

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

1. Objetivo

Establecer la metodología para la determinación de nitritos por el método espectrofotometría según S.M. 4500-NO₂⁻ B, Ed. 24 de 2023.

2. Alcance

Este método es aplicable a aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas. Esta técnica se aplica en el Laboratorio de Calidad Ambiental para el recurso hídrico superficial, en un rango de concentraciones entre 0.006 y 0.20 mg N-NO₂⁻/L.

En la tabla 1 se pueden observar los resultados obtenidos en las confirmaciones del método en los espectrofotómetros Hewlett Packard, Thermo Scientific Evolution Array y Merck Spectroquant Prove 600:

:

Nota: *HP: Espectrofotómetro Hewlett Packard, **T: Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution Array, ***M: Espectrofotómetro Merck Spectroquant Prove 600.

Tabla 1. Resultados de verificación del método.

CÓDIGO DEL INSTRUCTIVO DE ENSAYO: SLC-I034					
FECHA DE INFORME: *HP: 28/06/ 2018 **T y ***M: 06/2023					
PARÁMETRO	*HP	**T	***M	UNIDADES	OBSERVACIÓN
Límite de cuantificación del método	0.006	0.006	0.006	mg N-NO ₂ ⁻ /L	
Precisión en término de % CV	1.88	2.57	7.73	%	Std bajo 0.010 mg N-NO ₂ /L
Precisión en término de % CV	0.17	1.64	2.65	%	Std medio 0.10 mg N-NO ₂ /L
Precisión en término de % CV	0.53	0.73	0.97	%	Std alto 0.18 mg N-NO ₂ /L
Exactitud expresada como % de error relativo	1.13	8.3	1.11	%	Std bajo 0.010 mg N-NO ₂ /L
Exactitud expresada como % de error relativo	0.35	3.74	4.8	%	Std medio 0.10 mg N-NO ₂ /L
Exactitud expresada como % de error relativo	0.14	1.89	0.56	%	Std alto 0.18 mg N-NO ₂ /L

PARÁMETRO	*HP	**T	***M	UNIDADES	OBSERVACIÓN
Intervalo de trabajo (Lectura Directa)	0.006-0.20	0.006-0.20	0.006-0.20	mg N - NO ₂ - /L	Sin dilución de la muestra
Intervalo de aplicación del método	0.006-0.20	0.006-0.20	0.006-0.20	mg N - NO ₂ - /L	Con la mayor dilución posible o aceptable
Recuperación expresada como %	85.69	104.5	108.0	%	Nivel adicionado bajo
Recuperación expresada como %	98.83	96.27	101.67	%	Nivel adicionado alto

Fuente: Propia.2024

3. Definiciones

- **Espectrofotómetro:** Instrumento de análisis químico el cual proyecta un haz de luz monocromática través de una muestra y mide la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra.
- **Blanco de reactivos o Blanco de Método (MB):** Agua tipo I 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 (LFB):** es una muestra de agua grado reactivo 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 una matriz en blanco. (El LFB hace referencia a los estándares de control de la técnica).
- **Matriz fortificada: (LFM):** Es una porción adicional de una muestra a la que se añade una cantidad conocida del analito de interés. Se utiliza para evaluar la recuperación del analito en una matriz de la muestra (Muestra adicionada). (LFMD): Duplicado de la matriz fortificada.

4. Siglas

- **mg N - NO₂ - /L:** miligramos de nitrógeno en la forma de nitrito por litro.
- **UV – VIS:** Ultravioleta – Visible.
- **RPD:** Diferencia porcentual relativa.
- **CCV:** Verificación continua de la calibración.
- **LCM:** Límite de Cuantificación del Método.
- **LDM:** Límite de Detección del Método.
- **S.M.:** Standard Methods.
- **QC:** Control de calidad.
- **REC:** Recuperación.
- **RSD:** Desviación estándar relativa

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

5. Documentos relacionados en el SGI

- E-SGI-ST-P003 Procedimiento de actividades de alto riesgo
- M-S-LC-I008 Instructivo de manejo Espectrofotómetro UV-VIS Hewlett
- Instructivo manejo espectrofotómetro UV-VIS THERMO
- SCIENTIFIC EVOLUTION ARRAY
- M-S-LC-I061 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis con lámpara de Xenón Merck Spectroquant Prove 600
- SLC-I094 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution Array
- M-S-LC-I015. Instructivo lavado material de vidrio y plástico
- M-S-LC-I048 Instructivo de aseguramiento metrológico
- M-S-LC-I051 Instructivo de aseguramiento de calidad analítica
- M-S-LC-I075 Instructivo disposición final de residuos
- SLC-F007 Formato control diario de manejo del equipo
- M-S-LC-F011 Formato entrega de muestras analistas
- M-S-LC-F014 Formato rótulos de reactivos
- M-S-LC-F021 Formato de condiciones ambientales
- M-S-LC-F039 Formato solicitud de reactivos, vidriería y materiales
- SLC-F054 Formato captura de datos primarios
- SLC-F064 Formato control de preparación de soluciones

6. Desarrollo de la actividad

6.1. Aspectos de salud y seguridad laboral

Antes de iniciar el análisis, revisar el E-SGI-ST-P003 Procedimiento de actividades de alto riesgo y las hojas de seguridad de los reactivos. Utilizar los elementos de protección personal adecuados para la realización de la marcha analítica (bata de laboratorio, zapatos antideslizantes, gafas protectoras y guantes de nitrilo). Los residuos producto del análisis se tratan de acuerdo con el documento M-S-LC-I075 Instructivo disposición final de residuos.

