**JULIO SANCHEZ Y TEPOZ,** Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 fracción VIII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o., fracción XXIV, 13, apartado A fracciones I y II, 17 Bis fracción III, 194 fracción I, 197, 201, 205, 210, 212, 214, 215 fracción I y demás aplicables de la Ley General de Salud; 38, fracción II, 51 segundo párrafo de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4o., 8o., 14, 15, 25, 152 fracción I, 153, 154, 157 y demás aplicables del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2° inciso C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y 3° fracciones I inciso C y II, 10 fracciones IV y VII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

**CONSIDERANDO**

Que el 22 de diciembre de 2015, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias;

Que en el apartado de vigencia de la Norma Oficial Mexicana indica que ésta entró en vigor a los 120 días naturales después de su publicación en el Diario Oficial de la Federación lo cual se llevó a cabo el 22 de diciembre de 2015;

Que el segundo párrafo del artículo 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización permite la modificación de las normas oficiales mexicanas sin seguir el procedimiento para su elaboración, siempre que no se creen nuevos requisitos o procedimientos, o bien, se incorporen especificaciones más estrictas;

Que el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario el\_\_\_\_\_\_\_\_\_, aprobó la Modificación a la Norma Oficial Mexicana, NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias publicadas en el Diario Oficial de la Federación el 22 de diciembre de 2015;

Que el anteproyecto de modificación se sometió al procedimiento de mejora regulatoria de conformidad con lo dispuesto por la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; indicando que dicha modificación no afecta a la industria actualmente establecida, obteniéndose la exención de manifestación de impacto regulatorio el\_\_\_\_\_\_; por lo que he tenido a bien expedir la siguiente:

**INCLUSIÓN DE LOS NUMERALES 2.6, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 10.10, 10.11, 10.12, 10.13, 10.14, A.3.16, A.3.17 A.3.18 ELIMINACIÓN DE LOS NUMERALES 3.10, 6.3, 3.8 MODIFICACIÓN DE LOS NUMERALES 3.12. 3.28, 4, 5.1, 5.1.5.1.1, 5.1.5.1.2, 5.1.5.1.4, 5.1.5.1.6, 5.1.5.1.6.1, 5.1.5.1.7, 5.2.2.1, 6, 6.1, 6.2 y 7 NUMERALES A.1, A.3.3, A.3.7, A.3.10, A.3.11, A.3.14, A.3.15 DEL APÉNDICE NORMATIVO A DE LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-201-SSA1-2015, PRODUCTOS Y SERVICIOS. AGUA Y HIELO PARA CONSUMO HUMANO, ENVASADOS Y A GRANEL. ESPECIFICACIONES SANITARIAS**

**UNICO**.- Se incluyen los numerales 2.6, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 10.10, 10.11, 10.12, 10.13, 10.14, A.3.16, A.3.17, A.3.18 eliminación de los numerales 3.10, 6.3, A.3.8 modificación de los numerales 3.12, 3.28, 4, 5.1, 5.1.5.1.1, 5.1.5.1.2, 5.1.5.1.4, 5.1.5.1.6, 5.1.5.1.6.1, 5.1.5.1.7, 5.2.2.1, 6, 6.1, 6.2 y 7 numerales A.1, A.3.3, A.3.7, A.3.10, A.3.11, A.3.14, A.3.15 **del Apéndice Normativo A de la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias, para quedar como** sigue:

**1 a 2.5 …**

**2.6** Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2015, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

**3. a 3.9…**

**3.10 Se elimina**

**3.11 …**

**3.12 Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables:** al grupo de parámetros analíticos que comprende a los halogenados volátiles como los halometanos, hidrocarburos clorados de bajo peso molecular y volátiles clorados.

**3.13 a 3.27 …**

**3.28** Materia extraña: a cualquier sustancia solida orgánica o no, que se presente en el producto, sea por contaminación o por manejo no higiénico del mismo durante su elaboración o comercialización y que es visible a simple vista.

**3.29 a 3.37** …

**4. Símbolos y abreviaturas**

**4.1** Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entenderá por:

|  |  |
| --- | --- |
| **4.1.1** ACUERDO | Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. |
| **4.1.2** Bq/L | Bequerel por litro. |
| **4.1.3** B | Boro |
| **4.1.4** cm | Centímetro. |
| **4.1.5** F- | Ión fluoruro. |
| **4.1.6** Ley | Ley General de Salud. |
| **4.1.7** mL | Mililitro. |
| **4.1.8** mg/L | Miligramo por litro. |
| **4.1.9** NMP | Número Más Probable. |
| **4.1.10** pH | Potencial de hidrógeno. |
| **4.1.11** Reglamento | Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. |
| **4.1.12** UFC | Unidades Formadoras de Colonias. |
| **4.1.13** UNT | Unidades Nefelométricas de Turbiedad. |
| **4.1.14** Pt-Co | Unidad platino-cobalto |

**5.** …

**5.1** Agua.

El agua utilizada como materia prima debe cumplir con las especificaciones que establece la Modificación de la NOM-127-SSA1-1994, citada en el numeral 2.4 de esta norma.

**5.1.1** a **5.1.5.1 …**

**5.1.5.1.1** Organolépticas y físicas

|  |  |
| --- | --- |
| **ESPECIFICACIÓN** | **LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE** |
| Color | 15 (Pt-Co). |
| Turbiedad | 3,0 (UNT). |

**5.1.5.1.2** Microbiológicas.

|  |  |
| --- | --- |
| **ESPECIFICACIÓN.** | **LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE**(1) |
|  | **(NMP/100 mL)** | **UFC/100 mL** | **Presencia-Ausencia/100mL** |
| Coliformes Totales. | <1,1 | CERO | Ausencia |
| *Pseudomonas aeruginosa*(2)*.* | <1,1 | CERO | Ausencia |
| Enterococos fecales(3). | <1,1 | CERO | Ausencia |
| Esporas de *Clostridium* sulfito reductores(2, 3). | <1,1 | CERO | No aplica |

(1) La unidad a informar será de acuerdo al método utilizado.

(2) Especificaciones sólo para agua mineral natural.

(3) La autoridad sanitaria establecerá los casos en que se realizará la determinación de estas especificaciones.

**5.1.5.1.3 …**

**5.1.5.1.4** Compuestos orgánicos sintéticos.

|  |  |
| --- | --- |
| **ESPECIFICACIÓN.** | **LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE****(mg/L)** |
| Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos. | 0,01 |
| Compuestos orgánicos no halogenados. | 0,025 |
| Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables. | 0,005 |
| Sustancias activas al azul de metileno. | 0,5 |

**5.1.5.1.5** …

**5.1.5.1.6** Subproductos de desinfección.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **DESINFECTANTE****UTILIZADO.** | **ESPECIFICACIÓN.** | **LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE****(mg/L)** |
| Cloro | Bromodiclorometano. | 0,06 |
| Bromoformo. | 0,1 |
| Dibromoclorometano. | 0,1 |
| Cloroformo. | 0,2 |
| Ozono | Formaldehído. | 0,9 |
| Bromato. | 0,01 |

**5.1.5.1.6.1** En aguas minerales naturales, los subproductos de desinfección deben cumplir con los límites máximos permisibles señalados en 5.1.5.1.6.

**5.1.5.1.**7 Radiactivos

|  |  |
| --- | --- |
| **DESINFECTANTE****UTILIZADO.** | **LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE****(Bq/L)** |
| Radiactividad beta total | 1,85 |
| Radiactividad alfa total | 0,56 |

**5.1.5.2… a** **5.2.2…**

**5.2.2.1** El producto terminado deberá cumplir con las especificaciones establecidas en 5.1.5 de esta Norma y comercializarse preenvasado.

**6.** Control de proceso

**6.1** Se debe establecer un programa de muestreo para garantizar la calidad de los productos.

**6.2** La frecuencia mínima de muestreo y análisis de los productos deberá ser de acuerdo a lo establecido en el Cuadro 1 de esta Norma y documentarse en bitácoras o registros.

**Cuadro 1. Frecuencia mínima de análisis de agua y hielo.**

|  |  |
| --- | --- |
| **ESPECIFICACIÓN.** | **FRECUENCIA.** |
| Organolépticos y físicos. | Mensual. |
| Coliformes totales. | Semanal. |
| Metales, metaloides y compuestos inorgánicos. | Anual. |
| Compuestos orgánicos sintéticos. | Anual. |
| Desinfectantes | Cada cuatro horas. |
| Subproductos de desinfección. | Anual. |
| Radiactivos. | Cada cinco años. |

**6.3 se elimina**

**6.4 …**

**7. Métodos de prueba**

**7.1** Para la verificación oficial de las especificaciones que se establecen en esta norma se deben aplicar los métodos de prueba que establece el Apéndice normativo A y los de la NOM-210-SSA1-2015**.**

**7.2** Para el control interno, se podrán utilizar los métodos señalados en el numeral anterior o métodos alternativos.

**8. a 10.4…**

**10.5** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA-6010C-2007 "Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry”, November 2000.

**10.6** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 6020A “Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry”, January 1998

**10.7** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 8260C “Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/mass Spectrometry (GC/MS)”, August 2006

**10.8** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 9362B “Purge and Trap Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Method”.

**10.9** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 300.1 “Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography”, April 1999.

**10.10** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 5030C Purge-and-Trap for Aqueous samples, May 2003

**10.11** Environmental Protection Agency, Methods for Analysis of Water and Wastes. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Method 9021 Purgeable Organic Halides (POX), July 1992.

**10.12** ISO 15061 Water quality. Determination of dissolved bromate. Method by liquid chromatography of ions, First Edition 2001.

**10.13** ISO 9562 Water quality. Determination of adsorbable organically bound halogens (AOX), Third Edition 2004.

**10.14** ASTM Standard Test Method for antimony in water D3697-12.

**10.15** Manual of food quality control12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory. Food and Agriculture Organization. FAO.

**10.16** Standar Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21 st Edition. 2005

**10.17** Guidelines for Drinking-water Quality. First Addendum to Third Edition. Volume 1 World Health Organization.

**10.18** Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety. The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. WHO, NSF IWA

**11 a 12.1**

**Apéndice normativo A. Métodos de pruebas microbiológicas y fisicoquímicas.**

**A.1. Símbolos, abreviaturas y definiciones.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **A.1.1** | HCN | Ácido Cianhídrico |
| **A.1.2**  | EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| **A.1.3**  | HF | Ácido fluorhídrico |
| **A.1.4**  | Al | Aluminio |
| **A.1.5**  | ACS | American Chemical Society |
| **A.1.6**  | SFA ó SAF | Análisis de Flujo Segmentado |
| **A.1.7**  | Sb | Antimonio |
| **A.1.8**  | As | Arsénico |
| **A.1.9**  | Bq/L | Bequerel por litro |
| **A.1.10**  | Ba | Bario |
| **A.1.11**  | CO2 | Bióxido de carbono  |
| **A.1.12**  | Bi | Bismuto |
| **A.1.13**  | CCB | Blanco de calibración continua |
| **A.1.14**  | BFB | 4-Bromofluorobenceno |
| **A.1.15**  | Cd | Cadmio |
| **A.1.16**  | cm | Centímetro |
| **A.1.17**  | cm2 | Centímetro cuadrado |
| **A.1.18**  | CN- | Cianuro |
| **A.1.19**  | Zr | Circonio |
| **A.1.20**  | Cl2 | Cloro |
| **A.1.21**  | CNCl | Cloruro de cianógeno |
| **A.1.22**  | Cu | Cobre |
| **A.1.23**  | r | Coeficiente de correlación |
| **A.1.24**  | AOX | Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos  |
| **A.1.25**  | POX | Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables |
| **A.1.26**  | C/mol | Coulomb/mol |
| **A.1.27**  | CG/MS | Cromatografía de gases-espectrómetro de masas |
| **A.1.28**  | CG | Cromatógrafo de gases/Cromatografía de gases |
| **A.1.29**  | CG/FID | Cromatografo de gases con detector de ionización de flama |
| **A.1.30**  | Cr | Cromo |
| **A.1.31**  | %DER | Desviación estándar relativa |
| **A.1.32**  | CD | Detector de conductividad |
| **A.1.33**  | FID | Detector de Ionización de Flama |
| **A.1.34**  | ID | Diámetro Interno |
| **A.1.35**  | DRP | Diferencia relativa del porcentaje |
| **A.1.36**  | DGN | Dirección General de Normas |
| **A.1.37**  | CVI | Disolución estándar de control de calidad de verificación inicial |
| **A.1.38**  | CCV | Disolución estándar de verificación de la calibración continua |
| **A.1.39**  | LLCCV | Disolución estándar de verificación de la calibración de nivel bajo |
| **A.1.40**  | eV | Electronvoltio |
| **A.1.41**  | SPA | Establecimientos Salud por Agua.  |
| **A.1.42**  | STD | Estándar |
| **A.1.43**  | FC | Factor de calibración |
| **A.1.44**  | FD | Factor de dilución. |
| **A.1.45**  | FR | Factor de respuesta. |
| **A.1.46**  | FRR | Factor de Respuesta Relativo |
| **A.1.47**  | FEP | Fluoro etilen propileno |
| **A.1.48**  | P | Fósforo |
| **A.1.49**  | °C | Grado Celsius |
| **A.1.50**  | g/mL | Gramos por mililitro |
| **A.1.51**  | Fe | Hierro |
| **A.1.52**  | Ho | Holmio |
| **A.1.53**  | h | Hora |
| **A.1.54**  | In | Indio |
| **A.1.55**  | IEC | Interferencias espectrales |
| **A.1.56**  | Cl- | Ión Cloruro |
| **A.1.57**  | F- | Ión fluoruro |
| **A.1.58**  | Y | Itrio |
| **A.1.59**  | LDE | Lámpara de descarga sin electrodos |
| **A.1.60**  | LCH | Lámpara de cátodo hueco |
| **A.1.61**  | LDI | Límite de detección del instrumento |
| **A.1.62**  | LDM | Límite de detección del método |
| **A.1.63**  | Li | Litio |
| **A.1.64**  | L | Litro |
| **A.1.65**  | λ | Longitud de onda |
| **A.1.66**   | Mn | Manganeso |
| **A.1.67**  | MΩ-cm | Megaohm-centímetro |
| **A.1.68**  | Hg | Mercurio |
| **A.1.69**  | MtBe | Metil terbutil éter |
| **A.1.70**  | P-A | Método de presencia ausencia. |
| **A.1.71**  | μg | Microgramo |
| **A.1.72**  | µL | Microlitro |
| **A.1.73**  | µm | Micrómetro |
| **A.1.74**  | μS/cm | Micro Siemens sobre centímetro |
| **A.1.75**  | mg | Miligramo |
| **A.1.76**  | mg/L | Miligramo por litro |
| **A.1.77**  | mg/mL | Miligramo por mililitro |
| **A.1.78**  | mL | Mililitro |
| **A.1.79**  | mL/min | Mililitro por minuto |
| **A.1.80** | mm | Milímetro |
| **A.1.81**  | min | Minuto (s) |
| **A.1.82**  | M | Molaridad |
| **A.1.83**  | Mo | Molibdeno |
| **A.1.84**  | MCI | Muestra de calidad de control interno |
| **A.1.85**  | MCL | Muestra control de laboratorio |
| **A.1.86**  | MCC | Muestra de control de calidad |
| **A.1.87**  | DFD | N-N-Dietil-p-fenilendiamina |
| **A.1.88**  | ng | Nanogramos |
| **A.1.89**  | ng/L | Nanogramos por litro |
| **A.1.90**  | nm | Nanómetros |
| **A.1.91**  | Ni | Níquel |
| **A.1.92**  | N | Normalidad |
| **A.1.93**  | No. | Número |
| **A.1.94**  | NMP | Número Más Probable |
| **A.1.95**  | EICP | Perfil de corriente de iones extraídos |
| **A.1.96**  | PFA | Perfluoroalcóxido |
| **A.1.97**  | PM | Peso Molecular |
| **A.1.98**  | pg | Picogramo |
| **A.1.99**  | ICP-OES | Plasma Inductivamente Acoplado con Espectrometría de Emisión Óptica |
| **A.1.100**  | ICP-MS | Plasma Inductivamente Acoplado con Espectrometría de Masas |
| **A.1.101**  | Ag | Plata |
| **A.1.102**  | Pb | Plomo |
| **A.1.103**  | PTFE | Politetrafluoroetileno |
| **A.1.104**  | % | Porciento o Porcentaje |
| **A.1.105**  | K | Potasio |
| **A.1.106**  | pH | Potencial de hidrógeno |
| **A.1.107**  | m/z | Proporción masa/carga |
| **A.1.108**  | RF | Radiofrecuencia |
| **A.1.109**  | rpm | Revoluciones por minuto |
| **A.1.110**  | Rh | Rodio |
| **A.1.111**  | seg | Segundos |
| **A.1.112**  | Se | Selenio |
| **A.1.113**  | CI | Sistema de cromatografía iónica |
| **A.1.114**  | SCI | Solución de comprobación de Interferencia |
| **A.1.115**  | SAF | Solución patrón de sulfato ferroso amónico |
| **A.1.116**  | TFE | Tetrafluoroetileno |
| **A.1.117**  | tR | Tiempo de retención |
| **A.1.118**  | SCN- | Tiocianato |
| **A.1.119**  | THM | Trihalometanos |
| **A.1.120**  | UV | Ultravioleta |
| **A.1.121**  | UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| **A.1.122**  | UNT | Unidades Nefelométricas de Turbiedad |
| **A.1.123**  | Pt-Co | Unidad Platino-Cobalto |
| **A.1.124**  | V | Vanadio |
| **A.1.125**  | W | Wolframio ó watts (según el caso). |
| **A.1.126**  | Agua Tipo I | Al agua con una conductividad eléctrica de 0.1 µS/cm a 25 °C como máximo o Resistividad > 10 MΩ-cm a 25 °C. |
| **A.1.127**  | Agua Tipo II | Al agua con una conductividad eléctrica de 1.0 µS/cm a 25 °C como máximo o Resistividad > 1 MΩ-cm a 25 °C. |
| **A.1.128**  | Analito | Compuesto o elemento químico analizado. |
| **A.1.129**  | Blanco de calibración | Un volumen de agua reactiva acidificada con la misma matriz ácida de los estándares de calibración. |
| **A.1.130**  | Blanco electrónico | Corrida sin inyección de muestra para verificar que no hay contaminación en el sistema. |
| **A.1.131**  | Blanco de lavado | Un volumen de agua reactiva o agua reactiva acidificada para lavado entre muestras para reducir las interferencias por efecto de memoria. |
| **A.1.132** | Blanco de Reactivos | A la disolución que contiene todos los reactivos usados en el procesamiento de la muestra en los mismos volúmenes y concentraciones. Este blanco debe seguir los pasos de digestión y preparación de la muestra. |
| **A.1.133**  | Blanco de reactivos fortificado | A la disolución que se prepara a partir de una alícuota del blanco de reactivos, añadiendo una alícuota de la disolución estándar de concentración conocida del analito, para dar una concentración final que produzca una señal aceptable que se encuentre dentro del intervalo de la curva. El blanco de reactivos fortificado debe seguir el mismo esquema de digestión y preparación de la muestra. |
| **A.1.134**  | Disolución estándar de control de calidad de verificación inicial (CVI) | Disolución preparada en la misma matriz ácida con la que se preparan las disoluciones estándares de calibración. Esta disolución debe ser un estándar independiente cuya concentración debe estar cercana al punto medio del intervalo lineal a una concentración distinta de la utilizada para la calibración del instrumento. |
| **A.1.135**  | Disolución estándar de verificación de la calibración continua (CCV) | Disolución preparada en la misma matriz ácida con la que se prepara el CVI en o cerca del nivel medio de la curva de calibración, la cual se utiliza para verificar la curva de calibración al final de cada lote de análisis y después de cada 10 muestras. |
| **A.1.136**  | Disolución estándar de calibración de nivel bajo (LLCCV) | Disolución preparada en la misma matriz ácida con la que se prepara el CVI en el límite de cuantificación obtenido durante la validación, la cual se utiliza para verificar antes del análisis de las muestras cuando se realiza la curva de calibración inicial con un solo estándar de calibración y un blanco. |
| **A.1.137**  | Disolución multielemental certificada | Una disolución concentrada conteniendo 2 o más de los analitos del método, acompañada de un certificado que proporcione el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada y una declaración de la trazabilidad metrológica. |
| **A.1.138**  | Espectrometría de absorción atómica | A una rama del análisis instrumental en el cual un elemento es atomizado en el paso de la luz, este vapor atómico generado absorberá la luz a una λ específica para cada metal. La cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la cantidad de átomos del metal presente en la muestra. |
| **A.1.139**  | Espectrometría de absorción atómica por flama | Al método por el cual el elemento se determina mediante un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un sistema de nebulización y una fuente de atomización. La fuente de atomización es un quemador que utiliza diferentes mezclas de gases, las más frecuentes son aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno. |
| **A.1.140**  | Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito | Al método mediante el cual el elemento se determina por un espectrómetro de absorción atómica, usado en conjunto con un horno de grafito. El principio es esencialmente el mismo que en absorción atómica de aspiración directa en flama, excepto que se usa un horno en lugar de la flama para atomizar la muestra. |
| **A.1.141**  | Espectrometría de absorción atómica por vapor frio. | Al método que es otra aproximación para mejorar la sensibilidad de la absorción atómica, optimizando la eficiencia de muestreo en el quemador de pre-mezcla, en donde el mercurio se reduce químicamente al estado atómico libre haciendo reaccionar la muestra con un reductor fuerte (cloruro estanoso o borohidruro de sodio) en un recipiente de reacción cerrado. El mercurio volátil libre se arrastra del matraz de reacción burbujeando aire, argón o nitrógeno a través de la disolución. Los átomos del mercurio que se arrastran son transportados a una celda de absorción que se coloca en el paso de luz del espectrómetro de absorción atómica. A medida que los átomos de mercurio pasan por la celda de muestreo, la absorbancia medida se incrementa indicando el aumento de concentración en el paso de luz. |
| **A.1.142** | Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros | Es un método similar al del vapor frío. Las muestras reaccionan en un dispositivo externo con un agente reductor, generalmente borohidruro. Los productos gaseosos de reacción se llevan a una celda de muestreo que se encuentra en el paso óptico del espectrómetro de absorción atómica, en este caso, los productos de reacción son hidruros volátiles. Estos compuestos moleculares no son capaces de dar una señal de absorción atómica, por lo tanto la celda se calienta para disociar el hidruro gaseoso en átomos libres. Cuando el hidruro gaseoso se disocia en la celda calentada en átomos libres, la absorción atómica crece y cae a medida que se crean los átomos y escapan de la celda de absorción. Se mide el máximo de absorción o altura de pico, como señal analítica. Los elementos que se pueden determinar con esta técnica son: As, Pb, Sb, Se. |
| **A.1.143**  | Estándar de calibración | Una disolución preparada a partir de la dilución de un estándar concentrado que contienen uno o más de los analitos de interés. El estándar de calibración es utilizado para calibrar la respuesta del instrumento con respecto a la concentración del Analito. |
| **A.1.144**  | Límite de detección instrumental (LDI) | La concentración equivalente a la señal del analito similar a tres veces la desviación estándar de unas series de diez réplicas de la medición de la señal del blanco de calibración a la misma longitud de onda. |
| **A.1.145**  | Límite de detección del método (LDM) | Concentración mínima del analito que puede detectarse con un nivel de confianza predeterminado. |
| **A.1.146** (MCC) | Métodos de prueba | A los procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la Norma. |
| **A.1.147**  | Muestra de Control de Calidad | A una muestra externa al laboratorio, que contiene una alícuota de concentración conocida del analito, cuyos valores de absorbancia deben estar comprendidos en el intervalo lineal del método. |
| **A.1.148**  | Muestra de Control de Calidad Interno (MCI) | A una disolución con el analito a determinar, preparada a partir de una marca o número de lote diferente al estándar utilizado en la curva de calibración. |
| **A.1.149**  | Muestra fortificada | Muestra que contiene analitos de interés para determinar interferencias de la muestra específica. |
| **A.1.150**  | Solución de sintonización del espectrómetro de masas (tuning) | Solución que contiene elementos que representen todas las regiones de masas de interés para verificar que la resolución y la calibración de las masas del instrumento estén dentro de las especificaciones requeridas. Esta solución también se utiliza para verificar que el instrumento ha alcanzado la estabilidad térmica. |
| **A.1.151** | Subrogado | Un compuesto adicionado que es diferente del analito pero que tiene propiedades químicas similares, el cual es improbable que se encuentre en una concentración significativa y que se añade directamente a una alícuota de una muestra en cantidades conocidas antes de realizar cualquier procedimiento de procesamiento de la muestra. Se mide con los mismos procedimientos utilizados para medir otros componentes de la muestra. El propósito del uso del subrogado es monitorear el desempeño del método con cada muestra. |

