



1. OBJETIVO/ALCANCE

Establecer un procedimiento operativo de ensayo en los laboratorios del SIGLA para la determinación de la concentración del nitrato contenido en una muestra de agua natural superficial o profunda, tratada o distribuida, por método espectrofotométrico, midiendo la absorbancia de la solución a 220 nm y a 275 nm.

2. REFERENCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water. 23ed Edition. 4500-NO₃ B.
- Procedimiento de gestión PG.GL.AE.01 – Control de calidad de los ensayos.
- Procedimientos e Instructivos de trabajo específicos de cada laboratorio para determinación de Nitratos.

3. DEFINICIONES

Aplican las definiciones establecidas en el Documento general DG.CC.01 – Glosario de términos y definiciones.

SIGLA: Sistema Integrado de Gestión de Laboratorios.

GGL: Gerencia de Gestión de Laboratorios

4. RESPONSABILIDADES

La responsabilidad de la ejecución del presente método es de un/a Técnico/a y/o Laboratorista del Área Físicoquímica. La responsabilidad de la elaboración del informe es de un/a Técnico/a, del Analista Técnico/a y de la jefatura del Laboratorio.

5. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Los NO₃⁻ existentes en el agua, son habitualmente, consecuencia de una nitrificación de N orgánico o proceden de la disolución de los terrenos atravesados por el agua. Pueden provenir de la contaminación orgánica.

El NO₃⁻ se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 220 nm y restando la absorbancia a 275 nm, debido a que la materia orgánica absorbe a ambas longitudes de onda y el NO₃⁻ sólo a 220 nm.

Cuando se verifica que (2 x A 275 nm) es menor o igual al 10% de la A 220 nm:

$$\text{Concentración NO}_3^- = [(\text{Abs } 220 - 2 \times \text{Abs } 275) - F2] / F1$$

Siendo F1 la pendiente y F2 la ordenada al origen de la curva de calibración ($Y = F1 \times X + F2$) Absorbancia (Y) vs. concentración de los estándares en mg NO₃⁻ /L (X).

En caso contrario se puede:

**PROCEDIMIENTO PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS
POR EL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Versión Vigente
N° 01

Obras Sanitarias del Estado
Laboratorio Regional Metropolitana

Página 2 de 5

- Filtrar la muestra, volver a medir y corroborar si se cumple el criterio anterior.
- En caso que el valor estimado de NO_3^- sea bajo (por ejemplo, menor a 10 mg/L), se puede, a juicio técnico y en acuerdo con el uso previsto del dato, considerar la estimación siguiendo el criterio anterior.
- En otros casos, se puede considerar como estimación conservadora sólo el resultado calculado en base a Abs 220nm, informando menor a dicho valor.

6. CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

Utilizar guantes de látex o pinza de plástico para el retiro de las celdas de la solución de guardado. Usar lentes protectores y túnica para proteger ojos y ropa.



7. INTERFERENCIAS

Se requieren muestras ópticamente claras, por lo que es necesario filtrar o centrifugar en el caso de muestras con turbidez mayor a 5 NTU. No emplear filtros con nitrato en su composición por ejemplo nitrato de celulosa.

Los nitratos absorben la luz a 220 nm, la materia orgánica absorbe la luz tanto a 220 como a 275 nm, por lo que la medición a 275 nm se usa para corregir los valores de interferencia de la materia orgánica.

8. CONSERVACION Y MANIPULACION DE LA MUESTRA

Recolectar la muestra en frascos limpios y guardar en heladera preferentemente a una temperatura entre 2-8°C. Analizar lo antes posible para prevenir la conversión bacteriana o dentro de las 48 hs siguientes a la extracción. Nunca usar ácido para la conservación de la muestra cuando se va a analizar nitratos.