6.2. Equipos, reactivos y materiales

6.2.1. Equipos

- Espectrofotómetro: UV-VIS, para usar a 543 nm. Celda de cuarzo de 1cm.
- Balanza analítica

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

- pH metro.
- Equipo de filtración al vacío

6.2.2. Verificación de Equipos

- Comprobar que los equipos se encuentran en óptimas condiciones, antes de operarlos. Diligenciar el formato SLC-F007 de control diario de manejo del equipo.
- Dejar estabilizar el espectrofotómetro de acuerdo con el manual de uso.
- Verificar la balanza analítica con las masas antes de realizar cualquier pesaje de acuerdo con el documento M-S-LC-I048 Instructivo de aseguramiento metrológico y M-S-LC-I066 Instructivo de manejo balanzas analíticas.
- Verificar el volumen dispensado por las pipetas según el volumen requerido.

6.2.3. Materiales

- Micro espátula.
- Filtros de membrana de acetato de celulosa de 0.45 micras.
- Prefiltros de fibra de vidrio (para muestras muy turbias)
- Balón aforado de vidrio clase A de 100, 200, 250 mL y 1L.
- Vasos de precipitados de 10, 50, 100, 200 mL.
- Erlenmeyer de 125 mL.
- Pipetas aforadas clase A de 2, 4, 5, 10, 20 y 25 mL.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Probeta de 25 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Pera de succión
- Barra agitadora.
- Celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Papel de arroz.

6.2.4. Reactivos

Solicitar los reactivos, vidriería y material 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 tipo I: Agua libre de nitritos. Agua tipo I.

- **Reactivo de color (NEDA):** A 800 mL de agua tipo I, añadir 100 mL de ácido fosfórico al 85% y 10 g de sulfanilamida. Después de disolver completamente la sulfanilamida, añadir 1 g de diclorhidrato de N- (1-naftil) -etilendiamina. Mezclar para disolver, luego diluir a 1 L con agua. La solución es estable aproximadamente un mes cuando se almacena en una botella oscura en el refrigerador. De acuerdo con las condiciones del laboratorio de Calidad Ambiental del IDEAM si se refrigera y se mantiene en frasco ámbar, es estable seis meses.
- **Oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 0.025M (0.05N):** Disolver 3.350 g de oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), grado estándar primario, en agua y diluir hasta 1000 mL.
- **Sulfato de amonio ferroso ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.05 M (0.05N):** Disolver 19.607 g de sulfato de amonio ferroso más 20 mL de H_2SO_4 concentrado en agua y diluir hasta 1000 mL. Estandarizar como se describe en la sección 5220B.3d SM ed.24 2023
- **Ácido sulfúrico H_2SO_4 (1:1):** Tome 50 mL de agua tipo I y agregue lentamente dentro de una cabina de vapores inorgánicos 50 mL de H_2SO_4 concentrado, agite con ayuda de un agitador de vidrio y deje enfriar.
- **Permanganato de potasio (KMnO_4) estándar Titulante 0,05 N:** Disolver 1,6 g de KMnO_4 en 1 L de agua tipo I. Conservar en una botella de vidrio marrón la solución es estable durante una semana. Dejar Decantar por 24 horas o pipetear el sobrenadante sin remover ningún sedimento. Filtrar a través de lana de vidrio, nunca a través de papel filtro.
- **Estandarización del permanganato de potasio 0,05 N:** Con una precisión de 0,1 mg pesar 0,2 g de Oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) anhidro en vasos de precipitados de 400 mL. A cada vaso, a su vez, añadir 100 mL de agua tipo I, agitar para disolver. Añadir 10 mL de H_2SO_4 (1:1) y calentar rápidamente hasta 90 a 95 ° C. Titular rápidamente con solución de permanganato a normalizar, agitar hasta obtener un ligero color rosado que persista durante al menos un minuto. No dejar que la temperatura descienda por debajo de 85 °C. Si es necesario, calentar el contenido de los vasos precipitados durante la titulación; 100 mg consumirán aproximadamente 6 mL de solución. Ejecutar un blanco bajo las mismas condiciones anteriores con 100 mL de agua tipo I y 10 mL de H_2SO_4 (1:1).

$$\text{Normalidad de KMNO}_4 = \frac{g \text{ Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(A - B) \times 0,067}$$

Donde:

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

- A = mL titulante de la muestra
- B = mL titulante para blanco.
- Promediar los resultados de tres titulaciones.

6.2.4.1. Preparación de soluciones

- **Solución stock de nitritos:**

El laboratorio puede usar un estándar primario trazable de nitritos de 1000 mg N-NO₂⁻/L o preparar una solución de nitrito de 250 mg N-NO₂⁻/L a partir de NaNO₂.

- **Solución stock de nitrito de 250 mg N - NO₂⁻ /L a partir de NaNO₂:**

El NaNO₂ debe ser grado reactivo con al menos el 99% de pureza. Como el NO₂⁻ se oxida fácilmente en presencia de humedad, usar un frasco de reactivo reciente para preparar la solución patrón y guardar los frascos herméticamente tapados cuando no estén en uso. Disolver 0.6160 g de nitrito de sodio (NaNO₂) y diluir a 500 mL en balón aforado con agua tipo I, 1 mL = 250 mg/L. Almacenar esta solución en la nevera de reactivos y preservar con 1 mL de cloroformo (CHCl₃). Este patrón tiene una vida útil de 6 meses.