**A.2. Métodos de pruebas microbiológicas.**

**A.2.1 Generalidades**

*Pseudomonas aeruginosa* es un organismo común en el medio ambiente y se puede encontrar en heces, tierra, agua y aguas residuales. Se multiplica en el agua y se considera como una de las principales causas de enfermedades nosocomiales.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que rara vez causa enfermedad seria en individuos sanos y se le considera como patógeno oportunista. Predominantemente causa daños en quemaduras, heridas, tracto respiratorio de personas enfermas e infecciones en ojos. En pacientes inmunocomprometidos puede causar fibrosis quística e infecciones pulmonares. También produce foliculitis asociadas a aguas de albercas y SPA contaminados. Muchas cepas son resistentes a varios agentes antimicrobianos.

No hay evidencias de que el agua contaminada con *Pseudomonas aeruginosa* haya sido fuente de infección para la población en general, pero en personas con alta susceptibilidad como niña, anciana y personas inmunocomprometidas constituye un riesgo para la salud, por lo que se convierte en un microorganismo de importancia sanitaria. La presencia de altos índices de *Pseudomonas aeruginosa* está asociada a quejas acerca del sabor, olor y turbiedad y no así a brotes.

En este método de prueba se describen tres técnicas para estimar, determinar y cuantificar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en agua potable, agua de albercas, agua envasada y hielo: 1 Técnica del número más probable y 2 Técnica de filtración por membrana.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones en que se llevan a cabo estos métodos.

**A.2.2 Método de prueba para la determinación *Pseudomonas aeruginosa*.**

**A.2.2.1 Método de prueba para el NMP.**

**A.2.2.1.1 Fundamento**

Es un método de estimación probabilística de la densidad bacteriana presente en una muestra, basada en la dilución de la misma, sembrada e incubada en réplicas de tubos con caldo asparagina, que en presencia de luz ultravioleta produce un pigmento verde fluorescente (prueba presuntiva). La prueba confirmativa consiste en sembrar cada uno de los tubos que producen fluorescencia en medio de acetamida. La *Pseudomonas* *aeruginosa* tiene la capacidad de desaminar la acetamida en amoniaco alcalinizando el medio y desarrollando un color rojo que se detecta con ayuda del indicador rojo de fenol.

**A.2.2.1.2 Definiciones**

Para fines de este método se entiende por:

*Pseudomonas aeruginosa*: es un bacilo Gram negativo, aerobio, con flagelos polares que pertenece a la Familia Pseudomonadaceae. En medios adecuados produce un pigmento azulado llamado piocianina. Muchas cepas también producen pigmentos pero de color verde fluorescente (fluoresceína). Son catalasa y oxidasa positivas y producen amoniaco a partir de la arginina. Crecen en citrato como única fuente de carbono.

**A.2.2.1.3 Condiciones de prueba**

**A.2.2.1.3.1** Trabajar en condiciones asépticas en un área limpia y descontaminada.

**A.2.2.1.3.2** Todo el material que esté en contacto con la muestra debe estar estéril.

**A.2.2.1.4 Medidas de seguridad**

**A.2.2.1.4.1** Utilizar lentes de protección cuando se incida la luz ultravioleta.

**A.2.2.1.4.2** Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

**A.2.2.1.5 Medidas de control de calidad**

**A.2.2.1.5.1** El laboratorio debe tener claramente definido un sistema de control de calidad, para asegurar que los materiales, equipos, reactivos, medios de cultivo y técnicas sean adecuados para la prueba.

**A.2.2.1.6 Materiales**

**A.2.2.1.6.1** Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 ml y 1 ml, con tapón de algodón y divisiones de 0.1 ml. **A.2.2.1.6.2** Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total o un dispensador de líquidos equivalente.

**A.2.2.1.6.3** Frascos de vidrio de 500 ml y un litro con tapón de rosca.

**A.2.2.1.6.4** Tubos de 16 x 150 mm y 18 x 200 mm con tapón de rosca.

**A.2.2.1.6.5** Botellas de dilución de borosilicato de boca ancha con tapón de rosca.

**A.2.2.1.6.6** Mechero de Bunsen.

**A.2.2.1.6.7** Gradillas de plástico o metal

**A.2.2.1.6.8** Asas bacteriológicas de 3 mm a 3.5 mm de diámetro con porta asa

**A.2.2.1.6.9** Lentes protectores.

**A.2.2.1.6.10** Termómetros de inmersión parcial con división mínima de 1 ºC para incubadora calibrado o verificado

**A.2.2.1.6.11** Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5 °C calibrado o ciclos de esterilización validados.

**A.2.2.1.6.12** Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo

**A.2.2.1.6.13** Probetas de 100, 500 y 1000 ml

**A.2.2.1.6.14** Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio deberá esterilizarse mediante horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o en autoclave, a 121 ± 1.0°C durante 15 minutos como mínimo

**A.2.2.1.6.15** El material de vidrio puede sustituirse por material desechable no tóxico. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

**A.2.2.1.7 Medios de cultivo, reactivos y soluciones.**

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con un pH de 5 a 7.

Los reactivos deben ser grado analítico.

**A.2.2.1.7.1 Soluciones**

**A.2.2.1.7.1.1 Solución de hidróxido de sodio 0.01 N**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTE** | **CANTIDAD** |
| Hidróxido de sodio | 0.04 g |
| Agua | 100.0 ml |

**A.2.2.1.7.1.1.1** Preparación:

**A.2.2.1.7.1.1.2** Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

**A.2.2.1.7.1.2 Etanol al 70%**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTE** | **CANTIDAD** |
| Etanol al 95% | 700 mL |
| Agua destilada | Adicionar hasta un volumen final de 1 000 ml |

**A.2.2.1.7.2 Soluciones diluyentes**

**A.2.2.1.7.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTE** | **CANTIDAD** |
| Fosfato de sodio monobásico | 34.0 g |
| Agua | 1.0 L |

**A.2.2.1.7.2.1.1** Preparación:

**A.2.2.1.7.2.1.1.1** Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7.2 ±0.2 con solución de hidróxido de sodio 0.1N. Llevar a un litro con agua.

**A.2.2.1.7.2.1.1.2** Esterilizar durante 15 minutos a 121° ± 1.0°C. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1.25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). **A.2.2.1.7.2.1.1.3** Distribuir en porciones de 450 ml, 225 ml, 99 ml, 90 ml y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121° ± 1.0°C durante 15 minutos. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser de acuerdo a lo requerido y el pH debe estar dentro del intervalo descrito.

 **A.2.2.1.7.2.2 Agua peptonada**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTE** | **CANTIDAD** |
| Peptona | 1.0 g |
| Cloruro de sodio | 8.5 g |
| Agua | 1.0 L |

**A.2.2.1.7.2.2.1** Preparación:

**A.2.2.1.7.2.2.1.1** Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 con hidróxido de sodio 1.0 N. Distribuir en porciones de 450, 225, 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

**A.2.2.1.7.2.2.1.2** Esterilizar a 121 ± 1.0°C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 2 °C a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**A.2.2.1.7.3 Medios de cultivo**

**A.2.2.1.7.3.1 Caldo Asparagina**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTES** | **CANTIDAD** |
| **Concentración 1X** | **Concentración 2X** | **Concentración 3X** | **Concentración 6X** |
| **1ml o 0.1 ml de muestra con 10 ml de caldo.** | **10 ml muestra con 10 ml de caldo.** | **100 ml de muestra con 50 ml de caldo.** | **100 ml de muestra con 20 ml de caldo.** |
| Asparagina, DL | 3.0 g | 6.0 g | 9.0 g | 18.0 g |
| K2HPO4, fosfato dipotásico anhidro monohidrogenado | 1. 0 g | 2.0 g | 3.0 g | 6.0 g |
| MgSO4 · 7 H2O, Sulfato de magnesio | 0.5 g | 1.0 g | 1.5 g | 3.0 g |
| Agua  | 1 L | 1 L | 1 L | 1 L |

**A.2.2.1.7.3.1.1** Preparación:

**A.2.2.1.7.3.1.1.1** Disolver todos los ingredientes en un litro de agua y ajustar el pH de 6.9 a 7.2 antes de esterilizar. Distribuir en volúmenes adecuados según se requiera, ver tabla anterior. Esterilizar durante 15 minutos a 121° ± 1.0°C.

**A.2.2.1.7.3.1.1.2** Después de la esterilización, el pH debe estar dentro del intervalo descrito y los volúmenes finales deben ser iguales a lo indicado en la tabla.

**NOTA**: En caso no contar con fórmula comercial deshidratada, preparar por ingredientes.

**A.2.2.1.7.3.2 Caldo Acetamida**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTES** | **CANTIDAD** |
| Acetamida | 10.0 g |
| NaCl, cloruro de sodio | 5.0 g |
| K2HPO4, fosfato dipotásico anhidro monohidrogenado | 1.39 g |
| KH2PO4, fosfato monopotásico anhidro dihidrogenado | 0.73 g |
| MgSO4 · 7 H2O, Sulfato de magnesio | 0.5 g |
| Agua | 1 L |

**A.2.2.1.7.3.2.1** Preparación:

**A.2.2.1.7.3.2.1.1** Disolver los ingredientes en un litro de agua y ajustar el pH de 7.2 ± 0.1.

**A.2.2.1.7.3.2.1.2** Pesar 1.2 g de rojo de fenol y disolver en 100 ml de solución de NaOH 0.01N y agregar 1 ml por cada litro de caldo acetamida. La solución de rojo de fenol concentrada se puede utilizar hasta 1 año después de su preparación.

**A.2.2.1.7.3.2.1.3** Distribuir en volúmenes de 10 ml. Esterilizar durante 15 minutos a 121° ± 1,0°C. Después de la esterilización, el pH debe ser de 7.0 ± 0.2.

**A.2.2.1.7.3.2.1.4** Si se prefiere utilizar agar inclinado, adicionar 15 g de agar por cada litro de medio. Calentar para disolver el agar y distribuir 8 ml en tubos de 16 X 150 mm. Esterilizar y enfriar inclinando los tubos para obtener un bisel largo.

**NOTA:** En caso no contar con fórmula comercial deshidratada, preparar por ingredientes.

**A.2.2.1.8 Aparatos e instrumentos**

**A.2.2.1.8.1** Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1.0 ºC, provista con termómetro calibrado y/o verificado.

**A.2.2.1.8.2** Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C, con termómetro calibrado y/o verificado.

**A.2.2.1.8.3** Termómetro de máximas calibrado o ciclo de esterilización validado

**A.2.2.1.8.4** Lámpara de luz UV de longitud de onda de 360 ± 20 nm.

**A.2.2.1.8.5** Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH

**A.2.2.1.8.6** Autoclave que alcance una temperatura de 121 °C con termómetro calibrado y previamente evaluada con esporas de *Geobacillus stearothermophilus*

**A.2.2.1.8.7** Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g

**A.2.2.1.9 Preparación de la muestra**

**A.2.2.1.9.1** Descontaminar el exterior de los contenedores de la muestra con etanol o isopropanol al 70 %.

**A.2.2.1.9.2** Realizar diluciones decimales cuando proceda.

**A.2.2.1.10 Recomendaciones generales previas para al análisis de la muestra.**

**A.2.2.1.10.1** Las muestras contenidas en frascos con un espacio vacío (de al menos 2.5 cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida 25 veces.

**A.2.2.1.10.2** Las muestras en frascos que tengan de 2/3 a ¾ de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm completados en un tiempo de 7 segundos, para asegurar una unidad analítica representativa.

**A.2.2.1.11 Procedimiento analítico**

**A.2.2.1.11.1 Prueba presuntiva**

**A.2.2.1.11.1.1** Utilizar 5 tubos con Caldo Asparagina por cada porción de 10 ml, 1ml y 0,1 ml de muestra. Para inóculos de 10 ml de agua, preparar el medio a doble concentración (2x) y para volúmenes de 1 y 0.1 ml a concentración sencilla (1x).

**A.2.2.1.11.1.2** Hacer diluciones decimales de la muestra cuando se considere necesario con solución reguladora de fosfatos o agua peptonada.

**A.2.2.1.11.1.3** Incubar los tubos de 36°C ± 1°C por 24 h y 48 h. Examinar los tubos con una lámpara de luz UV en cuarto oscuro. La producción de un pigmento verde fluorescente se considera como una prueba presuntiva positiva.

**A.2.2.1.11.2 Prueba confirmativa**

**A.2.2.1.11.2.1** Inocular 0.1 ml de cada uno de los tubos positivos en Caldo Acetamida o en la superficie de agar Acetamida inclinado.

**A.2.2.1.11.3 Interpretación de resultados.**

**A.2.2.1.11.3.1** Incubar los tubos de 36°C ± 1°C. El desarrollo de un color rojo (pH alcalino) dentro de las 24 a 36 h se considera como una prueba confirmativa para *Pseudomonas aeruginosa*.

**A.2.2.1.11.3.2** Calcular la densidad de *Pseudomonas aeruginosa* por el número más probable en 100 mL con el número de tubos confirmados (véase tabla **A.2.2.1.11.6.3**).

**A.2.1.1.10.3.4** Considerar en el cálculo del resultado final la(s) dilución(es) realizada(s) cuando proceda.

**A.2.2.1.11.4 Criterios de validez de la prueba**

**A.2.2.1.11.4.1** Esta prueba tiene validez cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos cuando la muestra contenga Pseudomonas aeruginosa y cuando se inocule un cultivo control con 100 UFC.

**A.2.2.1.11.5 Índices de reproducibilidad y repetibilidad**

**A.2.2.1.11.5.1** Basado en una distribución normal, el 95% de las medias de cada grupo de resultados analíticos deben estar entre +2 y -2 desviaciones estándar con respecto a la media de las medias.\*