9. MATERIALES, REACTIVOS y EQUIPOS

9.1 Materiales y equipos

- 9.1.1 Espectrofotómetro UV provisto de un paso óptico de 1cm.
- 9.1.2 Celdas de cuarzo de 1cm.
- 9.1.3 Material para realizar diluciones en caso de ser necesario.
- 9.1.4 Matraces aforados.
- 9.1.5 Pipetas aforadas o pipetas automáticas
- 9.1.6 Kit de filtración y/o centrífuga
- 9.1.7 Membranas filtrantes de 0,45 micras o menor poro, de acetato de celulosa o ésteres mixtos (**NO** utilizar de nitrato de celulosa).



PROCEDIMIENTO PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS
POR EL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO

Obras Sanitarias del Estado
Laboratorio Regional Metropolitana

- 9.1.8 Papel Tisú.
- 9.1.9 Turbidímetro.

9.2 Reactivos y estándares

- 9.2.1 Agua reactivo (destilada, ósmosis inversa o ultrapura, de preferencia grado II según ISO 3696).
- 9.2.2 Soluciones estándar de nitratos para curva y control estadístico.
- 9.2.3 Solución HCl/EtOH 10% para guardado de las celdas.

10. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

10.1 Curva de calibración

- 10.1.1 Operar el espectrofotómetro disponible como se describe en procedimiento técnico o Instructivo de trabajo técnico correspondiente.
- 10.1.2 Medir diferentes diluciones de estándares a 220nm y a 275nm.
- 10.1.3 Graficar $A = (\text{Abs}_{220\text{nm}} - 2 \times \text{Abs}_{275\text{nm}})$ contra la concentración de NO_3^- de estándares medidos. Los parámetros de la curva (F1 y F2) se pueden calcular con el apoyo de una planilla Excel.
 $A = F1 \times C + F2$

A es $(\text{Abs}_{220\text{nm}} - 2 \times \text{Abs}_{275\text{nm}})$.

C es la concentración de los estándares (mg NO_3^- /L).

F1 es la pendiente.

F2 es la ordenada al origen.

10.2 Preparación de las muestras

- 10.2.1 Filtrar por membrana o centrifugar las muestras que tengan una turbidez mayor a 5 NTU.
- 10.2.2 La muestra debe estar a temperatura ambiente.

10.3 Medida espectrofotométrica

Nota: Se trabaja con valores de hasta 1,2 unidades de absorbancia si se utilizan celdas de 1cm de paso óptico. Cuando corresponda, realizar las determinaciones luego de diluir apropiadamente la muestra.

- 10.3.1 Encender el equipo y manejar el espectrofotómetro como se describe en el procedimiento técnico o Instructivo de trabajo técnico correspondiente.
- 10.3.2 En caso que se gestionen los datos y la curva de calibración mediante archivo Excel, abrir el archivo correspondiente.

**PROCEDIMIENTO PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS
POR EL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Versión Vigente
Nº 01