La solución madre se debe mantener herméticamente cerradas libre de aire cuando no esté en uso. Para determinar el contenido de NaNO₂, añadir un exceso conocido de la solución estándar de 0,05 N de KMnO₄, descargar el color del permanganato con una cantidad conocida de reductor estándar tal como oxalato de sodio 0,025 M o sulfato de amonio ferroso 0.05 M y titular posteriormente con solución de permanganato estándar.

- **Estandarización de la solución madre de nitrito:**

Pipetear, en orden, 25 mL de permanganato de potasio (KMnO₄) estándar 0,05 N, 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado y 25 mL de solución madre NO₂ en un matraz o botella con tapón de vidrio. Sumergir la punta de la pipeta muy por debajo de la superficie de la solución de ácido de permanganato mientras se agrega solución de NO₂ de stock. Agitar suavemente y calentar a 70 a 80 ° C en una placa caliente. Descargar el color de permanganato mediante la adición de porciones suficientes de 5 mL de oxalato de sodio (Na₂C₂O₄) 0.025 M (0,05 N) estándar. Titular el exceso de oxalato de sodio (Na₂C₂O₄) con permanganato de potasio KMnO₄ 0,05 N hasta el punto final rosado débil. Llevar un blanco de agua a través de todo el procedimiento, reemplazando el volumen de la solución de

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

nitritos por agua tipo I durante la titulación y hacer las correcciones necesarias en el cálculo final como se muestra en las siguientes ecuaciones.

Calcular el valor del blanco a restar (G) por medio de la siguiente fórmula:

$$G = (B \times C) - (D \times E)$$

Calcular el contenido de NO₂-N de la solución madre mediante la siguiente ecuación:

$$A = \frac{[(B \times C) - (D \times E) \times 7]}{F} \times 1000$$

Donde:

A= mg/L NO₂-N en la solución madre de NaNO₂.

B= Total mL estándar KMnO₄ utilizado,

C= Normalidad de KMnO₄ estándar.

D= Total de mL de reductor estándar añadido, (Oxalato de Sodio (Na₂C₂O₄) 0.025M).

E= Normalidad del reductor estándar

F= mL solución madre de NaNO₂ tomada para titulación.

Cada 1.00 mL de KMnO₄ 0,05 N consumido por la solución de NaNO₂ corresponde a 1725 µg de NaNO₂ o 350 µg de NO₂⁻ N.

- **Solución estándar de Nitrito de 5 mg N-NO₂⁻/L:**

A partir de Solución stock de nitrito de 250 mg N - NO₂⁻ /L: tomar 5 mL del estándar de 250 mg N - NO₂⁻/L y llevar a volumen final de 250 mL. Preparar diariamente.

A partir del Estándar primario trazable de nitritos de 1000 mg N-NO₂⁻ /L: Tomar 4.10 mL de esta solución y diluir en 250 mL en un balón volumétrico. Almacenar en nevera a 4°C ± 2°C en frasco de vidrio. Utilizar hasta agotar.

El reporte de resultado para los nitritos se expresa como mg NO₂⁻ - N/L, por tanto, se debe realizar la conversión de NO₂⁻ a N, teniendo en cuenta el siguiente cálculo:



Servicios Laboratorio de Calidad
Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría

Código: SLC-I034
Versión: 07
Fecha: 03/07/2025

- En 46 g NO₂ hay 14 g N, entonces averiguamos cuántos g de N hay en la solución de 1000 mg NO₂/L:

$$\frac{46 \text{ g NO}_2}{1 \text{ g NO}_2} \rightarrow \frac{14 \text{ g N}}{X}$$

$$X = 0.304 \text{ g N/L} = 304 \text{ mg N/L} = 304 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$$

- Ahora, para preparar 250 mL de la solución de 5 mg N-NO₂⁻/L partiendo de la solución anterior:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} = \frac{(5 \text{ mg N-NO}_2^-) \times (250 \text{ mL})}{304 \text{ mg N-NO}_2^-} = 4,11 \text{ mL}$$

- **Estándares de la curva de calibración:**

Preparar los estándares de la curva de calibración de las siguientes concentraciones 0,006 – 0,01 – 0,05 – 0,10– 0,15 y 0,2 mg N-NO₂⁻/L, tomando las alícuotas que se presentan en la Tabla 2 y llevando a volumen final con agua tipo I:

Tabla 2. Preparación de estándares de calibración.

Concentración esperada (mg NO ₂ ⁻ - N/L)	Estándar de partida (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Volumen Alícuota (mL)	Volumen final (mL)
0	Agua Tipo I	25	25
0,006	0,1	6	100
0,01	5	0,2	100
0,05	5	1	100
0,10	5	2	100
0,15	5	3	100
0,20	5	4	100

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

Fuente: Propia.2024

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

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

Preparar el LCM (0,006 mg N-NO₂⁻/L) y el CCV (0.095 mg N-NO₂⁻/L) tomando las alícuotas que se presentan en la Tabla 3 y llevando a 100 mL con agua tipo I.