**A.2.2.1.11.5.2** La precisión del analista deberá estar dentro de un 5%.

**A.2.2.1.11.6 Informe de prueba**

**A.2.2.1.11.6.1** Informar como:

**A.2.2.1.11.6.2** *Pseudomonas aeruginosa*: (dato de la tabla1) NMP/100 ml

**Tabla A.2.2.1.11.6.3 Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **No. de Tubos Positivos** | **No. de Tubos Positivos** | **No. de Tubos Positivos** | **No. de Tubos Positivos** | **No. de Tubos Positivos** | **No. de Tubos Positivos** |
| **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** | **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** | **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** | **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** | **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** | **10 ml** | **1****ml** | **0.1****ml** | **NMP** |
| 0 | 0 | 0 | <1.8 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4.5 | 3 | 0 | 0 | 7.8 | 4 | 0 | 0 | 13 | 5 | 0 | 0 | 23 |
| 0 | 0 | 1 | 1.8 | 1 | 0 | 1 | 4 | 2 | 0 | 1 | 6.8 | 3 | 0 | 1 | 11 | 4 | 0 | 1 | 17 | 5 | 0 | 1 | 31 |
| 0 | 0 | 2 | 3.6 | 1 | 0 | 2 | 6 | 2 | 0 | 2 | 9.1 | 3 | 0 | 2 | 13 | 4 | 0 | 2 | 21 | 5 | 0 | 2 | 43 |
| 0 | 0 | 3 | 5.4 | 1 | 0 | 3 | 8 | 2 | 0 | 3 | 12 | 3 | 0 | 3 | 16 | 4 | 0 | 3 | 25 | 5 | 0 | 3 | 58 |
| 0 | 0 | 4 | 7.2 | 1 | 0 | 4 | 10 | 2 | 0 | 4 | 14 | 3 | 0 | 4 | 20 | 4 | 0 | 4 | 30 | 5 | 0 | 4 | 76 |
| 0 | 0 | 5 | 9.0 | 1 | 0 | 5 | 12 | 2 | 0 | 5 | 16 | 3 | 0 | 5 | 23 | 4 | 0 | 5 | 36 | 5 | 0 | 5 | 95 |
| 0 | 1 | 0 | 1.8 | 1 | 1 | 0 | 4 | 2 | 1 | 0 | 6.8 | 3 | 1 | 0 | 11 | 4 | 1 | 0 | 17 | 5 | 1 | 0 | 33 |
| 0 | 1 | 1 | 3.6 | 1 | 1 | 1 | 6.1 | 2 | 1 | 1 | 9.2 | 3 | 1 | 1 | 14 | 4 | 1 | 1 | 21 | 5 | 1 | 1 | 46 |
| 0 | 1 | 2 | 5.5 | 1 | 1 | 2 | 8.1 | 2 | 1 | 2 | 12 | 3 | 1 | 2 | 17 | 4 | 1 | 2 | 26 | 5 | 1 | 2 | 64 |
| 0 | 1 | 3 | 7.3 | 1 | 1 | 3 | 10 | 2 | 1 | 3 | 14 | 3 | 1 | 3 | 20 | 4 | 1 | 3 | 31 | 5 | 1 | 3 | 84 |
| 0 | 1 | 4 | 9.1 | 1 | 1 | 4 | 12 | 2 | 1 | 4 | 17 | 3 | 1 | 4 | 23 | 4 | 1 | 4 | 35 | 5 | 1 | 4 | 110 |
| 0 | 1 | 5 | 11 | 1 | 1 | 5 | 14 | 2 | 1 | 5 | 19 | 3 | 1 | 5 | 27 | 4 | 1 | 5 | 42 | 5 | 1 | 5 | 130 |
| 0 | 2 | 0 | 3.7 | 1 | 2 | 0 | 6.1 | 2 | 2 | 0 | 9.3 | 3 | 2 | 0 | 14 | 4 | 2 | 0 | 22 | 5 | 2 | 0 | 49 |
| 0 | 2 | 1 | 5.5 | 1 | 2 | 1 | 8.2 | 2 | 2 | 1 | 12 | 3 | 2 | 1 | 17 | 4 | 2 | 1 | 26 | 5 | 2 | 1 | 70 |
| 0 | 2 | 2 | 7.4 | 1 | 2 | 2 | 10 | 2 | 2 | 2 | 14 | 3 | 2 | 2 | 20 | 4 | 2 | 2 | 32 | 5 | 2 | 2 | 95 |
| 0 | 2 | 3 | 9.2 | 1 | 2 | 3 | 12 | 2 | 2 | 3 | 17 | 3 | 2 | 3 | 24 | 4 | 2 | 3 | 38 | 5 | 2 | 3 | 120 |
| 0 | 2 | 4 | 11 | 1 | 2 | 4 | 15 | 2 | 2 | 4 | 19 | 3 | 2 | 4 | 27 | 4 | 2 | 4 | 44 | 5 | 2 | 4 | 150 |
| 0 | 2 | 5 | 13 | 1 | 2 | 5 | 17 | 2 | 2 | 5 | 22 | 3 | 2 | 5 | 31 | 4 | 2 | 5 | 50 | 5 | 2 | 5 | 180 |
| 0 | 3 | 0 | 5.6 | 1 | 3 | 0 | 8,3 | 2 | 3 | 0 | 12 | 3 | 3 | 0 | 17 | 4 | 3 | 0 | 27 | 5 | 3 | 0 | 79 |
| 0 | 3 | 1 | 7.4 | 1 | 3 | 1 | 10 | 2 | 3 | 1 | 14 | 3 | 3 | 1 | 21 | 4 | 3 | 1 | 33 | 5 | 3 | 1 | 110 |
| 0 | 3 | 2 | 9.3 | 1 | 3 | 2 | 13 | 2 | 3 | 2 | 17 | 3 | 3 | 2 | 24 | 4 | 3 | 2 | 39 | 5 | 3 | 2 | 140 |
| 0 | 3 | 3 | 11 | 1 | 3 | 3 | 15 | 2 | 3 | 3 | 20 | 3 | 3 | 3 | 28 | 4 | 3 | 3 | 45 | 5 | 3 | 3 | 180 |
| 0 | 3 | 4 | 13 | 1 | 3 | 4 | 17 | 2 | 3 | 4 | 22 | 3 | 3 | 4 | 31 | 4 | 3 | 4 | 52 | 5 | 3 | 4 | 210 |
| 0 | 3 | 5 | 15 | 1 | 3 | 5 | 19 | 2 | 3 | 5 | 25 | 3 | 3 | 5 | 35 | 4 | 3 | 5 | 59 | 5 | 3 | 5 | 250 |
| 0 | 4 | 0 | 7,5 | 1 | 4 | 0 | 11 | 2 | 4 | 0 | 15 | 3 | 4 | 0 | 21 | 4 | 4 | 0 | 34 | 5 | 4 | 0 | 130 |
| 0 | 4 | 1 | 9,4 | 1 | 4 | 1 | 13 | 2 | 4 | 1 | 17 | 3 | 4 | 1 | 24 | 4 | 4 | 1 | 40 | 5 | 4 | 1 | 170 |
| 0 | 4 | 2 | 11 | 1 | 4 | 2 | 15 | 2 | 4 | 2 | 20 | 3 | 4 | 2 | 28 | 4 | 4 | 2 | 47 | 5 | 4 | 2 | 220 |
| 0 | 4 | 3 | 13 | 1 | 4 | 3 | 17 | 2 | 4 | 3 | 23 | 3 | 4 | 3 | 32 | 4 | 4 | 3 | 54 | 5 | 4 | 3 | 280 |
| 0 | 4 | 4 | 15 | 1 | 4 | 4 | 19 | 2 | 4 | 4 | 25 | 3 | 4 | 4 | 36 | 4 | 4 | 4 | 62 | 5 | 4 | 4 | 350 |
| 0 | 4 | 5 | 17 | 1 | 4 | 5 | 22 | 2 | 4 | 5 | 28 | 3 | 4 | 5 | 40 | 4 | 4 | 5 | 69 | 5 | 4 | 5 | 430 |
| 0 | 5 | 0 | 9.4 | 1 | 5 | 0 | 13 | 2 | 5 | 0 | 17 | 3 | 5 | 0 | 25 | 4 | 5 | 0 | 41 | 5 | 5 | 0 | 240 |
| 0 | 5 | 1 | 11 | 1 | 5 | 1 | 15 | 2 | 5 | 1 | 20 | 3 | 5 | 1 | 29 | 4 | 5 | 1 | 48 | 5 | 5 | 1 | 350 |
| 0 | 5 | 2 | 13 | 1 | 5 | 2 | 17 | 2 | 5 | 2 | 23 | 3 | 5 | 2 | 32 | 4 | 5 | 2 | 56 | 5 | 5 | 2 | 540 |
| 0 | 5 | 3 | 15 | 1 | 5 | 3 | 19 | 2 | 5 | 3 | 26 | 3 | 5 | 3 | 37 | 4 | 5 | 3 | 64 | 5 | 5 | 3 | 920 |
| 0 | 5 | 4 | 17 | 1 | 5 | 4 | 22 | 2 | 5 | 4 | 29 | 3 | 5 | 4 | 41 | 4 | 5 | 4 | 72 | 5 | 5 | 4 | 1600 |
| 0 | 5 | 5 | 19 | 1 | 5 | 5 | 24 | 2 | 5 | 5 | 32 | 3 | 5 | 5 | 45 | 4 | 5 | 5 | 81 | 5 | 5 | 5 | >1600 |

Referencia: AOAC 18 ° Edición. Revisión 2, 2007 Table 978.23.

**A.2.2.1.11.6.4** Considerar en el cálculo del resultado final la(s) dilución(es) realizadas cuando proceda.

**A.2.2.1.11.7 Método de filtración por membrana (FM)**

**A.2.2.1.11.7.1 Fundamento**

**A.2.2.1.11.7.1.1** El método se basa en filtrar un volumen específico de agua a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0.45 μ m. El filtro se coloca en un agar selectivo incubado a 41.5 °C ± 0.5 °C.

**A.2.2.1.11.7.1.2** Las colonias cafés con centro oscuro son confirmadas en agar leche en el cual se hidroliza la caseína produciendo un pigmento de amarillo a verde que se difunde en el agar.

**A.2.2.1.11.7.2 Materiales.**

**A.2.2.1.11.7.2.1** Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 60 X 15 mm o 50 X 9 mm u otro tamaño apropiado

**A.2.2.1.11.7.2.2** Portafiltros esterilizables de plástico, porcelana, acero inoxidable o vidrio.

**A.2.2.1.11.7.2.3** Matraz Kitazato

**A.2.2.1.11.7.2.4** Membranas para filtración estériles con poro de 0.45 µ m

**A.2.2.1.11.7.2.5** Pinzas de acero inoxidable para membrana

**A.2.2.1.11.7.2.6** Contador mecánico o manual de Tally o equivalente.

**A.2.2.1.11.7.2.7** Porta asa y asa bacteriológica

**A.2.2.1.11.7.3 Aparatos e Instrumentos**

**A.2.2.1.11.7.3.1** Bomba de vacío (20-27 pulgadas Hg), tubería y aditamentos herméticos para mantener el vacío.

**A.2.2.1.11.7.3.2** Sistema de filtración.

**A.2.2.1.11.7.3.3** Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.

**A.2.2.1.11.7.3.4** Balanza analítica

**A.2.2.1.11.7.3.5** Incubadora que evite variaciones mayores de ± 0.5ºC

**A.2.2.1.11.7.3.6** Microscopio estereoscópico, óptico o equivalente

**A.2.2.1.11.7.4 Medios de cultivo**

**A.2.2.1.11.7.4.1 Agar M-PA**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| **INGREDIENTES** | **CANTIDAD** |
| L-Lisina HCl | 5.0 g |
| Cloruro de sodio, NaCl | 5.0 g |
| Extracto de levadura | 2.0 g |
| Xilosa | 2.5 g |
| Sacarosa | 1.25 g |
| Lactosa | 1.25 g |
| Rojo de fenol | 0.08 g |
| Citrato férrico amoniacal | 0.8 g |
| Tiosulfato de sodio, Na2S2O3 | 6.8 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua | 1 L |

**A.2.2.1.11.7.4.1.1** Preparación:

**A.2.2.1.11.7.4.1.1.1** Disolver los ingredientes en un litro de agua. Ajustar el pH a 6.5 ±0.1 y esterilizar en autoclave.

**A.2.2.1.11.7.4.1.1.2**  Enfriar de 55 °C a 60°C, reajustar el pH a 7.1 ± 0.2 y adicionar los siguientes antibióticos en polvo por cada litro de base de agar: sulfapiridina\*, 176 mg; kanamicina\*, 8.5 mg; ácido nalidixico\*, 37.0 mg; y cicloheximida\*, 150 mg. Mezclar y distribuir 3ml en cajas Petri de 50 X 12 mm. Almacenar las placas de 2 a 8 °C.

**A.2.2.1.11.7.4.1.1.3** Descartar el medio sin utilizar después de 1 mes de su preparación.

\* Sigma Chemical o equivalente.

**A.2.2.1.11.7.4.2 Agar M-PA-C modificado**

**A.2.2.1.11.7.4.2.1** Este medio se encuentra comercialmente disponible en forma deshidratada y la diferencia en la fórmula del M-PA-C original, es el contenido de sulfato de magnesio 1.5 g, kanamicina 8 mg y ácido nalidixico 37.0 mg por litro.

**A.2.2.1.11.7.4.2.2** No usar el medio después de una semana de su preparación.

**A.2.2.1.11.7.4.3 Agar leche (modificado por Brown y Scott Foster)**

**Mezcla A**

|  |  |
| --- | --- |
| Leche descremada | 100 g |
| Agua | 500 ml |

**Mezcla B**

|  |  |
| --- | --- |
| Caldo nutritivo | 12.5 g |
| Cloruro de sodio, NaCl | 2.5 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua | 500 ml |

**A.2.2.1.11.7.4.3.1 Preparación:**

**A.2.2.1.11.7.4.3.1.1** Disolver los ingredientes por separado y esterilizar. Enfriar rápidamente a 55 °C. Combinar la mezcla A y B y distribuir porciones de 20 a 25 ml en cajas Petri. Dejar solidificar.

**A.2.2.1.11.7.5 Prueba presuntiva**

**A.2.2.1.11.7.5.1** Filtrar 200 mL o menos de muestra a través del filtro estéril. Colocar la membrana en placas con agar M-PA modificado de, evitar burbujas de aire entre la membrana y la superficie del agar. Invertir las placas e incubar a 41.5 ± 0.5 °C por 72 horas.

**A.2.2.1.11.7.5.2** Las colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* son de 0.8 mm a 2.2 mm de diámetro, cafés con centro negro verdoso y planas

**A.2.2.1.11.7.5.3** Con ayuda de un cuenta colonias y/o un lente amplificador de 10 a 15 aumentos, seleccionar cajas que contengan entre 20 colonias a 80 colonias típicas (no más de 100) y contar el número de UFC.

**A.2.2.1.11.7.6 Prueba confirmativa**

**A.2.2.1.11.7.6.1** Seleccionar colonias aisladas típicas y atípicas y sembrar una estría de 2 cm a 4 cm de longitud en agar leche. Incubar a 35 °C ± 1.0 °C por 24 horas. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* hidrolizan la caseína produciendo un pigmento de amarillo a verde que se difunde en el agar.

**A.2.2.1.11.7.7 Cálculos**

**Fórmula A.2.2.1.11.7.7.1**

**A.2.2.1.11.7.8 Interpretación de resultados**

**A.2.2.1.11.7.8.1** La presencia de colonias aisladas en agar leche incubadas a 35 °C ±1.0 °C por 24 horas, que producen un pigmento de amarillo a verde que se difunde en el agar, se considera la confirmación de la presencia *Pseudomonas aeruginosa*.

**A.2.2.1.11.7.9 Criterios de validez de la prueba**

**A.2.2.1.11.7.9.1** Esta prueba tiene validez si se obtienen cajas que contengan entre 20 UFC a 80 UFC (no más de 100).

**A.2.2.1.11.7.10 Informe de prueba**

**A.2.2.1.11.7.10.1** Informar como:

*Pseudomonas aeruginosa* (colonias contadas) UFC/100 ml

**A.2.2.1.11.7.10.2** Si no se observan colonias informar como:

*Pseudomonas aeruginosa* < 1 UFC / 100 ml

 **A.2.3 Método de prueba para la determinación de esporas de *Clostridium*sulfito reductores.**

**A.2.3.1 Fundamento.**

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo asociado a los *Clostridium spp* y como tal se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens* (OMS, 1995) que, de acuerdo a un estudio realizado en los sistemas hidrológicos de Estados Unidos, fue detectado en un 73% de las muestras, demostrando así su presencia en las aguas naturales al igual que los coliformes (Francy y col., 2000). Son deteriorantes, ya que producen malos olores y, con mucha frecuencia, ennegrecimiento del producto cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro. Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir los sulfitos a sulfuros a partir de aminoácidos y compuestos azufrados (Mac Faddin, 1980) y para su detección se utiliza la evidente coloración negra dada por la formación del precipitado

Debido a las características que poseen los anaerobios sulfito-reductores es que se han propuesto como indicadores de contaminación de alto riesgo del agua. La ventaja más importante es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliforme y son resistentes a la desinfección, al punto que pueden ser detectados en algunas muestras de agua después de haber recibido predesinfección, floculación, sedimentación, filtración y la desinfección terminal (Payment, 1991). Por las razones expuestas, el aislamiento de anaerobios sulfito-reductores se propone para indicar el riesgo de sobrevivencia de agentes patógenos en ciertos ecosistemas expuestos a contaminación fecal remota, como también que, por sus características de tamaño y resistencia a la desinfección, logren escapar a los tratamientos habitualmente aplicados al agua (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995; Cho y col., 2000).

El método de cuantificación de bacterias en agua es el de «tubos múltiples» identificado comúnmente como NMP (número más probable), que entrega un valor probabilístico de la cantidad de bacterias en 100 ml de agua y que para la determinación de anaerobios sulfito reductores en agua, está descrito en la norma internacional ISO 6461 (ISO, 1986). El método de NMP, si bien entrega un valor aproximado sobre la cantidad de bacterias presente en la muestra, corresponde a la técnica usualmente empleada para la detección de coliformes en agua (Chile, 1998)

El método para la detección de esporas anaerobias sulfito-reductoras (clostridia) de una muestra de agua, consta de las:

* Selección de esporas. La selección de esporas se realiza por la aplicación de calor en un tiempo suficiente para destruir las células vegetativas.
* Enriquecimiento: inoculación de diferentes volúmenes de la muestra en medio de enriquecimiento líquido, seguido de la incubación a 37°C ±1°C por 44 ±4 horas en condiciones de anaerobiosis.

Este método es aplicable a todo tipo de agua, incluso agua turbia.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones en que se llevan a cabo estos métodos.

**A.2.3.2 Condiciones de prueba, medidas de seguridad y de control de calidad.**

**A.2.3.2.1** Trabajar en condiciones asépticas en un área limpia y descontaminada.

**A.2.3.2.2** Todo el material que esté en contacto con la muestra debe estar estéril.

**A.2.3.2.3** Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

**A.2.3.2.4** El laboratorio debe tener implementado un sistema de control de calidad para asegurar que los materiales, equipos, reactivos, medios de cultivo y técnicas sean adecuados para la prueba.

**A.2.3.3 Materiales.**

**A.2.3.3.1** Frascos con tapa de rosca o viales y tapones de vidrio de borosilicato de 200 mL, 100 mL y 25 mL de capacidad.

**A.2.3.3.2** Pipetas de 10 y 1 mL de capacidad.

**A.2.3.3.3** Tubos de prueba de 150 mm x 13 mm.

**A.2.3.3.4** Alambre de fierro.

**A.2.3.4 Medios de cultivo, reactivos y diluyentes.**

**A.2.3.4.1** Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico.

**A.2.3.4.2** Para mejorar la reproducibilidad de los resultados utilizar el medio completo deshidratado, con sus ingredientes grado reactivo con sus correspondiente certificados de calidad.

**A.2.3.4.3** El agua utilizada debe ser desionizada, libre de substancias que puedan inhibir el desarrollo de microorganismos en las condiciones de la prueba.

**A.2.3.4.4** Si el medio de cultivo preparado no se utiliza de inmediato, se debe guardar en la oscuridad, a 4°C, por no más de 1 mes.

**A.2.3.4.5 Diluyente.**

**A.2.3.4.5.1** Los diluyentes que a continuación se describen son los que comúnmente se utilizan en microbiología. Después de su preparación se distribuye en botellas y esterilizar a 121°C ±3°C por 15 min.

**A.2.3.4.5.2** Alternativamente se puede distribuir asépticamente después de la esterilización. Almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración 5°C ±3°C por un máximo de 6 meses. Si el diluyente presenta algún cambio de su normal apariencia descartarlo.

**A.2.3.4.6 Solución salina.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| Cloruro de sodio. | 8.5 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.4.6.1** Preparación**.**

**A.2.3.4.6.1.1** Disolver los ingredientes en agua, si es necesario por calentamiento. Ajustar el pH con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N o una disolución de HCl 0.1 N según se requiera, después de la esterilización el pH debe ser 7.0 ±0.5 a 25°C

**A.2.3.4.7 Diluyente de peptona.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| Peptona de caseína. | 1.0 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.4.7.1** Preparación.

**A.2.3.4.7.1.1** Disolver los ingredientes en agua, si es necesario por calentamiento. Ajustar el pH con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N o una disolución de HCl 0.1 N según se requiera, después de la esterilización el pH debe ser 7.0 ±0.5 a 25°C.

**A.2.3.4.8 Solución buffer de fosfatos.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| KH2PO4. | 34.0 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.4.8.1** Preparación.

**A.2.3.4.8.1.1** Disolver el KH2PO4 en 500 mL de agua. Ajustar el pH con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N o una disolución de HCl 0.1 N según se requiera a 7.2 ±0.2 a 25°C, adicionar más agua hasta 1000 mL, si la solución necesita ser almacenada esterilizar a 121°C ±3°C.

**A.2.3.4.9 Medio diferencial reforzado para Clostridia. (DRCM)**

**A.2.3.4.9.1 Medio basal concentración simple.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| Peptona de carne. | 10.0 g |
| Extracto de carne. | 10.0 g |
| Extracto de levadura. | 1.5 g |
| Almidón. | 1.0 g |
| Acetato de sodio hidratado. | 5.0 g |
| Glucosa. | 1.0 g |
| Clorhidrato de L-cisteína. | 0.5 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.4.9.1.1** Preparación.

**A.2.3.4.9.1.1.1** Mezclar la peptona de carne, el extracto de carne, el acetato de sodio y el extracto de levadura con 800 mL de agua.

Con los 200 mL de agua destilada restantes, preparar una solución de almidón de esta manera: mezclar el almidón en un poco de agua fría hasta formar una pasta. Calentar el resto del agua hasta ebullición y lentamente agregar la pasta con agitación constante.

Agregar la solución de almidón a la mezcla y caliente a ebullición hasta que se disuelva.

Finalmente, adicionar la glucosa y el clorhidrato de L-cisteína hasta que se disuelvan.

Ajustar el pH entre 7.1 y 7.2 con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N una disolución de HCl 0.1 N según se requiera.

Transferir alícuotas de 25 mL del medio en frascos con tapón de rosca con capacidad de 25 mL. Esterilizar en autoclave a 121°C ±1°C por 15 min.

**A.2.3.4.9.2 Medio basal doble concentración.**

**A.2.3.4.9.2.1** Preparar el medio a doble concentración como en el inciso anterior, pero reducir el volumen del agua a la mitad.

**A.2.3.4.9.2.2** Transferir alícuotas de 10 mL y 50 mL del medio en frascos con tapa de rosca de 25 mL y de 100 mL de capacidad respectivamente.

**A.2.3.4.9.3 Solución de sulfito de sodio (Na2SO3) al 4%.**

**A.2.3.4.9.3.1** Disolver 4 g de sulfito de sodio anhidro en 100 mL de agua. Esterilizar por filtración a través de membrana con tamaño de poro de 0.45 µm.

**A.2.3.4.9.3.2** Almacenar entre 2 a 5°C.

**A.2.3.4.9.3.3** Se recomienda preparar una solución reciente cada 14 días.

**A.2.3.4.9.4 Solución de citrato férrico (C6H507Fe) al 7%.**

**A.2.3.4.9.4.1** Disolver 7 g de citrato férrico en 100 mL de agua. Esterilizar por filtración a través de membrana con tamaño de poro de 0.45 µm.

**A.2.3.4.9.4.2** Almacenar entre 2 a 5°C.

**A.2.3.4.9.4.3** Se recomienda preparar una solución reciente cada 14 días.

**A.2.3.4.9.5 Medio completo**

**A.2.3.4.9.5.1** El día del análisis, mezcle volúmenes iguales de las soluciones de sulfito de sodio (véase **A.2.3.4.9.3**) y de citrato férrico (véase **A.2.3.4.9.4**).