Obras Sanitarias del Estado
Laboratorio Regional Metropolitana

Página 4 de 5

- 10.3.3 Realizar la línea de base entre 190 nm a 300 nm sin celdas en el portaceldas y comprobar que las absorbancias a 220 nm y a 275 nm sean 0,00. Enjuagar al menos tres veces las celdas con agua destilada y medir la misma (previamente secar externamente las celdas con papel tisú y colocarlas en el portaceldas del espectrofotómetro).
- 10.3.4 Evaluar la señal de fondo del equipo mediante la medida de blancos. Si la absorbancia a 220 nm y a 275 nm no cumple con los criterios de aceptación o límites definidos según la validación o gráficos de control, se debe repetir la línea de base. En caso contrario, consultar a un Técnico.
- 10.3.5 Se realizará al menos una curva de calibración quincenal con verificación diaria.
- 10.3.6 Para los estándares y las muestras enjuagar la celda de muestra tres veces con la solución, y medir dicha solución contra blanco de agua reactivo (previamente secar externamente las celdas con papel tisú).
- 10.3.7 Previo a la realización de medidas, medir un estándar control estadístico. Si el valor obtenido está dentro del gráfico de control, continuar con las muestras. De lo contrario, seguir lo que se menciona en el PG.GL.AE.01.
- 10.3.8 Realizar las medidas de las muestras según se indica en el instructivo correspondiente.
- 10.3.9 Si la medida supera el valor máximo de la curva de calibración, diluir la muestra apropiadamente y registrar la dilución realizada en el formulario correspondiente.
- 10.3.10 Cuando la muestra no cumpla con el criterio " $(2 \times A_{275 \text{ nm}})$ es menor o igual al 10% de la $A_{220 \text{ nm}}$ " y/o tenga turbidez mayor a 5 NTU, evaluar la posibilidad de analizarla luego de una dilución apropiada y/o luego filtrar la muestra. Ver apartado 5.
- 10.3.11 Al finalizar la corrida o cada 10 muestras analizadas, repetir la medida del control estadístico. Si el valor obtenido está dentro del gráfico de control, continuar con las muestras. De lo contrario, seguir lo que se menciona en el PG.GL.AE.01.

11 INFORME DE RESULTADOS/REGISTROS

- 11.1 Registrar como mínimo los siguientes datos:
- Fecha de análisis.
 - Analista.
 - Absorbancias en ambas longitudes de onda y concentraciones de: blanco de celda, muestras y estándares.
 - Ecuación de la curva de calibración utilizada en el análisis.
 - Fecha de aprobación del análisis y nombre del Técnico que aprueba.
- 11.2 Guardar todos los registros generados, incluidos los archivos del espectrofotómetro, durante un mínimo de 8 años.
- 11.3 Informar el resultado sin cifras decimales para concentraciones $\geq 2 \text{ mg/L}$ y, " $< 2 \text{ mg/L}$ ", para el resto de los casos.
- 11.4 En caso que se informe el resultado calculado en base a $Abs_{220\text{nm}}$, como valor estimado, informar menor a dicho valor.



PROCEDIMIENTO PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS
POR EL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO

Obras Sanitarias del Estado
Laboratorio Regional Metropolitana

12 CONTROL DE CALIDAD/ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

12.1 Verificación de desempeño posterior al mantenimiento del equipo.

Evaluar al menos los parámetros que se detallan a continuación y cuando no se cumplan los criterios de aceptación, comunicarlo a Técnico/a responsable.

Estudio de blancos

Medir 10 blancos independientes en días diferentes por distintos analistas. Se evaluará la absorbancia a 220 nm y a 275 nm.

Criterio de aceptación: Las señales de blanco deben estar comprendidas según se detalla en los criterios de aceptación o límites definidos en la validación o gráficos de control.

Linealidad

Evaluar al menos 3 curvas de calibración en el rango de trabajo definido anteriormente. Calcular los parámetros de ajuste del modelo y el coeficiente de correlación. Evaluar la dispersión del punto más bajo de la curva de calibración. Calcular y evaluar los residuos en función de la concentración.

Criterio de aceptación: Obtención de una recta en el rango de concentraciones estudiado, con un coeficiente de correlación ≥ 0.995 y residuos que presenten comportamiento aleatorio. La dispersión de la respuesta de los estándares de la curva (en unidades de absorbancia) no debe superar un RSD 5%.

Solución control estadístico, CE

Medir preferentemente 10 soluciones estándar de control, en días diferentes y por distintos analistas.

Criterio de aceptación: Verificar que los resultados no se aparten del valor esperado según el gráfico de control vigente.

12.2 Gráficos de control

Registrar los resultados duplicado sin dilución y con dilución y estándar control estadístico en los Gráficos de Control respectivos. Interpretar los resultados en función de lo establecido en PG.GL.AE.01.

13 NATURALEZA DE LA REVISIÓN

No aplica. Versión 1.

14 ANEXOS

No aplica.