Tabla 3. Límite de Cuantificación del Método (LCM) y Control de Verificación Continua de la calibración (CCV)

Control de Calidad	Concentración esperada (mg NO ₂ ⁻ - N/L)	Estándar de partida (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Volumen Alícuota (mL)	Volumen final (mL)
LCM	0.006	0.1	6	100
CCV	0.095	5	1.9	100

Fuente: Propia.2024

Muestras Fortificadas: Variar las concentraciones de analito adicionadas a las muestras fortificadas, tomando las alícuotas que se presentan en la Tabla 4 y llevando a volumen con la muestra.

Tabla 4. Preparación Muestras Fortificadas (LFB)

Concentración esperada (mg NO ₂ ⁻ - N/L)	Estándar de partida (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Volumen Alícuota (mL)	Volumen final (mL)
0.03	5	0.6	100
0.06	5	1.2	100
0.09	5	1.8	100

Fuente: Propia.2024

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

6.3. Limitaciones e interferencias

- La incompatibilidad química hace improbable que el NO_2^- , el cloro libre y el tricloruro de nitrógeno (NCl_3) coexistan. NCl_3 imparte un color rojo falso cuando se añade reactivo de color. Los siguientes iones interfieren debido a la precipitación en condiciones de prueba y deben estar ausentes: Sb^{+3} , Au^{+3} , Bi^{+3} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^+ , cloro platino (PtCl_6^{-2}) y meta vanadato (VO_3^{-2}).
- El ion cúprico puede causar bajos resultados catalizando la descomposición de la sal de diazonio. Los iones de color que alteran el sistema de color también deben estar ausentes. Eliminar los sólidos en suspensión por filtración.

Nota: No se encontró metodología para corregir las anteriores interferencias.

6.3.1. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales no afectan la validez de los resultados, pero en el área donde se analizan nitritos, tiene un termohigrómetro para controlar temperatura y humedad diariamente y los datos se registran en el documento M-S-LC-F021 formato condiciones ambientales.

6.4. Control y aseguramiento de la calidad

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

Tabla 5. Controles de calidad del método 4500-P E.

Calibración o Estandarización	Verificación continua de la calibración (CCV)	Límite de cuantificación del método o (LCM)	Blanco del método (MB)	Blanco fortificado en laboratorio (LFB)	Duplicado	Matriz fortificada en laboratorio (LFM)	Duplicado matriz fortificada en laboratorio (LFMD)	Otros
X	X	X	X	X	X	X	X	3

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

Fuente: SM Tabla 4020: I (³ Consultar SM 4020B para más Requisitos de control de calidad).2024

- Utilizar el material de vidrio destinado para la determinación de nitritos al que se le realizó el control de calidad.
- Efectuar el análisis inmediatamente a la recepción de la muestra en el laboratorio o en las 48 horas posteriores al muestreo.
- Verificar que el coeficiente de correlación de la curva se encuentre en un valor ≥ 0.995 .
- Analizar un blanco de reactivo o Blanco de método (MB) por cada conjunto de muestras y al menos una vez por lote (10 muestras). El MB incluye todos los reactivos y procedimientos de preparación con agua tipo I; determina si los reactivos y los pasos analíticos preparativos contribuyen a la incertidumbre de la medición y en qué medida. Los resultados de las muestras son sospechosos si el analito en el MB es $> \frac{1}{2}$ LCM.
- Procesar el límite de cuantificación del método (LCM) por cada conjunto de muestras y al menos una vez por lote (10 muestras); es aceptable una recuperación entre el 50% y 150%. Informar los resultados por debajo del LCM como "no detectado".
- Analizar un estándar de Verificación Continua de la Calibración (CCV) por cada conjunto de muestras y al menos una vez por lote (10 muestras), cuya concentración esté cerca del punto medio del rango de calibración. El CCV confirma que la respuesta del equipo no ha cambiado mucho respecto a la calibración inicial; la concentración debe estar en el 10 % de su valor real y dentro de los límites establecidos en la carta de control; si está fuera de control, tomar medidas correctivas, incluido el nuevo análisis de cualquier muestra analizada desde el último CCV aceptable.
- Procesar un duplicado de muestra por cada conjunto de muestras y al menos una vez por lote (10 muestras) y confirmar que cumpla con la diferencia porcentual relativa (RPD) del 10%.
- Procesar un fortificado de matriz (LFM) y su duplicado (LFMD) semanalmente. El criterio de aceptación de recuperación es de 70% a 130% y la diferencia porcentual relativa (RPD) entre la muestra fortificada y el duplicado debe ser inferior al 10%. Tener en cuenta que el volumen de la adición no debe excede el 5% del volumen de muestra y la concentración no debe sobrepasar el 50% del rango de la curva. Si los resultados de la matriz fortificada (LFM) están fuera de control, tomar las medidas correctivas para rectificar el efecto de la matriz.

