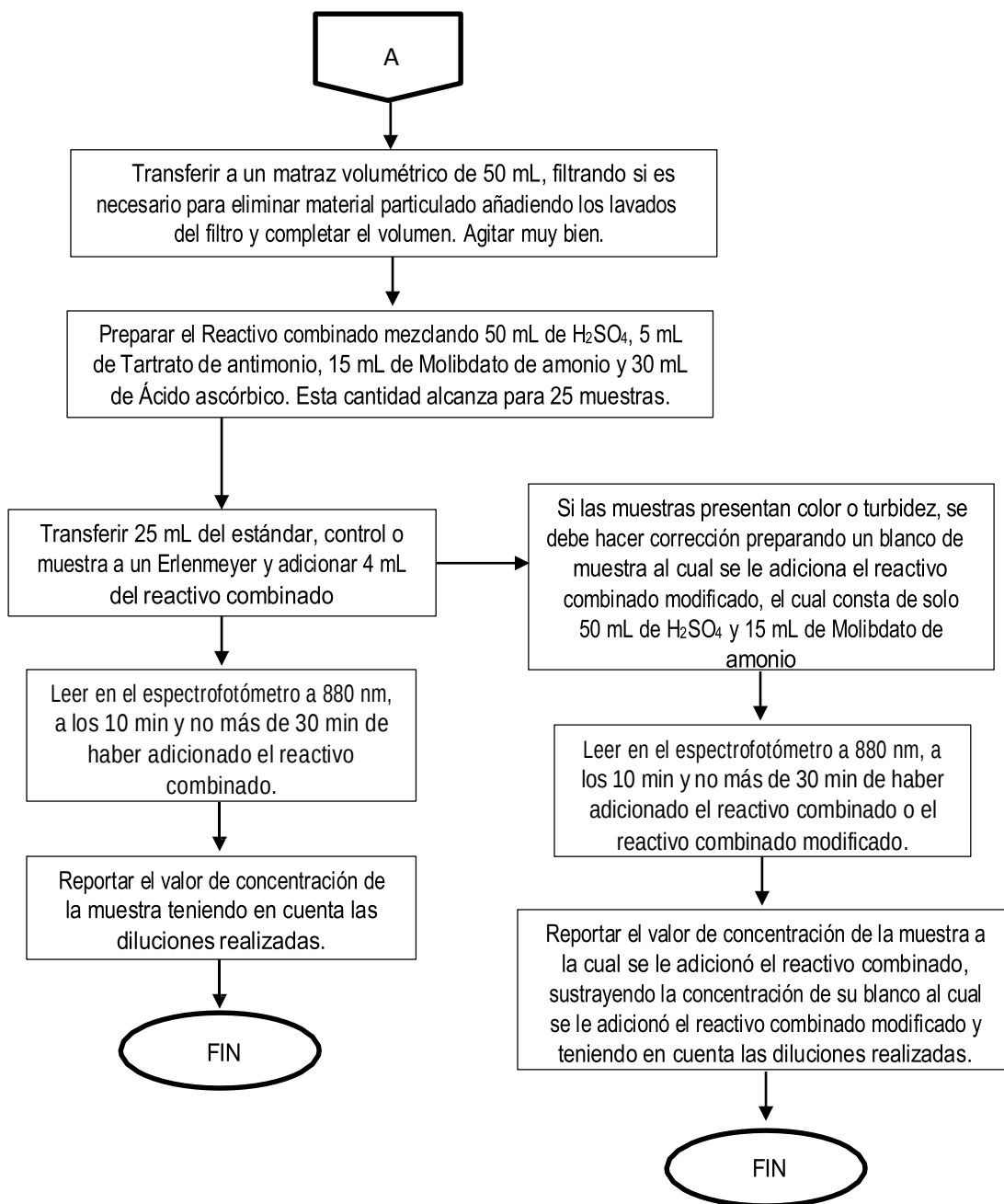
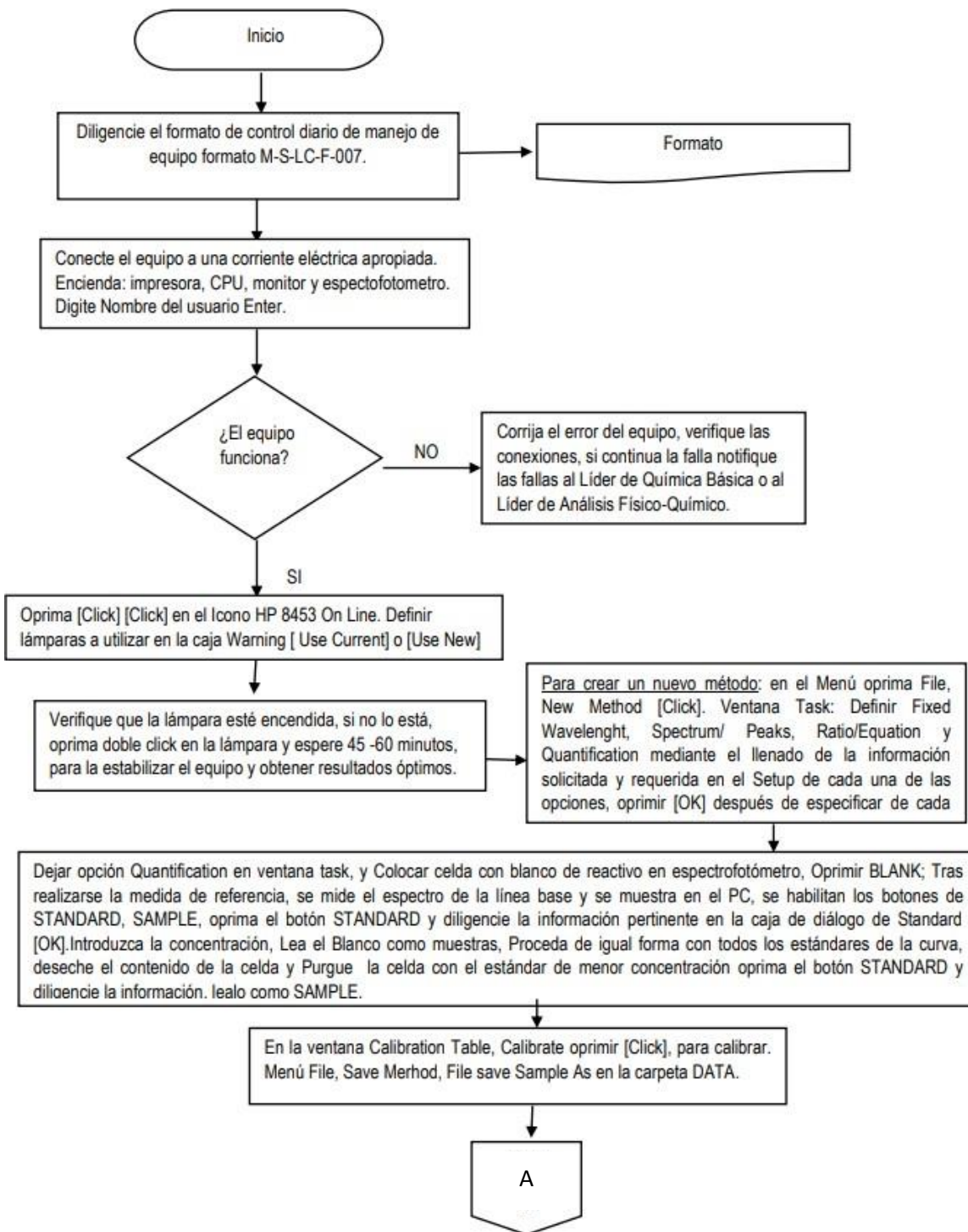