**A.2.3.4.9.5.2** Adicionar 0.5 mL de la mezcla (véase **A.2.3.4.9.5.1**) a cada frasco de medio de concentración simple (véase A.2.3.4.9.1), que haya sido calentado y enfriado recientemente.

**A.2.3.4.9.5.2** Adicionar 0.4 mL de la mezcla (véase **A.2.3.4.9.5.1**) a cada frasco con 10 mL de medio de doble concentración (véase **A.2.3.4.9.2**) y 2 mL a cada frasco con 50 mL de medio de doble concentración (véase **A.2.3.4.9.2**). Tratamiento similar a (véase **A.2.3.4.9.5.2**).

**A.2.3.5 Aparatos e instrumentos.**

**A.2.3.5.1** Filtros de membrana estériles, de un poro de 0.2 µm.

**A.2.3.5.2** Incubadora que mantenga una temperatura de 37°C ±1.0°C.

**NOTA:** La calidad de los filtros de membrana puede variar de acuerdo a la marca y aun de lote a lote. Por lo tanto, es aconsejable revisar la calidad regularmente de acuerdo a la ISO 7704.

**A.2.3.6 Preparación de las muestras.**

**A.2.3.6.1** Descontaminar el exterior de los contenedores de la muestra con etanol o isopropanol al 70%.

**A.2.3.6.2** Realizar diluciones decimales cuando se estime que la carga de esporas de anaerobios sulfito reductores (clostridia), es alta.

**A.2.3.7 Recomendaciones generales previas al análisis de la muestra.**

**A.2.3.7.1** Las muestras en frascos con un espacio vacío (de al menos 2.5 cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida 25 veces. Las muestras en frascos que tengan de 2/3 a 3/4 de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm completados en un tiempo de 7 s, para asegurar una unidad analítica representativa.

**A.2.3.7.2** Como alternativa al uso de campanas de fermentación (Durham) utilizar púrpura de bromocresol a una concentración de 0.01 g/L al medio de cultivo, la producción ácida se observará por el vire de este indicador.

**A.2.3.7.3** Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 mL de caldo preparado, cuando se agreguen 10 mL de muestra.

**A.2.3.8 Procedimiento analítico.**

**A.2.3.8.1 Técnica de selección de esporas.**

**A.2.3.8.1.1** Antes de iniciar la prueba, calentar la muestra en baño de agua a 75°C ±5.0°C por 15 min a partir de que se alcance la temperatura. Utilizar periódicamente un frasco similar que contenga el mismo volumen de agua que el de la muestra como control para confirmar que durante el tiempo de calentamiento requerido, la temperatura se mantenga monitoreando con un termómetro.

**A.2.3.8.2 Inoculación e incubación**.

**A.2.3.8.2.1** Adicionar 50 mL de la muestra (véase **A.2.3.8.1**) a un frasco con tapa de rosca de 100 mL que contenga 50 mL de medio completo de doble concentración (véase **A.2.3.4.9.2**).

**A.2.3.8.2.2** Adicionar 10 mL de la muestra (véase **A.2.3.8.1**) a una serie de 5 frascos con tapa de rosca de 25 mL que contenga 10 mL de medio completo de doble concentración (véase **A.2.3.4.9.2**).

**A.2.3.8.2.3** Si es necesario, adicionar 1 mL de una dilución 1:10 de la muestra (véase A.2.2.4.13.1) a una serie de 5 frascos con tapa de rosca de 25 mL que contengan 25 mL de medio de concentración simple (véase **A.2.3.4.9.3.1**).

**A.2.3.9 Presencia-Ausencia.**

**A.2.3.9.1** Para realizar un examen cualitativo de 100 mL de agua potable o de agua envasada sin hacer una cuenta por NMP, utilizar un frasco de 200 mL con una mezcla de 100 mL de medio completo de doble concentración (véase **A.2.3.4.9.2**) y adicionar 100 mL de la muestra (véase **A.2.3.6**).

**A.2.3.9.2** Asegurarse que el volumen de aire remanente en todos los frascos, con medio completo de concentración simple (véase **A.2.3.4.9.3.1**) para alcanzar el nivel del volumen del líquido con el cuello del frasco. Sellar los frascos asegurando no tener burbuja o incubar en condiciones de anaerobiosis.

**A.2.3.9.3** Incubar los frascos inoculados a 37°C ±1°C por 44 ±4 horas.

**A.2.3.9.4** Volúmenes grandes de cultivos en frascos de vidrio sellados herméticamente pueden explotar por la producción de gas. La adición de un alambre de fierro, calentado a rojo vivo y puesto en el medio antes de la inoculación, creará una atmósfera de la anaerobiosis.

**A.2.3.10 Interpretación de resultados.**

**A.2.3.10.1** Se considera como una prueba positiva los frascos en donde se observe obscurecimiento como resultado de la reducción del sulfito y la precipitación de sulfuro ferroso (II).

**A.2.3.11 Criterios de validez de la prueba.**

**A.2.3.11.1** Esta prueba tiene validez cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos cuando la muestra contenga esporas de C*lostridium*sulfito reductores o cuando se trate de un cultivo control inoculado con 100 UFC.

**A.2.3.12 Índices de reproducibilidad y repetibilidad.**

**A.2.3.12.1** Basado en una distribución normal, el 95% de las medias de cada grupo de resultados analíticos deben estar entre +2 y -2 desviaciones estándar con respecto a la media de las medias.

**A.2.3.12.2** La precisión del analista deberá estar dentro de un 5%.

**A.2.3.13 Informe de prueba.**

**A.2.3.13.1** Expresar los resultados como NMP. En el informe de prueba debe establecerse el método empleado y expresar los resultados como NMP de esporas de *Clostridium*sulfito reductores por 100 mL de muestra. Además debe mencionarse cualquier modificación no especificada en documento o mencionarse como opcional, junto con los detalles de cualquier incidente que pudiera influir en los resultados.

**A.2.3.13.2** El informe de prueba debe incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

**Tabla A.2.3.13.3 NMP de esporas de *Clostridium* sulfito reductores/100 mL.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Número de tubos positivos** | **NMP (por 100 mL)** | **Límites de confianza al 95%** |
| **3 de 10 mL** | **3 de 1 mL** | **3 de 0.1mL** | **Inferior** | **Superior** |
| 0 | 0 | 1 | 3 | >1 | 9 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | >1 | 13 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | >1 | 20 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 1 | 21 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 1 | 23 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3 | 36 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 38 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 1 | 36 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 37 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 44 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 7 | 88 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4 | 47 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 10 | 149 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4 | 120 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 7 | 130 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 15 | 379 |
| 3 | 1 | 0 | 48 | 7 | 210 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 14 | 230 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30 | 380 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 15 | 380 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30 | 440 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 35 | 470 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 36 | 1300 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 71 | 2400 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 150 | 4800 |

**Tabla A.2.3.13.4 Valores de NMP por 100 mL de muestra e intervalos de confianza del 95%, cuando se utiliza 3 tubos con 10 mL, 3 tubos con 1 mL y 3 tubos con 0.1 mL de muestra.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Número de tubos positivos** | **NMP (por 100 mL)** | **Límites de confianza al 95%** |
| **3 de 50 mL** | **5 de 10 mL** | **Inferior** | **Superior** |
| 0 | 0 | >1 |   |   |
| 0 | 1 | 1 | >1 | 4 |
| 0 | 2 | 2 | >1 | 6 |
| 0 | 3 | 4 | >1 | 11 |
| 0 | 4 | 5 | 1 | 13 |
| 0 | 5 | 7 | 2 | 17 |
| 1 | 0 | 2 | >1 | 6 |
| 1 | 1 | 3 | >1 | 9 |
| 1 | 2 | 6 | 1 | 15 |
| 1 | 3 | 9 | 2 | 21 |
| 1 | 4 | 16 | 4 | 40 |
| 1 | 5 | >18 |   |   |

**Tabla A.2.3.13.5 Valores de NMP por 100 mL de muestra e intervalos de confianza del 95%, cuando se utiliza una porción de 50 mL y 5 porciones de 10 mL de muestra**.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Número de tubos positivos** | **NMP (por 100 mL)** | **Límites de confianza al 95%** |
| **1 de 50 mL** | **5 de 10 mL** | **Inferior** | **Superior** |
| 0 | 0 | >1 |   |   |
| 0 | 1 | 1 | >1 | 4 |
| 0 | 2 | 2 | >1 | 6 |
| 0 | 3 | 4 | >1 | 11 |
| 0 | 4 | 5 | 1 | 13 |
| 0 | 5 | 7 | 2 | 17 |
| 1 | 0 | 2 | >1 | 6 |
| 1 | 1 | 3 | >1 | 9 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 6 | 1 | 15 |
| 1 | 3 | 9 | 2 | 21 |
| 1 | 4 | 16 | 4 | 40 |
| 1 | 5 | >18 |   |   |

**A.2.3.14 Método de filtración por membrana.**

**A.2.3.14.1 Fundamento.**

La detección de esporas de *Clostridium* sulfito reductores en una muestra de agua requiere de las siguientes etapas:

Selección de esporas. La selección de esporas en una muestra se realiza por aplicación de calor en un periodo de tiempo suficiente para destruir formas bacterianas vegetativas.

**A.2.3.14.2 Filtración por membrana y cultivo.**

El recuento de esporas de anaerobios sulfito-reductoras se basa en la filtración de un volumen determinado de una muestra de agua, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro 0.2 µm. La membrana es colocada en el medio selectivo agar sulfito de fierro seguido de una incubación a 37°C ±1°C, por 20 horas ±4 horas y 44 horas ±4 horas, y contar todas las colonias negras.

**A.2.3.14.3 Materiales.**

**A.2.3.14.3.1** Matraces de vidrio (Matraces Erlenmeyer, matraces de bola o matraces de forma cónica), con capacidad de 2 L.

**A.2.3.14.3.2** Tubos de ensayo de 160 mm x 16 mm.

**A.2.3.14.3.3** Pipetas graduadas, de capacidad de 10 mL, graduadas con divisiones de 0.1 mL.

**A.2.3.14.3.4** Cajas Petri.

**A.2.3.14.3.5** Filtros de membrana estériles, de un poro de 0.2 µm.

**NOTA:**La calidad de los filtros de membrana puede variar de acuerdo a la marca y aun de lote a lote. Por lo tanto, es aconsejable revisar la calidad regularmente de acuerdo a la ISO 7704.

**A.2.3.14.4 Medios de cultivo y reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico.

**A.2.3.14.4.1 Agar sulfito de fierro.**

**A.2.3.14.4.1.1 Medio base (agar nutritivo).**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| Extracto de carne. | 3.0 g |
| Peptona. | 10.0 g |
| Cloruro de sodio (NaCl). | 5.0 g |
| Agar. | 15.0 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.14.4.1.1.1 Preparación.**

**A.2.3.14.4.1.1.2** Disolver a vapor fluyente para disolver los ingredientes, aforar a 1 L de agua y ajustar el pH a 7.6 ±0.1 con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N o una disolución de HCl 0.1 N según se requiera. Esterilizar a 121 ±1°C en autoclave por 20 minutos.

**A.2.3.14.4.1.1.3** Guardar en el refrigerador después de que solidifique.

**A.2.3.14.4.2 Solución de sulfito de sodio (Na2S03).**

**A.2.3.14.4.2.1** Disolver 10 g de sulfito de sodio en 100 mL de agua.

**A.2.3.14.4.2.2** Se recomienda preparar la solución cada dos semanas.

**A.2.3.14.4.3 Solución de sulfato de Fierro (II) (FeSO4).**

**A.2.3.14.4.3.1** Disolver 8 g de sulfato de Fierro (II) cristalizado en 100 mL de agua.

**A.2.3.14.4.4 Medio completo.**

**A.2.3.14.4.4.1** Inmediatamente antes de utilizarse, mezclar el medio base (véase A.2.3.14.4.1.1**)**por cada 18 mililitros adicionar 1 mL de la solución de sulfito de sodio (véase A.2.3.14.4.2) y cinco gotas de la solución de sulfato de Fierro (II) (véase A.2.3.14.4.3.1).

**A.2.3.14.4.4.2** Adicionar 1 mililitro de la solución de sulfito de sodio y cinco gotas de la solución de sulfato de Fierro (II) a los tubos de agar antes de iniciar el análisis.

**A.2.3.14.4.5 Agar sulfito-triptosa (medio alternativo).**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingrediente.** | **Cantidad.** |
| Triptosa. | 15.0 g |
| Soytona. | 5.0 g |
| Extracto de levadura. | 5.0 g |
| Metabisulfito de sodio. | 1.0 g |
| Citrato férrico (III) amoniacal. | 1.0 g |
| Agua. | 1 L |

**A.2.3.14.4.5.1 Preparación.**

**A.2.3.14.4.5.1.1** Calentar a vapor fluyente para disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7.6 ±0.1 con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N o una disolución de HCl 0.1 N según se requiera.

**A.2.3.14.4.5.1.2** Distribuir en volúmenes de 18 mL en tubos de ensaye. Esterilizar el medio por 15 min a 121 ±1°C.

**A.2.3.14.4.5.1.3** Guardar en el refrigerador a 4°C a 5°C.

**A.2.3.14.4.5.1.4** Descartar el medio que no se ha utilizado después de 2 semanas de su preparación.

**A.2.3.14.5 Aparatos e instrumentos.**

**A.2.3.14.5.1** Jarras de anaerobiosis.

**A.2.3.14.5.2** Olla de presión para generar vapor fluyente.

**A.2.3.14.5.3** Baño de agua.

**A.2.3.14.5.4** Equipo para filtración de membrana.

**A.2.3.14.5.5** Incubadora que mantenga una temperatura de 37°C ±1.0°C.

**A.2.3.14.6 Procedimiento.**

**A.2.3.14.6.1** Para la selección de esporas: Antes de iniciar la prueba, calentar la muestra en baño de agua a 75°C ±5.0°C por 15 min a partir de que se alcance la temperatura.

**A.2.3.14.6.2** Utilizar periódicamente un frasco similar que contenga el mismo volumen de agua que el de la muestra como control para confirmar que durante el tiempo de calentamiento requerido, la temperatura se mantenga monitoreando con un termómetro.

**A.2.3.14.7 Inoculación e incubación.**

**A.2.3.14.7.1** Filtración e incubación.

**A.2.3.14.7.2** Conectar el equipo de filtración a la bomba de vacío.

**A.2.3.14.7.3** Utilizando pinzas estériles, colocar la membrana con la cuadrícula hacia arriba sobre el portafiltro.

**A.2.3.14.7.4** Colocar cuidadosamente el embudo sobre el receptáculo y asegurarlo en su lugar.

**A.2.3.14.7.5** Abrir la llave de paso y filtrar a través de la membrana, 100 mL de muestra aplicando suficiente vacío (aproximadamente 70 kPa). Cerrar la llave de paso tan pronto como la muestra haya sido filtrada. Es aconsejable enjuagar el embudo mediante la filtración de 1 a 3 porciones de 10 a 30 mL de diluyente estéril, mientras la membrana permanezca en su lugar. Inmediatamente después cerrar la llave de paso.

**A.2.3.14.7.6** Retirar el embudo para dejar expuesta la membrana de filtración. Colocar la membrana con pinzas estériles en el agar triptosa sulfito o agar sulfito de fierro. Evitar la formación de burbujas entre la membrana y la superficie del agar.

**A.2.3.14.7.7** Incubar las placas invertidas a 37°C ±1°C durante 20 h ±4 h en una jarra de anaerobiosis.

**A.2.3.14.8 Recuento.**

**A.2.3.14.8.1** Las colonias provenientes de esporas de *Clostridium* sulfito reductores son de color negro.

**A.2.3.14.8.2** Con ayuda de un cuenta colonias, seleccionar cajas que contengan entre 20 y 80 colonias típicas y contar el número de UFC.

**A.2.3.14.8.3** Filtrar 100 mL de agua con baja contaminación de esporas de *Clostridium* sulfito reductores.

**A.2.3.14.8.4** Para agua altamente contaminada, usar volúmenes similares, pero filtrar en porciones de 10 mL que deben ser mezclada con 10 a 100 mL de agua estéril o diluyente.

**A.2.3.14.8.5** Ajustar las diluciones de tal forma que las colonias negras resultantes estén bien separadas y puedan fácilmente contarse.

**A.2.3.14.9 Expresión de los resultados.**

**A.2.3.14.9.1 Cálculos.**

**A.2.3.14.9.1.1** Aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de esporas de *Clostridium sulfito reductores*:



En donde:

Cs, es el número estimado de UFC en un volumen de referencia de la muestra (100mL)

Z, es la suma de colonias contadas en las membranas provenientes de diferentes diluciones d1, d2,....di o de esos volúmenes separados de muestras filtradas.

Vs, es el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración en la muestra de esporas de *Clostridium*sulfito reductores.

Vtot, es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

O



En donde:

n1, n2,... ni, es el No. de membranas filtradas por dilución d1, d2, ....di

V1, V2, ....Vi, es el volumen analizado en la dilución d1, d2, ....di

d1, d2, ....di es la dilución utilizada por cada porción de volumen analizado V1, V2, ....Vi, ( d=1 para la muestra sin diluir, d=0.1 para la dilución 1:10, etc.).

**Ejemplo.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Volumen probado.** | **Cuentas.** |
| 100 mL | 82 colonias. |
| 10 mL | 11 colonias. |

**Sustitución**



Y si Vs es 100 mL



**A.2.3.14.10 Interpretación.**

**A.2.3.14.10.1** Contar todas las colonias negras después de incubar las placas por 20 ±4 h y 44 ±4 h.

**A.2.3.14.11 Informe de prueba.**

**A.2.3.14.11.1** Informar como:

**A.2.3.14.11.2** UFC de esporas de *Clostridium* sulfito reductores/100 mL.

**A.2.3.14.11.3** Si se observan menos de 20 colonias informar la cantidad contada como valor estimado.

**A.2.3.14.11.4** Placas sin colonias, informar como UFC de esporas de *Clostridium* sulfito reductores/100 mL e informar como valor estimado.

Donde: Vtot es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución (véase punto A.2.2.1.5.4.1.1)

**A.2.3.14.11.5** También se puede informar como "Cero" u "organismos no detectables" indicando el volumen de muestra analizada.

**A.2.3.14.11.6** En el informe de prueba debe establecerse el método empleado y expresar los resultados como UFC incubadas a 44 ±4 h. Si esto no fuera posible, el recuento de las 20 ±4 h deberá reportarse sólo como una aproximación UFC de esporas de *Clostridium* sulfito reductores /100 mL incubadas durante 20 ± 4 h.

**A.2.3.14.11.7** Además debe mencionarse cualquier modificación no especificada norma o mencionarse como opcional, junto con los detalles de cualquier incidente que pudiera influir en los resultados.

**A.2.3.14.11.8** El informe de prueba debe incluir toda la información necesaria para la identificación plena de la muestra.

**A.3.1 a A.3.2…**

**A.3.3 Métodos de prueba para la determinación, antimonio, arsénico, bario, cadmio, cobre, cromo, manganeso, mercurio, níquel, plomo y selenio por espectrometría de absorción atómica.**

**A.3.3.1 Generalidades.**

**A.3.3.1.1 Fundamento**

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico.

La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el % de absorción.

La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

**A.3.3.1.2 Interferencias.**

**A.3.3.1.2.1 Principales tipos de interferencias y correcciones en la determinación de metales y metaloides.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Tipo de interferencia.** | **Corrección.** |
| La ionización química de algunos elementos como el sodio, el potasio, el magnesio y el calcio causa error en la lectura originando mayor o menor absorbancia. | La adición de un elemento que sea más ionizable que el analito que se va a determinar por ejemplo el uso del óxido o sal de lantano, el cloruro de potasio u otro equivalente. |
| Cuando en la flama hay presencia de átomos unidos en combinación molecular, se presenta una disminución en la absorbancia. Esto puede ocurrir cuando la flama no alcanza temperaturas altas, las cuales son necesarias para disociar las moléculas o cuando el átomo disociado es inmediatamente oxidado a un compuesto que no se disocia más a esa temperatura de la flama. | Estas interferencias pueden ser reducidas o eliminadas utilizando una llama más oxidante: óxido nitroso-acetileno, en lugar de aire-acetileno. |
| La absorción de fondo se produce debido a que no todos los materiales de la matriz necesariamente se atomizan en un 100%. Las formas moleculares no disociadas de los materiales de la matriz pueden tener espectros de absorción muy ensanchados; las partículas sólidas en la llama pueden dispersar luz en una amplia región de longitudes de onda. | Con una fuente continua se puede realizar automáticamente la corrección de fondo empleando una lámpara de arco de deuterio en la zona de ultravioleta o una lámpara de yoduro de tungsteno para las longitudes de onda visibles.La corrección de Zeeman se basa en el principio de un campo magnético en el que se divide la línea espectral en dos haces de luz linealmente polarizada, paralela y perpendicular al campo magnético. Se puede comparar la absorción en presencia y ausencia de un campo magnético, siendo la diferencia la absorción atómica de interés. |
| En horno de grafito altas concentraciones de Cl– pueden causar bajos resultados debido a que la volatilidad de muchos elementos se incrementa y el analito se pierde durante el proceso de pirolisis. | Los efectos de matriz pueden disminuirse parcialmente o completamente con la optimización del programa de temperatura.El uso de tubos recubiertos pirolíticamente y plataformas.El uso de modificadores químicos como el nitrato de magnesio o el fosfato de amonio.La técnica de adición de estándar.Con el uso del corrector de fondo. |

**A.3.3.1.3 Aparatos e instrumentos.**

**A.3.3.1.3.1** Los límites de detección, sensibilidad e intervalos de trabajo de los metales pueden variar con la matriz y los modelos del espectrómetro de absorción atómica.