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

- **Análisis de Testigos y Adicionados:** Estos controles de campo se procesan dentro de un lote de muestras aplicando el método de análisis correspondiente y el resultado se expresa sin redondeo de cifras. Para el caso de los testigos, el contenido del frasco (unos 20 mL aproximadamente) se lleva cuantitativamente a un balón aforado de 500 mL con agua tipo I y se completa a volumen. Para los adicionados, el analista debe medir el volumen que llegó en la botella marcada como adicionado. Si la muestra se filtra, mida el volumen antes de la filtración. Registrar en la botella el volumen medido y en la hoja de captura de datos, escribir las letras y datos de identificación, tanto para el testigo como para el adicionado. Los testigos sirven para evaluar las condiciones de transporte y monitoreo en las que tomaron las muestras y el almacenamiento de las mismas. El porcentaje de recuperación de los testigos debe estar entre 70 y 130 %.
- Las réplicas se utilizan para ver diferencias en el muestreo, se aceptan réplicas con una diferencia porcentual relativa no mayor al 10%.
- Llevar los registros de carta control de exactitud M-S-LC-F055, carta control de precisión M-S-LC-F056 y cartas de control de recuperación y duplicados M-S-LC-F057 para la determinación de nitritos.
- Cuando los resultados se encuentren entre el límite de alarma y control, revisar todo el procedimiento para determinar que ocurre. Si cualquier dato cae fuera de los límites de control debe ser reexaminado y si es necesario, repetir el análisis de todo el grupo de muestras. No realizar más análisis hasta verificar que sucede; comunicar anomalía al líder de fisicoquímica. Revisar e iniciar nuevamente la marcha analítica cuando el líder lo autorice. Tomar las acciones respectivas si hay tendencias de datos en la carta de control, según lo definido en el M-S-LC-I051 Instructivo de Aseguramiento de Calidad Analítica.

6.5. Desarrollo

6.5.1. Principio

El nitrito (NO_2^-) se determina a través de la formación de un colorante azo rojizo producido a un pH de 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotada con dihidrocloruro de N (1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED). El rango aplicable del método para las mediciones espectrofotométricas es de 10 a 1.000 μg de NO_2^- -N / L. (0,010 a 1mg/L). Las mediciones fotométricas se pueden realizar en el rango de 5 a 50 μg N / L. (0.005 a 0,050 mg/L), si se utiliza un

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

trayecto de luz de 5 cm y un filtro de color verde. El sistema de color obedece la ley de Beer hasta 180 µg N/L (0,180 mg/L) con un trayecto de luz de 1 cm a 543 nm. Concentraciones más altas de NO_2^- se pueden determinar diluyendo una muestra.

El nitrógeno de nitritos raras veces aparece en concentraciones mayores de 1 mg/L, aun en fuentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. En aguas superficiales y subterráneas su concentración por lo general es menor de 0.1 mg/L. Su presencia indica, por lo regular, procesos activos biológicos en el agua, ya que es fácil y rápidamente convertido en nitrato.

Los nitritos en concentraciones elevadas reaccionan dentro del organismo con aminas y amidas secundarias y terciarias formando nitrosominas de alto poder cancerígeno.

6.5.2. Toma y preservación de la muestra

Nunca utilice preservación ácida en las muestras que se analizarán para NO_2^- . Colecte la muestra en envase de vidrio ámbar y no le adicione ningún preservante. El tamaño mínimo de muestra para determinar NO_2^- es de 250 mL. La determinación debe hacerse lo más pronto posible una vez recogida la muestra para prevenir la posible conversión bacteriana de NO_2^- a NO_3^- o NH_3 , las muestras deben ser refrigeradas a $\leq 4^\circ \text{C}$ con un tiempo máximo de espera para el análisis de 48 horas. Filtrar el contenido de la botella solo al realizar el análisis.

6.5.3. Limpieza de vidriería

Las recomendaciones de lavado se pueden consultar en el Instructivo para el lavado de material de vidrio y plástico M-S-LC-I015.

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

6.5.4. Ejecución de la técnica

6.5.4.1. Curva de Calibración

Se realiza con los estándares descritos en la tabla 2 y se procede de la siguiente forma:

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

- Encender el espectrofotómetro UV-VIS 50 minutos antes de iniciar las lecturas. En los espectrofotómetros HP y Thermo Scientific Evolution Array verificar que la lámpara de Tungsteno se encuentre encendida. La lectura de nitritos debe hacerse a 543 nm.
- Verificar que la celda de 1 cm esté perfectamente limpia; si esta manchada lavar con ácido sulfúrico 5 N y enjuagar con agua desionizada.
- El procedimiento para crear una curva de calibración se detalla en los documentos M-S-LC-I008 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos, HP 8453; M-S-LC-I061 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis con lámpara de Xenon Merck Spectroquant Prove 600 y M-S-LC-I092 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution Array.
- Transferir una alícuota de 25 mL del blanco y de cada uno de los estándares en un erlenmeyer de 125 mL.
- Adicionar 1 mL del reactivo de color (NEDA) a cada uno de los erlenmeyer, mezclar completamente para el desarrollo del color rosa y después de mínimo 10 minutos, pero antes de 2 horas, leer en el espectrofotómetro.
- Para iniciar las lecturas fotométricas de la curva colocar el blanco de reactivos en la celda, ajustar zero y leer. Continuar la lectura de los estándares en orden creciente desde los de más baja concentración. Etiquetar la lectura en el Software con cada concentración. La gráfica de absorbancia contra concentración de nitrito da una línea recta que pasa por el origen. Leer como estándares y como muestras siguiendo las instrucciones del equipo.
- Guardar la curva como método, estándar y muestra en el equipo HP 8453. En los equipos Merck Spectroquant Prove 600 y Thermo Scientific Evolution Array guardar como estándar y muestra. El nombre será la fecha en la que se realizó la curva en formato dd/mm/aaaa. Imprimir reporte como método y como resultados.