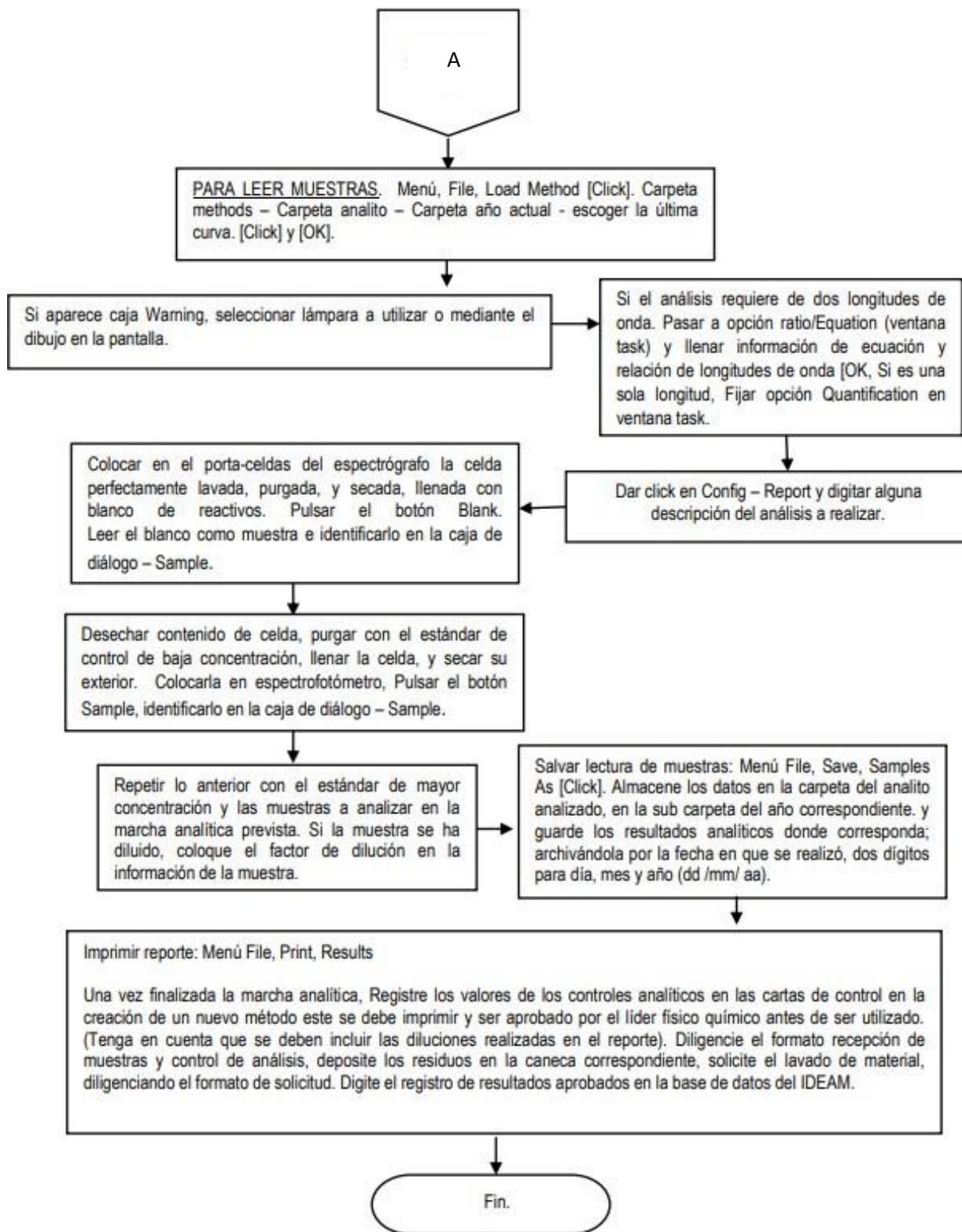