**A.3.3.1.3.2** Espectrómetro de absorción atómica equipado con:

**A.3.3.1.3.2.1** Flama.

**A.3.3.1.3.2.2** Horno de grafito.

**A.3.3.1.3.2.3** Generador de hidruros o vapor frío, y/o FIAS.

**A.3.3.1.3.2.4** Sistema de corrección de fondo.

**A.3.3.1.3.2.5** Lámparas de cátodo hueco (LCH) y/o Lámparas multi-elemento y/o Lámpara de descarga sin electrodos (LDE) de cada uno de los elementos a analizar.

**A.3.3.1.3.2.6** Sistema de extracción para eliminar el humo y los vapores que son peligrosos para la salud del analista.

**A.3.3.1.3.2.7** Fuente de radiofrecuencia en caso de usar LDE.

**A.3.3.1.3.2.8** Celda de cuarzo para mercurio y celda de cuarzo o de otro material de acuerdo a lo especificado por el fabricante para otros elementos como arsénico y antimonio.

**A.3.3.1.3.2.9** Soporte de la celda.

**A.3.3.1.3.2.10** Tubo de aireación.

**A.3.3.1.3.2.11** Puede contarse con un sistema automatizado para la generación de hidruros.

**A.3.3.1.3.3** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

**A.3.3.1.3.4** Horno de microondas o sistema de reflujo o sistema de digestión abierto.

**A.3.3.1.3.5** Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

**A.3.3.1.3.6** Pipetas de pistón de diferentes capacidades.

**A.3.3.1.4 Material**

**A.3.3.1.4.1** Viales.

**A.3.3.1.4.2** Tubos de grafito, cubiertos pirolíticamente (con plataforma L'vov, para modelos de equipo que tengan este sistema).

**A.3.3.1.4.3** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

**A.3.3.1.4.4** Puntas de plástico para pipetas de pistón

**A.3.3.1.4.5** Filtros con tamaño de poro de 0.45 µm.

**A.3.3.1.4.6** Recipientes de polipropileno o PTFE.

**A.3.3.1.4.7** Embudos de filtración de diferentes capacidades: de polietileno, polipropileno, PTFE ó vidrio.

**A.3.3.1.4.8** Papel filtro de filtración media # 1, 2, 111, 43, 41,40 etc.

**A.3.3.1.4.9** Material común de laboratorio.

**A.3.3.1.4.10** Lavado de material, todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones.

**A.3.3.1.4.10.1** El jabón que se use debe ser neutro de preferencia líquido.

**A.3.3.1.4.10.2** Enjuagar perfectamente con agua corriente.

**A.3.3.1.4.10.3** Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia de plástico) que contenga una solución de ácido nítrico al 10%.

**A.3.3.1.4.10.4** Dejarlo tapado y reposando por un lapso mínimo de 2 h.

**A.3.3.1.4.10.5**  Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues de agua de red y el último enjuague con agua tipo I.

**A.3.3.1.4.10.6** Dejar escurrir y secar.

**A.3.3.1.4.10.7** Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

**A.3.3.1.4.10.8** Para la determinación de niveles traza de algunos elementos como cadmio, plomo, arsénico, mercurio, aluminio, zinc, etc., es necesario utilizar material exclusivo y seguir un estricto procedimiento de limpieza como se describe a continuación:

**A.3.3.1.4.10.8.1** Sumergir en una disolución de HNO3 al 50% v/v mínimo 2 h. Enjuagar con agua tipo I varias veces, los frascos, reservorios del auto-muestreador del horno de grafito, los viales y todo el material involucrado.

**A.3.3.1.4.10.8.2** Secar en un ambiente libre de polvo.

**A.3.3.1.4.10.8.3** Tapar con papel parafinado o en bolsas cerradas de plástico.

**NOTA:** Se observa que el HCl, es más efectivo para el lavado de material de polietileno o polipropileno, mientras que el HNO3 es preferible usarlo con el material de PTFE o de vidrio.

**A.3.3.1.5** **Reactivos y disoluciones.**

**A.3.3.1.5.1** Aire comprimido libre de agua y libre de partículas, cuyo contenido de oxígeno sea < 20%.

**A.3.3.1.5.2** Acetileno grado absorción atómica en acetona.

**A.3.3.1.5.3** Óxido nitroso de alta pureza grado absorción atómica, el regulador debe ser no congelable o debe colocarse un serpentín de calentamiento alrededor del regulador de flujo.

**A.3.3.1.5.4** Argón o nitrógeno de alta pureza grado absorción atómica.

**A.3.3.1.5.5** Agua tipo I.

**A.3.3.1.5.6** Disoluciones de estándares de referencia trazables a patrones nacionales o internacionales de cada uno de los metales.

**NOTA:** Las disoluciones pueden prepararse a partir de las sales, y deben tener una pureza >99.95%. Todas las sales deben ser secadas por 1 h a 105°C, a menos que se especifique otra cosa.

**A.3.3.1.5.7** Disolución de Nitrato de Magnesio hexahidratado [Mg(NO3)2•6H2O)] de alta pureza (con contenido de metales a niveles traza).

**A.3.3.1.5.8** Ácido clorhídrico concentrado 36.5-38% de alta pureza (con contenido de metales a niveles traza).

**A.3.3.1.5.9** Ácido clorhídrico 6 N. En un matraz de 100 mL, conteniendo de 20 a 30 mL de agua, medir y agregar 56 mL de HCl concentrado y llevar al volumen con agua.

**A.3.3.1.5.10** Ácido clorhídrico 4N. En un matraz de 100 mL, conteniendo de 40 a 50 mL de agua, medir y agregar 33 mL de HCl concentrado y llevar al volumen con agua.

**A.3.3.1.5.11** Disolución de ácido clorhídrico al 50%. En un matraz de 1 L, conteniendo de 300 a 400 mL de agua, agregar 500 mL de ácido clorhídrico concentrado. Llevar al volumen con agua.

**A.3.3.1.5.12** Ácido sulfúrico (H2SO4) (densidad específica 1.84).

**A.3.3.1.5.13** Ácido nítrico.

**A.3.3.1.5.13.1** De alta pureza (HNO3) al 65% v/v (con contenido de metales en niveles traza).

**A.3.3.1.5.13.2** Ultra alta pureza (HNO3) al 65% v/v (con contenido de metales en niveles traza).

**A.3.3.1.5.14** Ácido nítrico al 50% v/v. En un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 25 mL de agua agregar 50 mL de HNO3 y llevar al volumen con agua.

**A.3.3.1.5.15** Disolución de ácido nítrico/ácido sulfúrico. En un matraz de 1 L, conteniendo de 300 a 500 mL de agua, agregar 58 mL de ácido nítrico concentrado de ultra alta pureza (niveles menores o iguales a 0.1 µg/L de mercurio) y 67 mL de ácido sulfúrico concentrado. Llevar al volumen con agua.

**A.3.3.1.5.16** Ácido nítrico (HNO3) grado reactivo (G.R)

**A.3.3.1.5.16.1** Disolución de Ácido nítrico G.R. al 10% (Para la descontaminación del material). Por cada litro a preparar, agregar 100 mL de ácido de la siguiente manera: en un recipiente que contenga aproximadamente 2/3 partes de agua agregar la cantidad de ácido requerida y llevar al volumen total con agua.

**A.3.3.1.5.17** Yoduro de Potasio de alta pureza (con contenido de metales en niveles traza).

**A.3.3.1.5.18** Disolución de yoduro de potasio al 10% p/v. Disolver 10 g de KI en agua y 10 g de ácido ascórbico, llevar a 100 mL con agua (esta disolución debe prepararse en el momento de usarse).

**A.3.3.1.5.19** L-Ácido ascórbico (C6H8O6) PM. 176.12 g/mol Pureza 99.9998%.

**A.3.3.1.5.20** Dicromato de potasio (K2Cr2O7).

**A.3.3.1.5.21** Disolución de dicromato de potasio: Pesar 0.5 g de dicromato de potasio, pasar a un matraz volumétrico de 1 L que contenga agua, agregar 50 mL de ácido nítrico concentrado y 5.0 mL de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a volumen con agua.

**A.3.3.1.5.22** Hidróxido de sodio (NaOH) en lentejas 40.00 g/mol, .pureza 99-100%.

**A.3.3.1.5.23** Disolución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y llevar al volumen a 100 mL con agua.

**A.3.3.1.5.24** Borohidruro de sodio (NaBH4)

**A.3.3.1.5.25** Disolución reductora de borohidruro de sodio al 4% p/v en disolución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 mL de una disolución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.

**A.3.3.1.5.26** Disolución de paladio (Pd) con niveles traza de metales (de alta pureza).

**A.3.3.1.5.27** Fosfato de amonio monobásico (NH4H2PO4) con niveles traza de metales (de alta pureza).

**A.3.3.1.5.28** Sulfato ácido de hidroxilamina [(NH2OH)2•H2SO4] o Clorhidrato de hidroxilamina (NH2OH•HCl).

**A.3.3.1.5.29** Cloruro estañoso (SnCl2) o sulfato estañoso (SnSO4).

**A.3.3.1.5.30** Disolución reductora de estaño. Mezclar 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 mL de agua. Enfriar a temperatura ambiente y 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estañoso en disolución; disolver completamente y llevar a 500 mL con agua.

**A.3.3.1.5.31** Cloruro de potasio 74.55 g/mol pureza mayor o igual a 99.5 % contenido de Bario menor 0.001%

**A.3.3.1.5.32** Disolución de cloruro de potasio al 1% p/v: pesar 10g de cloruro de potasio en un matraz de 1000 mL conteniendo aproximadamente 100 mL de agua tipo I disolver completamente y llevar al aforo con agua tipo I

**A.3.3.1.5.33.** Disolución de ácido clorhídrico 1%Medir 26 mL de ácido clorhídrico de alta pureza 36.5-38% en un matraz aforado de 1000 mL conteniendo aproximadamente 250 mL de agua tipo I y llevar al aforo con agua tipo I.

**A.3.3.1.5.34** Permanganato de potasio KMnO4 G.R. 158.03 g/mol pureza mayor o igual a 99%

NOTA: Para los apartados A.1.1.5.18, A.1.1.5.21, A.1.1.5.23, A.1.1.5.25, y A.1.1.5.30, las disoluciones, concentraciones y porcentajes pueden variar según lo recomendado por el fabricante del equipo a utilizar.

**A.3.3.1.6 Procedimiento.**

**A.3.3.1.6.1** **Preparación de las muestras.**

**A.3.3.1.6.1.1** Las muestras se pueden analizar directamente por espectrometría de absorción atómica sin realizar la digestión si son inodoras, incoloras y transparentes.

**A.3.3.1.6.1.2** Previo al análisis adicionar a 100 mL de muestra, 1 mL de ácido nítrico de ultra alta pureza. En caso que se observe un precipitado, éste volumen de muestra se digiere adicionando 1 mL más de ácido nítrico de ultra alta pureza concentrado, calentar a 85 °C hasta reducir el volumen a 20 mL cuidando que no hierva.

En caso de que el precipitado sea considerable se sugiere la adición de 10 mL de ácido nítrico de ultra alta pureza para realizar la digestión de la muestra.

**A.3.3.1.6.1.3** Calentar a reflujo por 20 min y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL.

**A.3.3.1.6.1.4** Centrifugar a 1600 rpm por 30 min o dejar reposar toda la noche y analizar el sobrenadante.

**A.3.3.1.6.1.5** Se puede utilizar el horno de microondas para digerir las muestras si se forma un precipitado al adicionar el ácido nítrico. Proceder de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante.

**A.3.3.1.6.1.6** Preparar un blanco de reactivos fortificado por cada lote, y una muestra fortificada por cada 10 muestras o por grupo si son menos.

**A.3.3.2 Método para la determinación de Cobre, Manganeso y Bario por la técnica de flama.**

**A.3.3.2.1** Preparación de disoluciones de Cobre.

**A.3.3.2.1.1** disolución estándar de cobre de 100 mg/L.

Medir 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L y depositar en un matraz volumétrico de 100 mL, que contiene agua, posteriormente agregar 5 mL de HNO3 de alta pureza y llevar al volumen con agua. Esta disolución tiene una vigencia de 30 días.

**Nota:** Para la curva tomar en consideración la concentración de ácido en las muestras.

**A.3.3.2.1.2** A partir de la disolución anterior preparar un blanco y 5 niveles de concentración (véase tabla curva de calibración de cobre) preparar al momento de su uso.

**A.3.3.2.2** Preparación de la curva de calibración de cobre.

Se sugiere efectuar la curva de calibración con las siguientes concentraciones, o apegarse a las condiciones que le marque el fabricante de acuerdo al equipo que utilice y la sensibilidad de este.

**Nota:** Siempre y cuando la especificación del elemento a analizar se encuentre dentro del intervalo de trabajo de la curva.

**Tabla. Curva de calibración de Cobre.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentración (mg/L)** | **Volumen de disolución estándar de 100 mg/L** | **Volumen de HNO3 adicionado (mL)** | **Volumen de aforo con agua (mL)** |
| Blanco de calibración | 0 | 2 | 100 |
| 0.25 | 250 µL | 2 | 100 |
| 0.50 | 500 µL | 2 | 100 |
| 1.0 | 1 mL | 2 | 100 |
| 2.0 | 2 mL | 2 | 100 |
| 4.0 | 4 mL | 2 | 100 |

**A.3.3.2.3** Preparación de disoluciones de manganeso.

**A.3.3.2.3.1** Disolución estándar de manganeso de 100 mg/L.

 Medir 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L y depositar en un matraz volumétrico de 100 mL que contiene agua, posteriormente agregar 5 mL de HNO3 de alta pureza y llevar al volumen con agua. Esta solución tiene una vigencia de 30 días.

**Nota**. Para la curva tomar en consideración la concentración de ácido en las muestras.

**A.3.3.2.3.2** Apartir de la disolución anterior preparar un blanco y mínimo 5 niveles de concentración (véase tabla curva de calibración de manganeso.) preparar al momento de su uso.

**A.3.3.2.4** Preparación de la curva de calibración de manganeso.

Se sugiere efectuar la curva de calibración con las siguientes concentraciones, o apegarse a las condiciones que le marque el fabricante de acuerdo al equipo que utilice y la sensibilidad de este.

**Nota:** Siempre y cuando la especificación del elemento a analizar se encuentre dentro del intervalo lineal de la curva.

**Tabla. Curva de calibración de Manganeso.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentración (mg/L)** | **Volumen de disolución estándar de 100 mg/L** | **Volumen de HNO3 adicionado (mL)** | **Volumen de aforo con agua (mL)** |
| Blanco de calibración | 0 | 2 | 100 |
| 0.10 | 100 µL | 2 | 100 |
| 0.20 | 200 µL | 2 | 100 |
| 0.40 | 400 µL | 2 | 100 |
| 1.0 | 1 mL | 2 | 100 |
| 2.0 | 2 mL | 2 | 100 |

**A.3.3.2.5 Preparación de disoluciones de Bario.**

**A.3.3.2.5.1** Disolución estándar de bario de 100 mg/L.

**A.3.3.2.5.2** Disolver 0.1516 g de BaCl2 (secar a 250°C por 2 h), adicionar 10 mL de una mezcla de 5 mL agua + 5 mL de HCl, y llevar al volumen de 1000 mL con aguaI, 1 mL es aproximadamente equivalente a 100 µg de Ba.

**Nota.** Puede ser preparada también a partir de una disolución comercial estándar de 1000 mg/L, esta solución tiene una vigencia de 30 días.

A partir de esta disolución preparar una curva de calibración (Véase tabla de curva de calibración de bario) (agregar disolución de cloruro de potasio, lantano o cesio (10 mg/mL de K) a los estándares y a las muestras). Preparar al momento de su uso.

Se sugiere efectuar la curva de calibración con las siguientes concentraciones, o apegarse a las condiciones que le marque el fabricante de acuerdo al equipo que utilice y la sensibilidad de este**.**

**Nota:** Siempre y cuando la especificación del elemento a analizar se encuentre dentro del intervalo lineal de la curva.

**Tabla. Curva de calibración de Bario.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentración en**  | **Volumen de solución de 100**  **de Ba** | **Volumen de KCl, lantano ó Cesio al 1%(mL)** | **Volumen de aforo con HCl al 1% (mL)** |
| Blanco de calibración | 0 | 10 | 100 |
| 0.25 | 250 µL | 10 | 100 |
| 0.5 | 500 µL | 10 | 100 |
| 0.7 | 700 µL | 10 | 100 |
| 2.0 | 2 mL | 10 | 100 |
| 4.0 | 4 mL | 10 | 100 |

**A.3.3.2.6 Condiciones de operación para cobre, bario y manganeso.**

**A.3.3.2.6.1 Cobre:** Mezcla de Aire- Acetileno con quemador de 10 cm con nebulizador, longitud de onda 324.7 nm.

**A.3.3.2.6.2 Manganeso:** Mezcla de Aire- Acetileno con quemador de 10 cm con nebulizador, longitud de onda 279.5 nm.

**A.3.3.2.6.3 Bario**: Mezcla de Óxido nitroso-Acetileno con quemador de 5 cm con nebulizador, longitud de onda 553.6 nm.

**A.3.3.2.6.4.** Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, encender la lámpara y dejar calentar al menos 15 minutos las LCH y al menos 45 min las LDE. Usar una disolución estándar de concentración conocida de cobre para verificar el equipo, una vez que se ha ajustado con la disolución estándar de cobre. Leer por quintuplicado esta disolución.

**A.3.3.2.6.5** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva de cobre, bario o manganeso según sea el caso del metal que se va a determinar. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo de trabajo, graficando la absorbancia en función de la concentración. Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**A.3.3.2.6.6** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**A.3.3.2.6.7** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo lineal de la curva de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**A.3.3.2.7 Medidas de control de calidad.**

**A.3.3.2.7.1** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser > 0.995.

**A.3.3.2.7.2** Leer en el equipo el blanco de calibración y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del ± 10% del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a leer la curva de calibración y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**A.3.3.3 Método para la determinación de Arsénico, Cadmio, Cromo, Níquel y Plomo por horno de grafito.**

**A.3.3.3.1** **Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**A.3.3.3.1.1** Para la preparación de las disoluciones madre (más concentradas). Medir un volumen apropiado de disolución estándar (aprox. 1-10 mL) para el aforo inicial y hacer las diluciones necesarias para cada elemento en particular, utilizando material volumétrico verificado para su preparación. Para la preparación de las disoluciones más concentradas utilizar HNO3 de alta pureza de tal forma que la concentración final del ácido sea del 2 al 5% para poder preservar las disoluciones estándar por mayor tiempo, mantener estas, bien tapadas y en recipientes de PTFE de preferencia.

**A.3.3.3.1.2** Para la preparación de las disoluciones de trabajo y de la curva de calibración utilizar HNO3 de alta pureza y la concentración final del ácido debe estar entre 0.1 a 0.2%. Preparar éstas el mismo día del análisis. Preparar 5 niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo para cada elemento.

**A.3.3.3.1.3** Los intervalos de trabajo óptimos para cada uno de los elementos (véase tabla de intervalos de trabajo para cada uno de los elementos) para un volumen de muestra de 20 µL. Dicho intervalo depende de la sensibilidad del instrumento, del tipo de matriz y del uso de modificadores.

**Tabla. Intervalos de trabajo para cada uno de los elementos.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Elemento** | **Masa característica (m0)**pg | **Límite de detección** | **Intervalo de trabajo** |
| As | 15 | 1 | 5 a 100 |
| Cd | 0.7 | 0.1 | 0.4 a 4 |
| Cr | 3 | 0.5 | 5 a 100 |
| Ni | 13 | 1 | 7 a 70 |
| Pb | 15 | 1 | 5 a 100 |

**A.3.3.3.1.4** Preparar una disolución de una concentración conocida de cada uno de los analitos que se van analizar (As, Cd, Cr, Ni y Pb) para verificar el equipo para cada uno de los elementos que se van a analizar.

**A.3.3.3.2** **Condiciones de operación del horno de grafito.**

**A.3.3.3.2.1** Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, encender la lámpara y dejar calentar al menos 15 min las LCH y al menos 45 min las LDE.

**A.3.3.3.2.2** Siempre utilizar la corrección de fondo.

**A.3.3.3.2.3** El programa de temperatura del horno de grafito (secado, pirolisis, atomización y limpieza) depende del analito, de la matriz y de la marca del equipo utilizado. Optimizar utilizando como guía las recomendaciones del fabricante. En la Tabla de Parámetros de ajuste en el horno de grafito (véase Tabla). Se muestran los principales parámetros utilizados para ajustar el equipo.