6.5.4.2. Procesamiento de la Muestra

- Solicitar las muestras a analizar diligenciando el formato M-S-LC-F011.
- **Filtración preliminar.** Filtrar las muestras para la determinación de nitritos a través de un filtro de membrana de 0,45 µm. Las muestras de difícil filtración se deben filtrar con un prefiltro de fibra de vidrio.

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

- Encender el espectrofotómetro UV-VIS 50 minutos antes de iniciar las lecturas. En los espectrofotómetros HP y Thermo Scientific Evolution Array verificar que la lámpara de Tungsteno se encuentre encendida. La lectura de nitritos debe hacerse a 543 nm.
- Diligenciar el formato de control diario de manejo del equipo M-S-LC-F007.
- Verificar que la celda de 1 cm esté perfectamente limpia; si esta manchada lavar con ácido sulfúrico 5 N y enjuagar con agua desionizada.
- Para leer un grupo de muestras utilizar la última curva de calibración del método. Para el manejo detallado de los equipos ir a los documentos M-S-LC-I008 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos, HP 8453; M-S-LC-I061 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis con lámpara de Xenon Merck Spectroquant Prove 600 y M-S-LC-I092 Instructivo de manejo espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution Array.
- Transferir una alícuota de 25 mL de los controles de calidad y las muestras, en un erlenmeyer de 125 mL y adicionar 1 mL del reactivo de color (NEDA) a cada uno de los erlenmeyer, mezclar completamente para el desarrollo del color rosa y después de 10 minutos, pero antes de 2 horas, leer en el espectrofotómetro.
- Para iniciar las lecturas fotométricas colocar el blanco de reactivos en la celda, ajustar zero y leer.
- Continuar la lectura de las muestras y los controles de calidad, como muestra. Etiquetar la lectura en el software con el consecutivo de muestra y/o con el valor de los controles.
- Verificar que la lectura de la muestra no sobrepase el rango de absorbancia obtenida en la curva de calibración para el estándar de más alta concentración (0,2 mg/L). Si esto sucede realizar dilución de la muestra filtrada.
- Grabar los resultados. El nombre de los archivos va a ser la fecha en que se realizó la lectura de las muestras en formato dd/mm/aaaa.
- Imprimir el reporte como resultado en el formato M-S-LC-F054 Captura de datos primarios.

6.5.4.3. Actividades finales

- Apagar la lámpara y el equipo.

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	---	---

- 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.
- 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 NITROGENO en la columna de Nitritos y la fecha en que se digitan dichos resultados.
- Colocar el formato en el AZ correspondiente de la técnica analítica para la revisión de los resultados por parte del líder fisicoquímico y el visto bueno de la calidad del resultado.
- Una vez los resultados estén revisados y aprobados, digitar el registro de los resultados en el módulo AQUARIUS Samples.

6.5.4.4. Cálculo de resultados

Preparar una curva estándar y trazar la absorbancia de los patrones frente a la concentración de NO_2^-/N . Calcular la concentración de la muestra directamente en la curva.

El espectrofotómetro arroja resultados en $\text{mg N} - \text{NO}_2^-/\text{L}$ de acuerdo con el factor de dilución digitado en el momento de la lectura, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg N} - \text{NO}_2^-/\text{L} = \text{Pendiente} \times \text{Absorbancia} \times \text{FD}$$

Donde:

- Pendiente = Obtenida a partir de la curva de calibración.
- Absorbancia = Lectura realizada por el espectrofotómetro.
- $\text{mg N} - \text{NO}_2^-/\text{L}$ = Concentración de nitritos calculada y registrada por el espectrofotómetro UV-VIS
- FD = Factor de dilución



Servicios Laboratorio de Calidad
Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría

Código: SLC-I034
Versión: 07
Fecha: 03/07/2025

Escribir el resultado, redondeando de acuerdo con los criterios establecidos.

- **Recuperación Matriz fortificada (LFM):**

$$\left[\frac{LFM \times (A + B) - (C \times D)}{E \times A} \right] \times 100$$

Donde:

- LFM: Concentración de la matriz fortificada
- A: Alícuota adicionada del patrón (Spike vol)
- B: Volumen de muestra (Sample vol)
- C: Concentración muestra sin fortificar (sample conc)
- E: Concentración del patrón (Spike solution conc)