Imagen 2. Diagrama de flujo – Manejo del equipo.





	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo de Determinación de fósforo total en agua	Código: SLC-I002 Versión: 06 Fecha: 03/07/2025
--	--	--

6.7. Documentos Relacionados

- APHA AWWA WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 24th Edition. Washington, DC. 2023. Chapters 4020 and 4500-P B 4, E.

7. Control de cambios

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	14/12/2017	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI
02	15/04/2020	En el ítem 5.2 y 5.2.1.2 y 7, se incluye el uso de la Solución Mezcla Fósforo Orgánico e Inorgánico, de igual forma el control de calidad del límite de cuantificación el cual se debe correr con cada lote de muestras, en el 8.4.3 el redondeo y reporte de las cifras significativas, se modifica el cargo que aprueba el documento, de Subdirector de Hidrología por Coordinador Laboratorio de Calidad Ambiental
03	21/10/2020	Nueva versión producto de la actualización de la documentación del Sistema Integrado de Gestión.
04	22/03/2021	Actualización de versión y funcionarios encargados de revisar y aprobar el presente instructivo.
05	06/11/2024	Se actualiza a la nueva edición del SM, 24th Edition, 2023. Se modifica el título del instructivo complementándolo. Se corrige y completa la tabla de resultados de la validación. Se corrigen unidades en todo el documento. Se adicionan todas las definiciones en el numeral 3 y se agregan siglas en el numeral 4. En el numeral 6.2.1 se eliminan las marcas de los equipos. En 6.2.1 y 6.2.1.1 se colocó el diligenciamiento de formatos. En 6.2.1.1 también se adicionó la preparación del stock de 50 mg P/L a partir de la solución trazable de 1000 mg PO ₄ /L y los cálculos respectivos. Se cambia la concentración de la mezcla de fósforo orgánico e inorgánico y se describe su preparación. Se complementa la Tabla 2, Preparación reactivo combinado y se cambia el nombre de la tabla. Se cambia la Tabla 3 Preparación de estándares de calibración y su nombre. En 6.2.2.1 se elimina la preparación de los estándares de control de 0,1 y 1,0 mg P/L y se coloca la preparación del LCM y un CCV en la Tabla 4 y se adiciona el % de error aceptado en cada caso. Los numerales 6.3 y 6.3.1 se complementan. En el numeral 6.4 se cambian los controles de calidad y se adiciona el % de error aceptado en cada caso. Se adicionan los límites de recuperación. Se adiciona el control de la mezcla de fósforo orgánico e inorgánico. El numeral 6.5.2 se complementa. En 6.6.1. Se complementa con la filtración de la muestra después de la neutralización, cuando sea necesario. El numeral 6.6.2 se complementa y corrige. Numeral 6.6.3 Se establecen criterios para el Fortificado de matriz y su duplicado, se cambian las concentraciones y se adiciona el %RPD. También, se complementa con otros detalles y se adiciona Actividades finales. Numeral 8.6 se corrige la fórmula de cálculo. En el numeral 9 el Anexo 1 Diagrama de flujo – Marcha analítica se modifica y se agrega el Anexo 2 Diagrama de flujo – Manejo del equipo. Numeral 10 se corrige bibliografía y se adicionan otros documentos. Migración a nueva plantilla SGI y cambio en numerales del documento.

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo de Determinación de fósforo total en agua		Código: SLC-I002 Versión: 06 Fecha: 03/07/2025
06	03/07/2025	Se actualiza el Formato de acuerdo con el memorando enviado por la OAP memorando 20251100097283 lineamientos para la actualización documental en el marco de la implementación del aplicativo suite visión. El código pasa de M-S-LC-I002 a SLC-I002.	