**A.3.3.3.2.3.1** En el caso de la determinación del cromo usar tubos cubiertos piroliticamente (con plataforma L'vov, para modelos de equipo que tengan este sistema).

**Tabla. Parámetros de ajuste en el horno de grafito**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Elemento** | **Longitud de onda****(nm)** | **Ancho de rejilla (slit)****en nm** | **Temperatura****de pirolisis (°C)** | **Temperatura de atomización (°C)** |
| **Sin modificador** | **Con modificador** | **Sin modificador** | **Con modificador** |
| As | 193.7 | 0.7 | 300 | 1400/1300 | 1900 | 2200/2500 |
| Cd | 228.8 | 0.7 | 300 | 900 | 1250 | 1100/1800 |
| Cr | 357.9 | 0.7 | 1050 | 1650 | 2300 | 2600 |
| Ni | 232.0 | 0.2 | 1100 | 1400 | 2400 | 2400 |
| Pb | 283.3 | 0.7 | 600 | 1200/600 | 1500 | 2000/1900 |

**A.3.3.3.2.4** Utilizar modificadores de matriz para eliminar los efectos de matriz ya que su uso permite elevar la temperatura de pirolisis y poder eliminar las interferencias sin que se pierda el analito que se va a medir. Si se utilizan modificadores de matriz en las muestras, adicionar también al blanco de la curva, a la curva de calibración, a las disoluciones estándar de verificación, a las muestras fortificadas y a las disoluciones estándar de control de calidad (MCC o MCI). (Véase Tabla Principales modificadores de matriz utilizados en el análisis por horno de grafito). En donde se muestran los modificadores más utilizados en el análisis por horno de grafito, dicha cantidad está calculada para volumen de muestra de 10 µL.

**Tabla. Principales modificadores de matriz utilizados en el análisis por horno de grafito.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Elemento** | **Modificador químico** | **Cantidad (µg)** |
| As | Pd + Mg(NO3)2 | 15 + 10 |
| Cd | Pd + Mg(NO3)2 oNH4H2PO4 + Mg(NO3)2 | 15 + 10200 + 10 |
| Cr | Mg(NO3)2 | 50 |
| Ni | Mg(NO3)2 | 50 |
| Pb | Pd + Mg(NO3)2o NH4H2PO4 + Mg(NO3)2 | 15 + 10200 + 10 |
| Los modificadores y las cantidades pueden variar, se pueden utilizar los recomendados por el fabricante. |

**A.3.3.3.2.5** Si el equipo cuenta con automuestreador, colocar los puntos de la curva, el blanco de reactivos, las muestras y los modificadores de matriz en los viales, los cuales han sido previamente enjuagados con ácido nítrico al 3% y posteriormente con la disolución a analizar.

**A.3.3.3.3** **Lectura en el equipo.**

**A.3.3.3.3.1** Leer por triplicado el blanco de calibración para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la disolución de verificación también por triplicado.

**A.3.3.3.3.2** Leer por duplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo de trabajo, graficando la absorbancia (área o altura de pico) en función de la concentración. La absorbancia integrada como área de pico es más recomendable.

**A.3.3.3.3.3** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**A.3.3.3.3.4** Leer cada una de las muestras por duplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**A.3.3.3.3.5** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo de trabajo de la curva de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**A.3.3.3.4** **Medidas de control de calidad.**

**A.3.3.3.4.1** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser > 0.995

**A.3.3.3.4.2** Leer en el equipo el blanco de calibración y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del ± 15% del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a leer la curva de calibración y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**A.3.3.4 Método de prueba para la determinación de mercurio por la técnica de vapor frío.**

**A.3.3.4.1 Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**A.3.3.4.1.1** Disolución estándar de Hg de10 mg/L. Medir 1 mL de la solución estándar de Hg de 1000 mg/L, adicionar 1mL de HNO3 concentrado y llevar al aforo con agua en un matraz de 100 mL.

**A.3.3.4.1.2 Dis**olución estándar de Hg de 0.1 mg/L. Diluir 1 mL de la solución estándar de 10 mg/L de Hg, adicionar 1 mL de HNO3 concentrado y llevar al aforo con agua en un matraz de 100 mL.

**A.3.3.4.1.3** A partir de la disolución de Hg de 0.1 mg/L preparar la curva de calibración de acuerdo a la siguiente Tabla:

**Tabla. Curva de calibración de mercurio.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Concentración**  | **Volumen de solución estándar de Hg de 0.1**  | **Volumen de HCl concentrado (mL)** | **Volumen de solución de dicromato de potasio** (A.3.3.1.5.21)**(mL)** | **Volumen de aforo con agua tipo I****(mL).** |
| Blanco de calibración | 0 | 10 | 10 | 100 |
| 0.5 | 500 µL | 10 | 10 | 100 |
| 0.75 | 750 µL | 10 | 10 | 100 |
| 1.0 | 1.0 mL | 10 | 10 | 100 |
| 2.0 | 2 mL | 10 | 10 | 100 |
| 5.0 | 5 mL | 10 | 10 | 100 |
| 10.0 | 10 mL | 10 | 10 | 100 |

**NOTA:** En lugar de la disolución de dicromato de potasio se puede utilizar otro agente oxidante como el permanganato de potasio o proceder de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**A.3.3.4.1.4.** Adicionar a las muestras, a las muestras fortificadas y a las disoluciones estándar de control de calidad (MCC o MCI) el mismo volumen de disolución de dicromato de potasio o el agente oxidante seleccionado.

**A.3.3.4.2 Condiciones de operación del instrumento.**

**A.3.3.4.2.1** Ajustar las siguientes condiciones del instrumento de absorción atómica conforme al manual del fabricante.

**A.3.3.4.2.2** Colocar y encender la lámpara.

**A.3.3.4.2.3** Seleccionar la longitud de onda. Generalmente se trabaja a una longitud de onda de 253.6 nm.

**A.3.3.4.2.4** Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante.

**A.3.3.4.2.5** Seleccionar la apertura de la rejilla (slit).

**A.3.3.4.2.6** Ajustar los flujos del gas acarreador (argón o nitrógeno).

**A.3.3.4.2.7** Ajustar la celda.

**A.3.3.4.2.8** Para equipos con sistema automatizado, colocar en uno de los reservorios la disolución de HCl al 50% v/v y en el otro la disolución de borohidruro de sodio al 4%.

**NOTA:** En lugar de la disolución reductora de borohidruro de sodio al 4% se puede utilizar otro agente reductor como la disolución reductora de estaño o proceder de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**A.3.3.4.2.9** Ajustar la bomba peristáltica de acuerdo a las condiciones del fabricante y proceder a la lectura en el equipo.

**A.3.3.4.2.10** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de la curva de calibración siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**A.3.3.4.2.11** Optimizar la respuesta con la solución estándar de verificación de Hg.

**A.3.3.4.3 Lectura en el equipo.**

**A.3.3.4.3.1** Leer por quintuplicado el blanco de la curva de calibración para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la disolución de verificación de Hg también por quintuplicado.

**A.3.3.4.3.2** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración graficando la absorbancia en función de la concentración.

**A.3.3.4.3.3** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**A.3.3.4.3.4** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia promedio y calcular la concentración de Hg a partir de la curva de calibración.

**A.3.3.4.3.5** Asegurarse que las concentraciones de las muestras están dentro del intervalo de trabajo de la curva de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**A.3.3.4.4 Medidas de control de calidad.**

**A.3.3.4.4.1** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser > 0.995

**A.3.3.4.4.2** Leer en el equipo el blanco de calibración y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del ± 10% del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a leer la curva de calibración y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**A.3.3.5 Método de prueba para la determinación de arsénico, selenio y antimonio por generador de hidruros.**

**A.3.3.5.1 Preparación de disoluciones y curvas de calibración.**

**A.3.3.5.1.1** A partir de las disoluciones estándar de As, Se, y Sb de 1000 mg/L, preparar disoluciones de trabajo de1 mg/L en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método.

**A.3.3.5.1.2** Preparar una disolución blanco y 5 niveles de concentración de cada uno de los metales para un intervalo de trabajo (generalmente de 1 a 20 µg/L) de 1 a 15 µg/L para el caso de Sb.

**A.3.3.5.1.3** Llevar a cabo la reducción de As y Sb (V) a As ó Sb (III) y de Se (VI) a Se (IV).

**A.3.3.5.2 Reducción de As o Sb (V) a As o Sb (III).**

**A.3.3.5.2.1** Tomar una alícuota de la muestra y agregar 10 mL de la disolución de KI al 10% y 10 mL de HCl concentrado, llevar al volumen de 100 mL con agua y esperar 2 h antes de poder leer en el equipo. Hacer el mismo tratamiento tanto para muestras como para estándares incluyendo blanco y controles de calidad.

**A.3.3.5.2.2** La reducción del As ó Sb (V) a As ó Sb (III) puede adecuarse a las condiciones que recomienda el manual del fabricante, en el caso de Sb, puede utilizarse cloruro estañoso y ácido sulfúrico, siempre y cuando la especificación del elemento a analizar se encuentre dentro del intervalo de trabajo de la curva de calibración.

**A.3.3.5.3 Digestión de la muestra para el análisis de selenio y reducción de Se (VI) a Se (IV).**

**A.3.3.5.3.1** Para la determinación de selenio, tomar una alícuota equivalente a la concentración de los puntos de la curva a preparar, agregar 2 mL de HCl 4 N, mantener a ebullición por 1 h. Dejar enfriar y llevar a un aforo de 100 mL por lo general, hacer el mismo tratamiento tanto para muestras como para estándares incluyendo blanco y controles de calidad.

**A.3.3.5.3.2** Se puede utilizar HCl 6 N, en este caso mantener a ebullición por 10 min.

**A.3.3.5.3.3** Tener cuidado para evitar una reoxidación del selenio. La eficiencia en la reducción depende de la temperatura, tiempo de reducción y concentración del HCl. Para optimizar el método, analizar muestras fortificadas con una concentración de selenio conocida.

**A.3.3.5.3.4** No utilizar material de vidrio que haya sido utilizado para la reducción de As (V) con yoduro de potasio.

**A.3.3.5.3.5** Preparar de igual forma un blanco, la curva de calibración, las muestras, la muestra fortificada, MCC y/o MCI.

**A.3.3.5.4 Condiciones de operación del instrumento.**

**A.3.3.5.4.1** Ajustar las siguientes condiciones del instrumento de absorción atómica conforme al manual del fabricante.

**A.3.3.5.4.1.1** Colocar y encender la lámpara.

**A.3.3.5.4.1.2** Seleccionar la longitud de onda. Generalmente se trabaja a una longitud de onda de 193.7 nm para As, 217.6 nm para Sb y de 196.0 nm para Se. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante.

**A.3.3.5.4.1.3** Seleccionar la apertura de la rejilla (slit).

**A.3.3.5.4.1.4** Ajustar los flujos de los gases (acetileno, aire, argón, nitrógeno ó hidrógeno).

**A.3.3.5.4.1.5** Ajustar la celda.

**A.3.3.5.4.1.6** Para equipos con sistema automatizado, colocar en uno de los reservorios la disolución de HCl al 50% v/v y en el otro la disolución de borohidruro de sodio al 4%.

**NOTA.** Esta preparación va en función de la matriz y debe ser de acuerdo a lo que marque su técnica y lo especificado por el fabricante, la disolución del 4% se sugiere como alternativa.

**A.3.3.5.4.1.7** Ajustar la bomba peristáltica de acuerdo a las condiciones del fabricante y proceder a la lectura en el equipo.

**A.3.3.5.4.1.8** Ajustar a cero de absorbancia con el blanco de la curva de calibración siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**A.3.3.5.4.1.9** Optimizar la respuesta con la disolución estándar de verificación la respuesta del instrumento al analito.

**A.3.3.5.5 Lectura en el equipo.**

**A.3.3.5.5.1** Leer por quintuplicado el blanco de reactivos para verificar que no haya contaminación y posteriormente leer la solución de verificación también por quintuplicado.

**A.3.3.5.5.2** Leer por triplicado en el equipo el blanco y los puntos de la curva. Elaborar una curva de calibración dentro del intervalo de trabajo, graficando la absorbancia en función de la concentración.

**A.3.3.5.5.3** Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal) o calcular la concentración directamente en el equipo que se programe.

**A.3.3.5.5.4** Leer cada una de las muestras por triplicado, registrar la absorbancia y calcular la concentración del elemento a partir de la curva de calibración. Cuando se use el equipo programable realizar los cálculos finales.

**A.3.3.5.5.5** Asegurarse que las concentraciones de las muestras caen dentro del intervalo de trabajo de la curva de calibración, de no ser así realizar la dilución correspondiente.

**A.3.3.5.6 Medidas de control de calidad.**

**A.3.3.5.6.1** El coeficiente de correlación (r) de la curva deberá ser > 0.995

**A.3.3.5.6.2** Leer en el equipo el blanco de calibración y un punto de la curva de calibración (MCI) antes de iniciar la lectura de las muestras, después de la lectura de cada 10 muestras y al final del análisis. El resultado deberá encontrarse dentro del ± 10% del valor esperado. Si dicho valor no se encuentra en el intervalo, interrumpir el análisis y buscar las posibles causas, posteriormente volver a leer la curva de calibración y repetir las lecturas del último lote de muestras.

**A.3.3.7 Cálculos.**

**A.3.3.7.1** Interpolar los valores de absorbancia, área o altura del pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los resultados en mg/L del elemento en la muestra empleando la siguiente fórmula:

En donde:

**A** = concentración del elemento en la muestra leída directamente del equipo o de la curva de calibración, en mg/L o µg/L (según corresponda).

**V** = volumen de la disolución de la muestra (aforo), en mL.

**F** = factor para pasar de µg a mg=1000 (En el caso de la técnica de horno de grafito, generador de hidruros y vapor frío ya que la curva está en µg/L). Para la técnica de flama el factor de dilución es 1, ya que la concentración interpolada de la curva de calibración está en mg/L.

**M** = volumen de la muestra, en mL.

**NOTA:** Si la muestra ha sido diluida, debe aplicarse el factor de dilución.

**A.3.3.7.2**  **El por ciento de recuperación para el analito se calcula de acuerdo a:**

Dónde:

R = % de recobro

CM = Concentración de la muestra fortificada o blanco de reactivos fortificado.

C = Concentración de la muestra o blanco de reactivos.

CA = Concentración equivalente de elemento añadido a la muestra o blanco de reactivos.

**A.3.3.8 Expresión de resultados**

**A.3.3.8.1** Reportar como mg/L del metal analizado.

**A.3.7 Método para la determinación de Compuestos Orgánicos Halogenados adsorbibles fijos y purgables.**

**A.3.7.1 Método para la determinación de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos (AOX).**

**A.3.7.1.1 Fundamento.**

Este método consiste en una acidificación de la muestra de agua con ácido nítrico, seguida de una adsorción sobre carbón activado de los compuestos orgánicos contenidos en la muestra, para lo cual se utiliza una de las siguientes técnicas; agitación, cavitación o por adsorción en columna.

La filtración de la muestra antes del análisis permite la determinación separada de compuestos orgánicos adsorbibles disueltos y orgánicos adsorbibles fijos (unidos a halógenos).

La separación de los compuestos volátiles mediante gas de arrastre, permite la cuantificación de los compuestos orgánicos adsorbibles purgables. Determinando los compuestos orgánicos adsorbibles fijos por cuantificación posterior a la extracción de los purgables.

Con fines de calidad del agua para uso y consumo humano, se considera compuestos orgánicos adsorbibles fijos, aquellos a los que no se les da un filtrado previo.

El desplazamiento posterior de haluros inorgánicos, se realiza por enjuague del carbón activado con solución de nitrato de sodio acidificada con ácido nítrico, seguida de combustión del carbón en presencia de oxígeno y absorción posterior de los haluros hidrogenados en una trampa con solución acida, para posteriormente hacer la determinación de los iones haluro por titulación argentométrica o por microcoulometría.

**A.3.7.1.2 Interferencias.**

**A.3.7.1.2.1** Es imprescindible un tiempo de 8 h entre la colecta de la muestra y el análisis, principalmente en la determinación de adsorbibles purgables, en cuyo caso ante ninguna circunstancia es aceptable un tiempo mayor de 24 h entre la colecta y el análisis. Cuando esto no sea posible, se deberá acidificar la muestra en el sitio de muestreo y preferentemente congelarla hasta su recepción en el laboratorio. Considerando que el tiempo de almacenamiento repercutirá inversamente proporcional a la recuperación de halógenos. Por lo que es conveniente, asegurar un tiempo máximo de 48 h entre el muestreo y el análisis para el caso de adsorbibles fijos.

**A.3.7.1.2.2** Se pueden obtener alores elevados de adsorbibles fijos por la presencia de cloro activo y de algunos compuestos inorgánicos de yodo y bromo irreversiblemente ligados al carbón activado. Se pueden prevenir las reacciones de oxidación de esos agentes oxidantes con sustancias de la muestra adicionando sulfito de sodio inmediatamente después de la toma de la muestra.

**A.3.7.1.2.3** Algunos compuestos orgánicos bromados o iodados, pueden descomponerse a su forma elemental durante la combustión, dando una pérdida en la cuantificación final.

**A.3.7.1.2.4** La presencia de algas repercute en valores altos, debido al contenido intracelular de cloruros. En este caso se deberá esperar un mínimo de 8 h después de su acidificación, entre la acidificación y el análisis, para eliminar dicha interferencia.

**A.3.7.1.2.5** Compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos, interfieren negativamente en la determinación.

**A.3.7.1.3 Aparatos e instrumentos.**

**A.3.7.1.3.1** Instrumental que cuente con sistema de adsorción por procedimiento de columna. Con tubos de adsorción, diámetro interior 3 mm y longitud 40 a 50 mm, conectados en serie empacados con 50 mg de carbón activado. Pudiéndose utilizar otras dimensiones de columna, en tal caso, su desempeño deberá ser evaluado y demostrar que se cumple con los requisitos de límite de detección.

**A.3.7.1.3.2** Sistema de combustión, con horno capaz de alcanzar calentamiento de por lo menos 959°C, equipado con tubo de cuarzo, de diámetro interior de 2 a 4 cm y longitud de cerca de 30 cm (véase Diagrama de un aparato de combustión–titulación para AOX), pudiéndose utilizar cámaras de combustión horizontal o vertical.

**A.3.7.1.3.3** Compartimiento absorbedor con ácido sulfúrico.

**A.3.7.1.3.4** Titulador argentométrico acoplado, adecuado para la determinación de 0.1 µg de cloruro (absoluto), con coeficiente de variación de 10% (precisión), o un dispositivo similar.

**A.3.7.1.3.5** Pipeta automática, adecuada para volúmenes de 10 a 100 µL.

**Diagrama de un aparato de combustión–titulación para AOX**



1. Entrada de la muestra para AOX.

2. Muestra para AOX.

3. Horno.

4. Tubo de combustión.

5. Absorbedor lleno con ácido sulfúrico.

6. Celda de titulación.

7. Agitador.

8. Instrumento de control de temperatura, flujo de gas.

9. Entrada del gas de combustión.

**A.3.7.1.4 Material.**

**A.3.7.1.4.1** El material a utilizar, deberá ser lavado con ácido y enjuagado con agua exenta de carbono orgánico.

**A.3.7.1.4.2** Matraz Erlenmeyer 100 mL.

**A.3.7.1.4.3** Matraz Erlenmeyer 250 mL.

**A.3.7.1.4.4** Matraz volumétrico 100 mL.

**A.3.7.1.4.5** Matraz volumétrico 1000 mL.

**A.3.7.1.4.6** Probeta graduada 100 mL.

**A.3.7.1.4.7** Pipeta volumétrica 5 mL.

**A.3.7.1.4.8** Pipeta volumétrica 50 mL.

**A.3.7.1.4.9** Microjeringa de 10 y 100 µL Hamilton.

**A.3.7.1.5 Muestreo.**

**A.3.7.1.5.1** La muestra se colectará en frascos de vidrio ámbar, de 205 mL de capacidad mínima, previamente lavados con ácido, cubiertos con papel aluminio y esterilizados a 400°C por al menos 1 h. La tapa del frasco, con sello de TFE, se debe lavar con detergente, enjuagándolo al menos 3 veces con agua exenta de carbono orgánico, envolver en papel aluminio y esterilizada a 100°C durante 1h. Preferentemente utilizar tapas tipo septum.

**A.3.7.1.6 Reactivos.**

**A.3.7.1.6.1** Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación.

**A.3.7.1.6.2** El contenido de AOX deberá ser insignificante cuando se compare con el contenido más bajo de AOX a ser determinado. El contenido total de AOX en el agua, químicos y gases pueden ser corroborados con la medición del blanco total.

**A.3.7.1.6.3** Agua tipo 1.

**A.3.7.1.6.4** SiO2<0.05 mg/L.

**A.3.7.1.6.5** Compuestos orgánicos exentos, por adsorción en columna de carbón activado.

**A.3.7.1.6.6** Carbón activado (malla 100 a 200), preferentemente 10 µm a 50 µm, de diámetro. El valor del blanco del carbón activado debe de contener menos de 15 µg de cloruro equivalente por g de carbón activado.