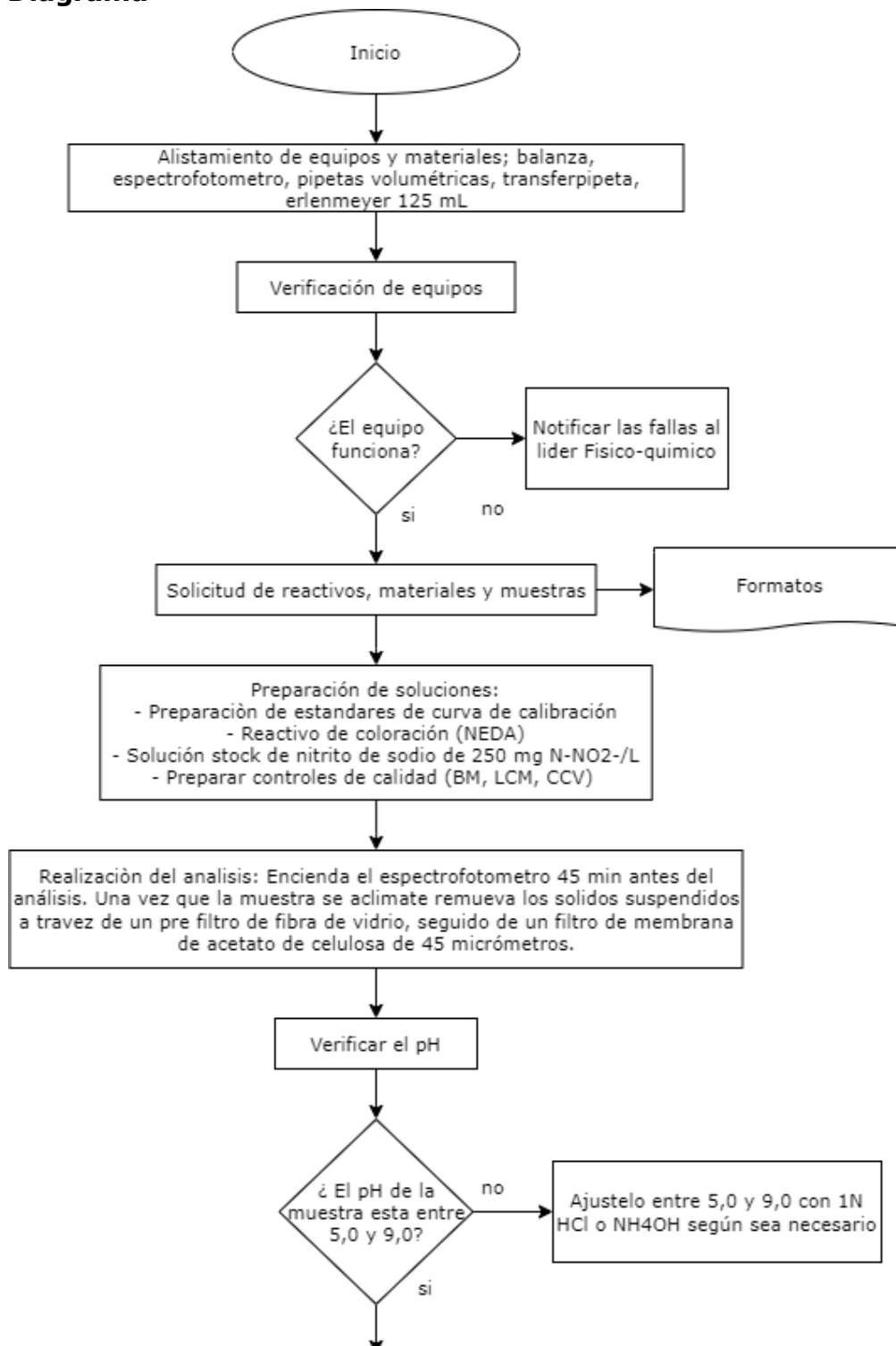
$$\frac{(Cs - C)}{S} \times 100 = \% \text{ Recuperación LFM O LFMD}$$

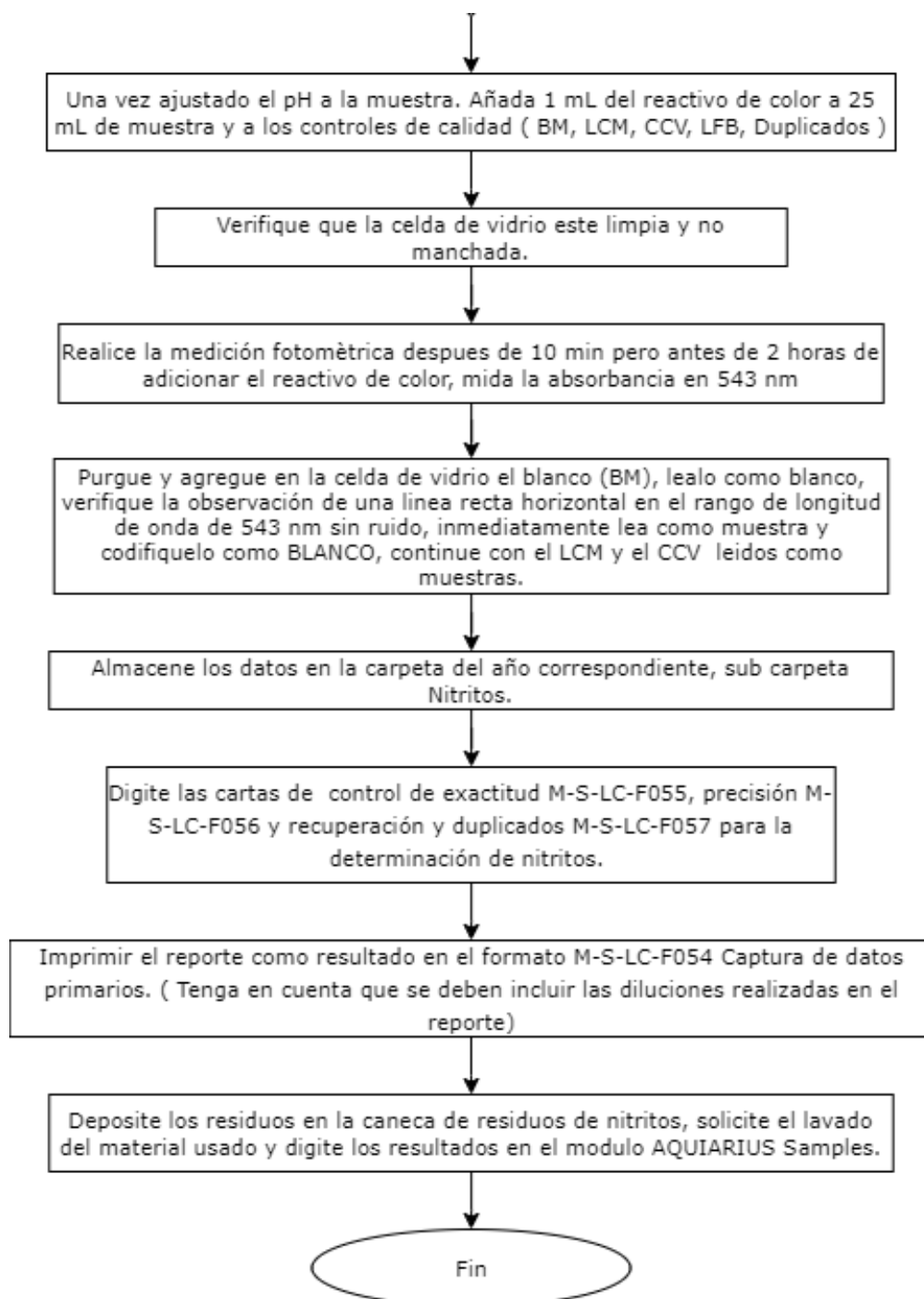
Donde:

- Cs = concentración de LFM o LFMD determinada experimentalmente,
- C= Concentración de la muestra antes del aumento, y
- S = Concentración adicionada.

La recuperación debe estar entre 70 y 130%.

6.6. Diagrama





	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

6.7. Documentos relacionados

- APHA AWWA WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24 RD edition 2023 American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 2540 D. 24ed., New York, 2023

7. Control de cambios

Versión	Fecha	Descripción
01	14/12/2017	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI.
02	24/04/2019	Actualización SM 2017.
03	14/05/2020	Se actualiza el instructivo en los siguientes numerales: 3. Se amplían las definiciones, se incluye el subnumeral 5.1.1 verificación de equipos, en el numeral 5.3 en la preparación de reactivos se incluye el uso de un estándar trazable, así mismo, el subnumeral 6.1 condiciones ambientales, en el numeral 7. Control y aseguramiento de la calidad se mejoran los criterios del banco, se incluyen los controles del límite de cuantificación (LCM), la verificación de la calibración (CCV), el duplicado de la muestra y la rotación del blanco fortificado (LFB), se adiciona el subnumeral 8.5 Formatos y se amplía el numeral 10. Documentos de referencia y bibliografía.
04	11/12/2020	Nueva versión producto de la actualización de la documentación del Sistema Integrado de Gestión.
05	12/01/2023	Se cambia en todo el documento el radical $N - NO_2^-/L$ por $NO_2^- - N /L$. Se adiciona en el numeral 3 la definición de QC. Se actualiza el numeral 4. Se adiciona en el ítem 5.1.1 verificación de los volúmenes dispensados por las transferpipetas. En subnumeral 5.3 se complementa la preparación del estándar de trabajo a partir de la solución de 1000 mgNO ₂ /L. Se corrige la alícuota en la tabla 2. Numeral 7, se cambian las concentraciones para la muestra fortificada, se corrige el porcentaje de recuperación para muestras y testigos (70 a 130%). Se completan los numerales 8.6 Formatos y 10 Documentos de Referencia y Bibliografía. Se completa el instructivo con el ANEXO 2 . Diagrama de flujo – Manejo del equipo.

	Servicios Laboratorio de Calidad Instructivo Determinación de nitritos por colorimetría	Código: SLC-I034 Versión: 07 Fecha: 03/07/2025
---	--	--

06	05/11/2024	En la tabla 1 se adicionan resultados de la verificación del método en los espectrofotómetros Merck y Thermo. Se organiza numeral 5.3. y se incluye preparación de estándar de 5 mg/L a partir de la sal, se elimina tabla 2. En la tabla 3 se corrige el estándar de partida de CCV. En la tabla 4 se suprime la frecuencia de variación de los fortificados, se corrige alícuota y estándar de partida del adicionado de 0,03 mg/L y se cambia adicionado de 0,12 mg/L debido a que la concentración sobrepasa el 50% del rango de la curva. En el numeral 6.4 se incluye coeficiente de correlación de la curva, criterio de aceptación del CCV y se suprime blanco de muestra de acuerdo con SM4020B 1. b-c. Se organiza numeral 6.5. Se suprime el anexo 2 (Diagrama de manejo del equipo). Se realiza la revisión de la nueva versión del S.M 2023 ed.24, En el numeral 3 se agregan definiciones, en el numeral 6.2.4 se incorpora la preparación del sulfato de amonio ferroso, se corrigen gramos de oxalato de sodio para la estandarización del permanganato de potasio, se organiza el apartado de fórmulas de la solución madre y el estándar primario de 1000 mg N-NO₂⁻ /L, en el numeral 6.4 se cambia la frecuencia con la que se realizan los controles de calidad: blanco (BK), Verificación continua de la calibración (CCV) y límite de cuantificación de la muestra (LCM) de acuerdo con el SM ed.24 2023 (4020 B) y se complementa, se agrega el criterio de aceptación del LCM de un 50%, se reorganiza la ejecución de la técnica. Se modifica el diagrama de flujo y se migra a la nueva plantilla desarrollada por la oficina de planeación (SGI-033).
07	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-I034 a SLC-I034.