**A.3.7.1.6.7** Yoduro de potasio (KI).

**A.3.7.1.6.8** Solución de almidón, al 1%.

**A.3.7.1.6.9** Ácido nítrico, HNO3 (concentrado).

**A.3.7.1.6.10** Ácido nítrico diluído (HNO3) 0.02 M.

**A.3.7.1.6.11** Ácido clorhídrico (HCl) 0.010 M.

**NOTA:** La molaridad debe ser precisa, porque el ácido es usado para verificar la microtitulación.

**A.3.7.1.6.12** Ácido sulfúrico H2SO4 (concentrado).

**A.3.7.1.6.13** Nitrato de sodio (NaNO3)

**A.3.7.1.6.14** Sulfito de sodio (Na2SO3)

**A.3.7.1.7 Preparación de disoluciones.**

**A.3.7.1.7.1 Disolución madre de Nitrato (NaNO3) 0.2 M.**

**A.3.7.1.7.1.1** Disolver 17 g de nitrato de sodio (NaNO3) en 400 mL de agua destilada, después adicionar 25 mL de HNO3 (conc) y posteriormente aforar a 1 000 mL en matraz volumétrico.

**A.3.7.1.7.1.2** Si se almacena en un frasco ámbar, la solución es estable por 3 meses.

**A.3.7.1.7.2 Disolución de lavado de Nitrato (NaNO3) 0.01 M, pH ≈ 1.7.**

**A.3.7.1.7.2.1** Pipetear 50 mL de la solución madre de nitrato, en un matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**A.3.7.1.7.2.2** Si se almacena en un frasco ámbar, la solución es estable por 1 mes.

**A.3.7.1.7.3 Disolución de sulfito de sodio (Na2SO3) 1 M.**

**A.3.7.1.7.3.1** Disolver 126 g de nitrato de sodio (Na2SO3) en 400 mL de agua destilada, y posteriormente transferir a matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**A.3.7.1.7.3.2** La solución es estable por 1 mes si se almacena de 2 a 8°C.

**A.3.7.1.7.4 Disolución madre de 4–Clorofenol (200 mg Cl-AOX/L).**

**A.3.7.1.7.4.1** Disolver 72.5 mg de 4–Clorofenol (C6H5ClO) en 40 mL de agua destilada y posteriormente trasvasar a matraz volumétrico de 100 mL y aforarlo con agua destilada.

**A.3.7.1.7.4.2** Por razones de seguridad, se recomienda usar soluciones disponibles comercialmente.

**A.3.7.1.7.4.3** La solución madre puede ser almacenada por 1 mes de 2 a 8°C en frasco de vidrio.

**A.3.7.1.7.5 Disolución patrón de 4–Clorofenol (1 mg Cl– AOX /L).**

**A.3.7.1.7.5.1** Pipetear 5 mL de la solución madre de 4–Clorofenol (200 mg Cl**–** AOX /L) a un matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**A.3.7.1.7.5.2** La solución de trabajo puede ser almacenada por 1 mes de 2 a 8°C en frasco de vidrio.

**A.3.7.1.7.6 Disolución madre de ácido 2–Clorobenzoico (250 mg Cl– AOX /L).**

**A.3.7.1.7.6.1** Disolver 110.4 mg de ácido 2–Clorobenzoico (ClC6H4COOH) en 40 mL de agua destilada y trasvasar a matraz volumétrico de 100 mL, aforándolo posteriormente con agua destilada.

**A.3.7.1.7.6.2** El ácido 2–Clorobenzoico se disuelve lentamente por lo que deberá prepararse esta solución desde 1 día antes.

**A.3.7.1.7.6.3** Esta solución madre puede ser almacenada a una temperatura de 2 a 8°C en frasco de vidrio.

**A.3.7.1.7.7 Disolución patrón de ácido 2–Clorobenzoico (1 mg Cl– AOX /L).**

**A.3.7.1.7.7.1** Pipetear 4 mL de la solución madre de ácido 2–Clorobenzoico (250 mg Cl**–** **AOX** /L) a 1 matraz volumétrico de 1 000 mL y aforarlo con agua destilada.

**A.3.7.1.7.7.2** Esta solución de trabajo puede ser almacenada por 1 semana entre 2 a 8°C, en frasco de vidrio.

**A.3.7.1.7.7.3** Gases de combustión, puede ser oxígeno (O2), o una mezcla de oxígeno y un gas inerte.

**A.3.7.1.7.8 Disolución de estándares internos.**

**A.3.7.1.7.8.1** Preparar una serie de estándares en matraces volumétricos de 100 mL.

**A.3.7.1.7.8.2** Considerar el rango de operación del instrumento, preparar un mínimo de 5 estándares a partir de cada solución patrón.

**A.3.7.1.7.8.3** Preparar soluciones estándares nuevas el día que se van a usar.

**A.3.7.1.8 Calibración del equipo y material.**

**A.3.7.1.8.1** Llevar un registro diario del comportamiento de operación de refrigeradores y congeladores.

**A.3.7.1.8.2** En el caso de determinación microcoulométrica, verificar el instrumento diariamente dentro de su rango de trabajo, usando por lo menos 1 de las soluciones siguientes:

**A.3.7.1.8.3** Con una jeringa, inyectar directamente un volumen a una concentración entre 50 y 80 µg/L de solución de ácido clorhídrico, 0.01 M en la celda de titulación.

**A.3.7.1.8.4** Medir la cantidad de carga transferida en esta prueba.

**A.3.7.1.8.5** Asumiendo teóricamente un 100% de transferencia electrónica. Obtener el factor de prueba *a*, utilizando la ecuación siguiente:

**Q = (a)(Qt) ………(1)**

En donde:

**Q** es la carga experimental, expresada en Coulomb (C), para la muestra de ácido clorhídrico.

**Qt** es la carga teórica, expresada en Coulomb (C), para la muestra de ácido clorhídrico.

**a** es el factor de prueba.

**A.3.7.8.5.1** Para obtener la carga teórica Qt se utilizará la siguiente ecuación:

**Qt = (V)(CCl)(F) ……….(2)**

En donde:

**V** es el volumen expresado en L de disolución de ácido clorhídrico.

**CCl** es la concentración de cloruro expresado en moles por L de la disolución del ácido clorhídrico.

**F** es la constante de Faraday (F = 96484.56 C/mol).

El instrumento de medida es adecuado, con factor de prueba a, en el rango de 0.97 a 1.03.

**A.3.7.1.9 Condiciones de prueba, medidas de seguridad y de control de calidad.**

**A.3.7.1.9.1** Analizar un blanco de muestra y 5 soluciones estándar y comparar los resultados.

**A.3.7.1.9.2** Calcular con valores nominales.

**A.3.7.1.9.3** Probar la correlación de los valores medidos, comparándolos con los valores nominales de **AOX** (por ciento de recuperación).

**A.3.7.1.9.4** Los resultados son aceptables si el coeficiente de correlación es ≥0.999.

**A.3.7.1.9.5** Una varianza alta o no lineal de la función de recuperación puede causar resultados insatisfactorios.

**A.3.7.1.9.6** En las pruebas de los estándares el valor obtenido y el valor teórico no presentarán una desviación mayor al 10% (recuperación del 90% al 110%).

**A.3.7.1.10 Muestreo y pretratamiento de la muestra.**

**A.3.7.1.10.1** En el sitio de muestreo se debe determinar cloro libre residual (oxidantes) los cuales se deben eliminar por adición de solución de sulfito de sodio.

**A.3.7.1.10.2** Si se considera que están presentes compuestos halogenados orgánicos volátiles, como solventes clorados, se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 h después del muestreo. No se puede dar un tiempo máximo de almacenamiento, dadas las circunstancias individuales las cuales dictarán los requerimientos.

**A.3.7.1.10.3** En caso de sospecha de presencia de otros oxidantes, determinar su presencia por análisis de una alícuota, paralela a la muestra; agregando un par de cristales de KI, y una vez disueltos adicionar 1 o 2 gotas de solución de almidón. La generación de un color azul en la alícuota confirma la presencia de oxidantes. Determinar el volumen adecuado para la eliminación de los oxidantes, por prueba y error en alícuotas de la muestra.

**A.3.7.1.10.4** Una vez determinado el volumen de sulfito de sodio necesario para eliminar la interferencia por oxidantes, colectar la muestra, adicionar el volumen proporcional de sulfito calculado y acidificar con ácido nítrico de la siguiente manera:

**A.3.7.1.10.5** Colectar la muestra en frasco de vidrio, dejando un espacio de aproximadamente 5% del volumen total, adicionar el volumen proporcional de sulfito de sodio, adicionar 2 mL de HNO3 por L de muestra y llenar completamente el recipiente de la muestra para evitar burbujas de aire. Usualmente la cantidad de ácido adicionado es suficiente para bajar el pH<2. Puede ser necesario adicionar más HNO3 para lograr este pH.

**A.3.7.1.10.6** Analizar la muestra de agua tan pronto como sea posible después del muestreo, en presencia de algas, analizar después de 8 h del muestreo.

**A.3.7.1.10.7** Si no es posible analizarla de inmediato y es necesario almacenarla, conservar la muestra acidificada a 4°C, o congelar.

**A.3.7.1.11 Procedimiento.**

**A.3.7.1.11.1** Previo al análisis de muestras se recomienda determinar el límite de cuantificación a partir de la medición de una serie de blancos del método, como una estimación preliminar. El límite de cuantificación puede ser igualado al valor de 9 veces la desviación estándar de la media del blanco.

**A.3.7.1.11.2** La muestra de prueba tomada para análisis deberá tener un valor dentro del rango óptimo de trabajo del instrumento, que es generalmente entre 1.0 y 300 µg/L. La concentración de cloruro no debe exceder 1 g/L. Puede ser necesario diluir la muestra con HNO3 0.02 M para alcanzar un pH ˂2 antes de iniciar el análisis.

**A.3.7.1.11.3** Cuando sea necesaria la dilución no usar menos de 5 mL de la muestra original. Anotar el factor de la dilución (volumen final dividido entre el volumen original) y tomarlo en cuenta en el cálculo. Si el factor de dilución es mayor de 10 diluir por lo menos 2 veces.

**A.3.7.1.11.4 Homogenización.**

**A.3.7.1.11.4.1** Asegurar que la muestra esté atemperada y homogenizada, por agitación o movimiento de la muestra en el frasco de muestreo, hasta que se observe una mezcla completa.

**A.3.7.1.11.4.2** Tomar una muestra de prueba homogeneizada de 100 ml. Si la muestra no puede ser completamente homogeneizada, filtrar antes de realizar cualquier otro pretratamiento de la muestra. En tales casos, se determinarán únicamente los componentes de AOX solubles de la muestra. Si la muestra ha sido filtrada, indicar en el informe de la prueba que este resultado sólo representa AOX disuelto.

**A.3.7.1.11.5 Adsorción sobre carbón activado.**

**A.3.7.1.11.5.1** Antes de realizar la adsorción sobre carbón activado, adicionar a la muestra de prueba 5 mL de solución de nitrato 0.2 M.

**A.3.7.1.11.5.2** Procedimiento de agitación.

**A.3.7.1.11.5.2.1** Transferir la muestra de prueba pretratada a un matraz cónico con tapón, agregar 50 mg de carbón activado, tapar el matraz y agitar la suspensión por 1 hora.

**A.3.7.1.11.5.2.2** Colocar una membrana de filtración en la tapa inferior del vaso del sistema de filtración y filtrar la suspensión.. Si se tienen problemas con la filtración, diluir la submuestra y aplicar presión durante la filtración.

**A.3.7.1.11.5.2.3** Lavar la pasta que queda en la membrana de filtración con aproximadamente 25 mL de disolución de nitrato 0.02 M, aplicando la solución en varias porciones. Si se lava con volúmenes mayores a 25 mL , se reducen las interferencias por cloruro, pero también se reducen los recobros de AOX.

**A.3.7.1.11.5.2.4** No llevar a sequedad porque se puede presentar r el problema de obtener resultados altos por ejemplo debido a la contaminación con el aire.

**A.3.7.1.11.5.2.5** Colocar el filtro húmedo y la pasta en un contenedor de cuarzo y proceder de acuerdo a A.3.7.1.11.6

**A.3.7.1.11.5.2.6** Determinar un blanco usando 100 mL de HNO3 0.02 M en lugar de la muestra de análisis y proceder de la misma forma que la muestra (A.3.7.1.11.6.1 y A.3.7.1.11.6.2).

**A.3.7.1.11.5.2.7** Preparar **l**a muestra adicionada, depositando 80 mL de muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente adicionar 10 μL de STD de 100 mg Cl-/L y se lleva al aforo con la muestra, proceder de la misma forma que la muestra (A.3.7.1.11.6.1 y A.3.7.1.11.6.2).

**A.3.7.1.11.5.2.8** No pueden disminuirse mediante dilución concentraciones de cloruro en el intervalo de 500 mg/L a 1000 mg/L porque también se disminuye la concentración de los AOX. En este caso, se recomienda utilizar el procedimiento de columna mencionado abajo (A.3.7.1.11.6.3).

**A.3.7.1.11.5.3** procedimiento de columna

**A.3.7.1.11.5.3.1** A la muestra tratada como en **A.3.7.1.11.5.1**  pasarla a través de dos columnas de adsorción (ver A.3.7.1.3.1), montados verticalmente en serie, a una velocidad de flujo de 3 mL/min.

**A.3.7.1.11.5.3.2** Enjuagar las columnas con 25 ml de solución de lavado de nitrato 0.02 M a una velocidad de flujo de 3 mL/min.

**A.3.7.1.11.5.3.3** Proceder de acuerdo con A.3.7.1.11.6

**A.3.7.1.11.5.3.4** Determinar un blanco usando 100 mL de HNO3 0.02 M en lugar de la muestra de análisis y proceder de la misma forma que la muestra (A.3.7.1.11.5.1 y A.3.7.1.11.5.3).

**A.3.7.1.11.5.3.5** Preparar la muestra adicionada, depositando 80 mL de muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente adicionar 10 μL de STD de 100 mg Cl-/L y se lleva al aforo con la muestra, proceder de la misma forma que la muestra (A.3.7.1.11.5.1 y A.3.7.1.11.5.3).

**A.3.7.1.11.6 Combustión y determinación de los iones haluro**

**A.3.7.1.11.6.1** La temperatura en el aparato de combustión debe estar como mínimo a 950 ° C, ajustar el instrumento tomando en cuenta los parámetros recomendados por el fabricante.

**A.3.7.1.11.6.2** Conectar el suministro de gas al tubo de combustión y el tubo de combustión al absorbedor ADVERTENCIA - Evitar el reflujo de ácido sulfúrico en el tubo de combustión. Esto puede ser causado por la temperatura o la depresión de la presión.

**A.3.7.1.11.6.3** Ajustar la velocidad de flujo de gas a aproximadamente 150 mL/min.

**A.3.7.1.11.6.4** Transferir la membrana de filtración húmeda junto con la pasta obtenida (A.3.7.1.11.6.2) o si se usó el procedimiento de columna (A.3.7.1.11.6.3) al recipiente de cuarzo.

**A.3.7.1.11.6.5** Introducir el recipiente de cuarzo en la zona que ha sido calentada del aparato de combustión el cual está equipado con el dispositivo de medición argentométrica y seguir siguiendo las instrucciones del fabricante.

**A.3.7.1.11.6.6** Registrar los valores medidos obtenidos del dispositivo de medición argentométrica, expresado en Coulomb (C), Qs, por las muestras de ensayo y proceder de acuerdo a A.3.7.1.12.1**.**

**A.3.7.1.12 Cálculos.**

**A.3.7.1.12.1** Algunos instrumentos cuentan con programas para el cálculo de la concentración de los compuestos halogenados adsorbibles, considerando los valores de los estándares preparados. En caso contrario calcular la concentración de los compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) utilizando la siguiente ecuación:

**µg/L** AOX **=** µ**g/L** AOX **(muestra) –** µ**g/L** AOX **(blanco) = ([(Qs – Qo)M] x 1000 / (V x F)**

En dónde:

µ**g/L** AOXes la concentración de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles, expresados como µg de Cl-/L.

**QS** es la lectura del instrumento en Coulomb de la muestra.

**Q0** es la lectura del instrumento en Coulomb del blanco.

**M** es la masa molecular del Cl-.

**V** es el volumen de muestra en mL.

**F** es la constante de Faraday (F = 96484,56 C/mol).

**A.3.7.1.13 Informe de prueba.**

**A.3.7.1.13.1** Reportar enmg de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos por L de solución (mg AOX/L).

**A.3.7.2 Método para la determinación de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables (POX)**

**A.3.7.2.1 Fundamento.**

**A.3.7.2.1.1** Una muestra de agua, protegida contra la pérdida de compuestos volátiles mediante la eliminación de espacios vacíos en el contenedor, es transferida al dispositivo de purga de manera hermética. Los halógenos orgánicos volátiles son purgados con helio los cuales son transferidos a un horno de pirolisis utilizando una corriente de CO2 y el haluro de hidrogeno (HX), producto de la pirolisis, es absorbido y sometido a una titulación electrolítica utilizando un detector microcoulometrico, expresando el resultado como mg/L de Cl purgable.

**A.3.7.2.2 Interferencias.**

**A.3.7.2.2.1** El material de vidrio después de haber sido utilizado, debe lavarse lo más pronto posible con detergente libre de fosfatos, enjuagarse con agua tipo I y secarse a 105ºC durante una hora o hasta que se encuentre completamente seco. El material de vidrio que no es volumétrico además debe someterse a calentamiento a 300 °C en una mufla por 15 a 30 min.

Todo el material limpio debe mantenerse en un ambiente limpio y libre de polvo, inmediatamente después de haberse secado.

**A.3.7.2.2.2** Utilizar reactivos y gases de alta pureza para minimizar las interferencias.

**A.3.7.2.2.3** Las muestras pueden contaminarse por difusión de compuestos orgánicos volátiles halogenados (como el cloruro de metileno o cloroformo por ejemplo) a través de la septa, durante su traslado y almacenaje. Para realizar la verificación de este tipo de contaminación es necesario preparar un blanco con agua que haya sido mantenida bajo las mismas condiciones de la muestra (Blanco de almacenamiento).

**A.3.7.2.2.4** Cuando se analizan muestras con alta concentración del analito seguidas de muestras con baja concentración o viceversa, puede existir cierta contaminación, para reducirla, tanto el dispositivo de purga como la jeringa utilizada, deben enjuagarse con agua entre un análisis y el siguiente. A su vez, cuando se tenga una muestra cuya concentración resulte inusual, de manera subsecuente, deberá analizarse un blanco para evaluar si existe contaminación cruzada.

**A.3.7.2.2.5** Para muestras con un alto contenido de material soluble, sólidos suspendidos o altos niveles de organohaluros, se requiere lavar el frasco de purga con detergente, enjuagar con agua y finalmente secar en estufa a 105°C.

**A.3.7.2.3 Equipo.**

**A.3.7.2.3.1** Equipo analizador de Halógeno Orgánico con sistema de combustión, con sistema de purga para POX capaz de mantener una temperatura de purga de 45°C, con horno capaz de alcanzar calentamiento de por lo menos 960°C, equipado con tubo de cuarzo de diámetro interior de 2 a 4 cm y longitud de 30 cm, pudiendo ser cámaras de combustión horizontal o vertical, con titulador microcoulométrico.

**A.3.7.2.4 Material.**

**A.3.7.2.4.1** Viales, ámbar de 25 mL o de mayor de capacidad lavados especialmente, con septas de silicona forrados con teflón nuevas o lavadas con detergente, enjuagadas con agua del grifo y posteriormente con agua tipo I

**A.3.7.2.4.2** Microjeringa de 10, 25, 50 y 100 µL.

**A.3.7.2.4.3** Matraces volumétricos de 100 mL

**A.3.7.2.4.4** Microjeringa de 10µL y 25µL con aguja de diámetro interno igual a 0.015 cm (0.006 in), Hamilton 702 N o equivalente.

**A.3.7.2.4.5** Todo el material de laboratorio (vidrio, cuarzo, polietileno, PTFE, FEP, etc.) debe estar suficientemente limpio y lavado con ácido nítrico para cubrir los objetivos del método.

**A.3.7.2.5 Reactivos.**

**A.3.7.2.5.1** A menos que se indique otra cosa, los reactivos que se requieren en el método deben ser tipo ACS (American Chemical Society) grado reactivo analítico.

**A.3.7.2.5.2** Agua Tipo I. Es necesario burbujearla con N2 durante una hora para realizar cualquier disolución y/o análisis.

**A.3.7.2.5.3** Ácido acético glacial (CH3COOH)

**A.3.7.2.5.4** Cloruro de sodio (NaCl)

**A.3.7.2.5.5** Metanol (CH3OH).- Almacenar lejos de otros disolventes.

**A.3.7.2.5.6** Cloroformo CHCl3

**A.3.7.2.5.7** Sulfuro de sodio Na2S, granular anhidro.

**A.3.7.2.5.8** Dióxido de carbono (CO2)

**A.3.7.2.5.1 Disoluciones.**

**A.3.7.2.5.1.1 Disolución concentrada de cloroformo (10000 mg de Cl-/L)**

1 μL = 11.2 μg de CHCl3 o 10μg de Cl-. Colocar en un matraz volumétrico de 100 mL que contenga aproximadamente 90 mL de metanol, 760 μL (1120 mg) de cloroformo y llevar al aforo con metanol

**A.3.7.2.5.1.2 Disolución de cloroformo 100 mg de Cl-/L**

1 μL = 0.1μg Cl-. Diluir 1mL de la disolución concentrada de cloroformo a 100 mL con metanol.

**A.3.7.2.5.1.3 Disolución de cloroformo de 100 μg de Cl-/L**

En un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 90 mL de agua y 100 μL de la disolución de 100 mg Cl-/L y llevar al aforo con agua. Mezclar y almacenar en un frasco adecuado para que la disolución quede hasta el tope. Analizar dentro de las 2 horas después de su preparación.

**A.3.7.2.5.1.4 Disolución estándar de cloruro de sodio (1.0 μg de Cl-/μL).**

Disolver 0.412 g de NaCl en agua y diluir a 250 mL.

**A.3.7.2.5.1.5 Disolución de ácido acético en agua (70 %)**. Diluir 7 volúmenes de ácido acético glacial con 3 volúmenes de agua.

**A.3.7.2.6 Recolección, preservación y almacenamiento.**

**A.3.7.2.6.1** Recolección. Todas las muestras deben ser colectadas en botellas con septa de teflón recubiertas de silicón y ser protegidas de la luz. Si esto no es posible, utilizar botellas de vidrio ámbar de 250 mL con tapón recubierto de teflón.

**A.3.7.2.6.2** Mantener las muestras protegidas de la luz, utilizar viales de vidrio ámbar con septa de teflón.

**A.3.7.2.6.3** Para minimizar la pérdida de organohaluros volátiles, tomar la muestra hasta el tope del contenedor de la muestra y reducir el número de transferencias a las que se somete la misma.

**A.3.7.2.6.4** Tratamiento en campo. Para reducir el cloro residual, se adiciona sulfito de sodio (5 mg de sulfito de sodio por litro de muestra) a los contenedores de muestra cuando estos se encuentran vacíos; una vez que la muestra ha sido colectada y el contenedor se encuentra cerrado, debe agitarse vigorosamente durante 1 minuto. La muestra debe almacenarse a 4 ºC sin espacios libres en el contenedor.

**A.3.7.2.6.5** Tiempo Máximo Previo al Análisis. La muestra debe analizarse tan pronto como sea posible, teniendo como tiempo máximo 14 días después de su recolección.

**A.3.7.2.7 Control de Calidad.**

**A.3.7.2.7.1 Verificación del sistema**

**A.3.7.2.7.1.1** Analizar 3 alícuotas de 5 mL de la disolución de cloroformo de 100 μg CH3Cl/L. El promedio de las tres lecturas debe estar 0.4 y 0.55 μg de cloro y entre las lecturas debe haber una desviación estándar relativa (DRP) ≤5%.

**A.3.7.2.7.2 Verificación de contaminación**

**A.3.7.2.7.2.1** Blanco de instrumento. Correr un blanco de instrumento colocando un vial vacío.

**A.3.7.2.7.2.2** Analizar mínimo un blanco de agua cada 20 muestras o por lote analítico, con el fin de determinar si existe algún tipo de contaminación.

**Nota:** Para ambos blancos la lectura debe ser 0.00±0.05 μg Cl-.

**A.3.7.2.7.3 Verificación del Proceso Analítico**

**A.3.7.2.7.3.1** Analizar un blanco de reactivos cada 20 muestras o por lote de análisis, la lectura debe ser < 10 µg/L.

**A.3.7.2.7.3.2** Analizar una muestra de control de calidad (MCC), el % de recobro para la MCC debe ser ± 20 %.

**A.3.7.2.7.4 Verificación de interferencias de matriz**

**A.3.7.2.7.4.1** Analizar una matriz adicionada cada 10 muestras o por lote analítico. La muestra adicionada se somete al mismo procedimiento que las demás muestras. El % de recobro para la muestra adicionada debe ser ± 10 %.

**A.3.7.2.7.5 Verificación de precisión del método**

**A.3.7.2.7.5.1** Las muestras deben analizarse por duplicado (DRP ± 20 %).

**A.3.7.2.8 Procedimiento.**

**A.3.7.2.8.1 Calibración.**

**A.3.7.2.8.1.1** Montar el Equipo analizador de halógeno orgánico con sistema de combustión, con sistema de purga para POX de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Generalmente a una velocidad de flujo de CO2 de 150 mL / min y la temperatura del burbujeador a 45 ± 5 ° C. El horno de pirólisis debe establecerse a 800 ± 10ºC. Coloque la celda de titulación en la salida del tubo de pirólisis y llenar con electrolito (70% de ácido acético). Los cambios en la velocidad de flujo y la temperatura afectan a los compuestos purgados y cambian el porcentaje de recuperación de compuestos marginales. Por lo tanto, estos parámetros no deben variar. Ajustar la velocidad de flujo de gas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**A.3.7.2.8.1.2** Encender el instrumento y permitir que el flujo de gas y las temperaturas temperaturas se estabilicen. Cuando la corriente de fondo de la celda de titulación se ha estabilizado el instrumento está listo para su uso.

**A.3.7.2.8.1.3** Calibrar el sistema de titulación microcoulométrica para equivalentes de Cl- mediante la inyección de varias cantidades (de 1 a 80 µL) de estándar de calibración de cloruro de sodio directamente en la celda de titulación e integrar la respuesta utilizando la modalidad de integración (POX). Si se desea, la salida analógica de la celda de titulación, se puede mostrar en un gráfico. El intervalo de cantidades de cloruro de sodio debe cubrir el intervalo de concentraciones de la muestra esperado y siempre debe ser menor de 80 µg de Cl. La respuesta integrada debe leerse dentro del 2 % o 0.05 µg de la cantidad inyectada, (la que sea mayor) en el intervalo de 1-80 µg de Cl-. Si este requisito de calibración no se cumple, entonces los parámetros de sensibilidad del instrumento se deben ajustar de acuerdo con las especificaciones del fabricante para lograr una respuesta precisa.

**A.3.7.2.8.1.4** Comprobar el desempeño del sistema analítico diariamente mediante el análisis de tres alícuotas de 5 mL de estándar de cloroformo de 100 µg /L recién preparado. El promedio de estos tres análisis debe estar entre 0.4-0.55 µg de Cl- y el porcentaje de desviación estándar relativa debe ser de ≤ 5%. Si no se cumplen estos criterios, el sistema se debe ser verificar como se describe en el manual de mantenimiento del instrumento con el fin de resolver el problema.

**A.3.7.2.8.2 Preparación y Análisis de muestras.**

**A.3.7.2.8.2.1** Dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente antes de introducirla en la jeringa. Retirar el émbolo de la jeringa de 5 o 10 mL y conectar una válvula de jeringa cerrada. Abrir la botella de la muestra y verter cuidadosamente la muestra en el cilindro de la jeringa. Colocar nuevamente el émbolo, y abrir la válvula de la jeringa de cierre antes de presionar el émbolo de la jeringa para comprimir la muestra y purgar el aire residual. Ajustar el volumen de la muestra a 5 mL. Debido a que este proceso de tomar la alícuota destruye la validez de la muestra para su futuro análisis, llenar una segunda jeringa para el análisis de duplicado o si requiere una segunda muestra en caso de derrame accidental de la primera alícuota o volver a analizar.

**Nota:** Si se desea una sensibilidad máxima y la muestra no espuma excesivamente, se puede tomar una alícuota de muestra de 10 mL.

**A.3.7.2.8.2.2** Unir el ensamble de la válvula de la jeringa a la válvula de la jeringa en el dispositivo de purga. Colocar el sistema de pirolisis-microcóulometro en modo de integración (POX) para activar el sistema de integración. Inmediatamente abrir las válvulas de la jeringa e inyectar la muestra en la cámara de purga.

**A.3.7.2.8.2.3** Cerrar ambas válvulas y purgar la muestra durante 10 minutos.

**A.3.7.2.8.2.4** Una vez completada la integración, abrir las válvulas de la jeringa y retirar la muestra purgada. Enjuagar la jeringa y el dispositivo de purga con agua antes de analizar otras muestras.

**A.3.7.2.8.2.5** Si la respuesta integrada excede el intervalo de trabajo del instrumento, preparar una dilución de la muestra de la alícuota en la segunda jeringa con agua y volver a analizar.

**A.3.7.2.8.2.6** **Muestras fortificadas con cloroformo**. Preparar alícuotas de 5 mL de muestras adicionando 10 μL de una disolución estándar metanólica cuya concentración sea 500 veces mayor a la concentración esperada en las muestras, procediendo como se indica en los numerales A.3.7.2.8.2.1 al A.3.7.2.8.2.5.

**A.3.7.2.8.2.7 Blanco de agua (blanco de almacenamiento).** Tomar la misma cantidad de agua que se tomó para la muestra procediendo como se indica en los numerales A.3.7.2.8.2.1 al A.3.7.2.8.2.4.

**A.3.7.2.8.3 Procedimiento de pirolisis.**

**A.3.7.2.8.3.1** Llevar a cabo la pirólisis del compuesto orgánico purgado de la muestra en una atmósfera rica en CO2 a temperatura baja para asegurar la conversión de trihalometanos bromados a especies titulables.

**A.3.7.2.8.3.2** Analizar directamente los gases producidos en la celda de titulación microcoulometrica. Seguir cuidadosamente las instrucciones del manual del instrumento para optimizar el desempeño de la celda.

**A.3.7.2.9 Cálculos.**

**A.3.7.2.9.1** Los resultados generados por el instrumento están en µg Cl-/L. Cuando aplique, introducir el valor de la dilución al instrumento para que sea considerado en el cálculo de concentración. No reportar concentraciones por debajo del límite de detección del método (LDM).

**A.3.7.2.10 Desempeño del Método.**

**A.3.7.2.10.1** El laboratorio debe demostrar que alcanza o mejora los siguientes criterios de desempeño para poder utilizar este método:

**A.3.7.2.10.2** Límite de Detección: 0.0015 mg/L

**A.3.7.2.10.3** Limite Práctico de Cuantificación: 0.005 mg/L

**A.3.7.2.10.4** Intervalo de Trabajo: 0.005 – 1.0 mg/L

**A.3.7.2.11 Informe de prueba.**

**A.3.7.2.11.1** mg de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles purgables por L de disolución (mg POX/L)

**A.3.8 Se elimina**

**A.3.10 Métodos de prueba para la determinación cloro residual libre.**

**A.3.10.1 Método utilizando un kit para determinar cloro residual libre en la escala de color**

De acuerdo a lo indicado en la NOM-230-SSA1-2002, realizar la prueba inmediatamente después del muestreo.

**A.3.10.1.1 Fundamento.**

Se basa en la reacción del cloro libre disponible con el indicador N-N-Dietil-p-fenilendiamina (DFD) en ausencia de ion yoduro para formar un compuesto de coloración roja el cual es determinado por comparación de color mediante el uso de kits.

**A.3.10.1.2 Interferencias.**

**A.3.10.1.2.1** Color y turbiedad pueden interferir. Contaminantes orgánicos pueden producir lecturas falsas de cloro residual así como muchos agentes oxidantes, tales como bromo, dióxido de cloro, yodo, permanganato, peróxido de hidrógeno y ozono, sin embargo las formas reducidas de estos compuestos bromuro, cloruro, yoduro, ion manganeso y oxígeno en ausencia de otros oxidantes no interfieren. Agentes reductores tales como compuestos ferrosos, sulfuro de hidrógeno y materia orgánica oxidable generalmente no interfieren.

En el agua para uso y consumo humano generalmente la cantidad de estas sustancias interferentes son despreciables.

**A.3.10.1.2.2** Existen algunas fuentes de error como son la presencia de burbujas en las paredes de la celda al momento de realizar la lectura, empañamiento de las celdas, suciedad del vidrio y los efectos de vibración alteran la visibilidad superficial de la muestra originando errores en las lecturas.

**A.3.10.1.3 Aparatos e instrumentos.**

Kit para determinar cloro residual libre en la escala de color e intervalo de comparación adecuados.

**A.3.10.1.4 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.10.1.4.1** Agua tipo I o tipo II

**A.3.10.1.4.2** Reactivo N-N-Dietil-p-fenilendiamina (DFD), que contiene reactivos que regulan el pH, la presentación del reactivo puede ser en tabletas, almohadillas o en solución a través de dosificador, y es conveniente para la medición de cloro residual libre.

**A.3.10.1.5 Procedimiento.**

**A.3.10.1.5.1** Previo al monitoreo de cloro residual libre, revisar que el kit para el monitoreo de cloro residual se encuentre completo y en buenas condiciones es decir, limpio, sin residuos de la lectura anterior, sin ralladuras o fugas.

**A.3.10.1.5.2** Liberar la llave o grifo de aditamentos conectados, tales como mangueras, a fin de que la determinación de cloro residual sea directa y no interfieran en el resultado.

**A.3.10.1.5.3** Abrir la llave o grifo, dejar correr el agua por un espacio de 30 seg a 1 min, para garantizar que el agua contenida en la tubería ha sido vaciada, ésta podrá ser colectada en un recipiente, para evitar su desperdicio.

**A.3.10.1.5.4** El agua deberá provenir directamente del sistema de abastecimiento, no se deberá monitorear si el grifo presenta fugas entre el tambor y el cuello, ya que el agua podrá correr por la parte exterior del grifo y contaminar la muestra.

**A.3.10.1.5.5** Registrar la ubicación del punto de muestreo.

**A.3.10.1.5.6** Enjuagar las celdas con el agua a monitorear 3 veces con agitación.

**A.3.10.1.5.7** Llenar la celda con el agua a monitorear

**A.3.10.1.5.8** Agregar a la celda de prueba los reactivos que contienen DFD, para el desarrollo de color, siguiendo las instrucciones del fabricante usando guantes, en caso de utilizar dosificador, cerciorarse que la totalidad de la dosis sea colectada en la celda.

**A.3.10.1.5.9** Colocar la tapa a la celda e invertirlos varias veces para mezclar la muestra con los reactivos de desarrollo de color, de acuerdo a las condiciones del kit y las instrucciones del fabricante.

**A.3.10.1.5.10** Comparar el color de la celda de prueba con muestra tratada, con la escala colorimétrica colocando un fondo blanco para poder comparar al observar el color que presenta el agua.

**A.3.10.1.6 Expresión de resultados.**

**A.3.10.1.6.1** Expresar el resultado en

**A.3.10.2 Método colorimétrico con DFD para la determinación de cloro residual libre.**

**A.3.10.2.1 Fundamento.**

Se basa en la reacción del cloro libre disponible con el indicador N-N-Dietil-p-fenilendiamina (DFD) en ausencia de ion yoduro para formar un compuesto de coloración roja el cual es medido espectrométricamente a una longitud de onda de 515 nm.

**A.3.10.2.2 Interferencias**

Se presentan las mismas interferencias que en el método de uso de kits (ver A.3.10.1.2).

**A.3.10.2.3 Aparatos e instrumentos.**

**A.13.2.3.1** Espectrómetro de UV-Visible disponible para utilizarse a 515 nm con celdas de 1 cm de paso de luz.

**A.13.2.3.2** Micropipetas de 1,5 y 10 mL

**A.13.2.3.3** Agitador y barras magnéticas

**A.13.2.3.4** Dosificador o pipetas para medir alícuotas de muestras o patrones

**A.3.10.2.4 Materiales.**

**A.3.10.2.4.1** Material común de laboratorio.

**A.3.10.2.4.2** Matraces Erlenmeyer de 125 mL

**A.3.10.2.4.3** Matraces volumétricos de 50 mL

**A.3.10.2.4.4** puntas para micropipeta

**A.3.10.2.5 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.10.2.5.1** Agua tipo I o tipo II.

**A.3.10.2.5.2** Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na2HPO4).

**A.3.10.2.5.3** Fosfato monobásico de potasio anhidro (KH2PO4).

**A.3.10.2.5.4** Cloruro de mercurio II (HgCl2) o tolueno (para evitar el crecimiento de moho en la sol. amortiguadora).

**A.3.10.2.5.5** Oxalato de N,N-Dietil-1,4-fenilendiamina (Oxalato de DFD). Puede emplearse también el sulfato pentahidratado de DFD o sulfato anhidro de DFD.

**A.3.10.2.5.6** Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético dihidratado (EDTA).

**A.3.10.2.5.7** Ácido clorhídrico concentrado (HCl).

**A.3.10.2.5.8** Yoduro de potasio (KI) en cristales.

**A.3.10.2.5.9** Dicromato de potasio (K2Cr2O7). Secado a 100 ºC durante 2 horas.

**A.3.10.2.5.10** Ácido sulfúrico concentrado (H2SO4).

**A.3.10.2.5.11** Sulfato de amonio y hierro. SFA. [ Fe (NH4)2 (SO4)2. 6H2O]

**A.3.10.2.5.12** Ácido fosfórico (H3PO4).

**A.3.10.2.5.13** Difenilaminosulfonato de bario [(C6HSNCH6H4-4-SO3)2Ba]

**A.3.10.2.5.14** Almidón (C6H10O5)n

**A.3.10.2.5.15** Ácido acético glacial (C2H4O2).

**A.3.10.2.5.16** Tiosulfato de sodio (Na2S2O3).

**A.3.10.2.5.17 Ácido clorhídrico 1N.** Medir 86 mL de HCl concentrado y llevar a un volumen de 1L con agua.

**A.3.10.2.5.18** Solución de Hipoclorito de calcio o sodio, con certificado

**A.3.10.2.5.19** Permanganato de potasio, solución patrón comercial con certificado de trazabilidad o reactivo para preparar la solución.

**A.3.10.2.5.20 Solución amortiguadora de fosfatos.** Disolver 24 g de Na2HPO4 y 46 g de KH2PO4. Disolver en agua. Pesar 800 mg de EDTA y mezclar con 100 mL de agua y disolver, añadir esta solución a la anterior. Aforar a 1 L con agua y adicionar 20 mg de cloruro de mercurio o 2 gotas de tolueno.

**A.3.10.2.5.21 Solución indicadora de DFD.**

Pesar 1,0 g de oxalato de DFD o 1,5 g de sulfato de DFD pentahidratado o 1,1 g de sulfato anhidro de DFD y diluir en agua libre de cloro que contenga 8 mL de ácido sulfúrico 1:3 y 200 mg de EDTA. Llevar a un volumen de 1 L. Guardar en frasco color ámbar y desechar cuando la solución se decolore.

**Nota**: Periódicamente hacer un blanco con los reactivos anteriores y leer abosrbancia a 515 nm, la cual no debe de exceder 0.02/cm.

**A.3.10.2.5.22 Solución de dicromato de potasio 0,1 N.**

Pesar exactamente 4,904 g de dicromato de potasio y llevar a un volumen de 1 L.

**A.3.10.2.5.23 Solución patrón de sulfato ferroso amónico (SAF).**

Disolver 1,106 g de SAF en agua que contenga 1 mL de solución de ácido sulfúrico 1+ 3 y llevar a 1 L con agua recientemente hervida y enfriada. Esta solución es estable durante un mes.

**A.3.10.2.5.23.1 Valoración de la disolución de SAF.**

En un matraz Erlenmeyer medir 100 mL de la solución de SAF y adicionar 10 mL de ácido sulfúrico (1+ 5), 5 mL de ácido fosfórico y 2 mL de solución indicadora de difenilaminsulfonato de bario. Titular con solución patrón primario de dicromato de potasio 0,100 N hasta la presencia de una coloración violeta persistente durante 30 segundos. Un mL de esta solución equivale a 100 mg de Cl2.

**A.3.10.2.5.24 Solución indicadora de difenilaminsulfonato de bario 0,1%.**

Pesar 0,1 g de difenilaminsulfonato de bario y diluir en 100 mL de agua.

**A.3.10.2.5.25 Solución patrón de tiosulfato de sodio 0,1 N para la titulación de hipoclorito.**

Disolver aproximadamente 25 g de Na2S2O3 en 1 L de agua. Hervir vigorosamente durante 5 minutos y transferir aún caliente a un frasco color ámbar previamente limpiado con mezcla sulfocrómica y enjuagado con agua hervida. Almacenar en refrigeración.

**A.3.10.2.5.25.1 Valoración de la solución de hipoclorito.**

Pesar por quintuplicado de 0,20 a 0,23 g de K2Cr2O7 y colocar en frascos de yodo.

Disolver con 80 mL de agua libre de cloro y adicionar 2 g de KI. Añadir con agitación 20 mL de HCl 1N y colocar inmediatamente en oscuridad durante 10 minutos. Titular con la solución patrón de Na2S2O3, usando solución de almidón como indicador. Titular hasta la desaparición de la coloración azul.

Calcular la normalidad de la solución empleando la siguiente ecuación:

*N=*

Calcular la normalidad promedio de las cinco titulaciones.

**A.3.10.2.5.26 Solución patrón de tiosulfato de sodio 0,025 N.**

A partir de la normalidad calculada anteriormente, medir un volumen adecuado (aproximadamente 25 mL) de solución patrón de tiosulfato de 0,1N. Llevar a un volumen de 100 mL con agua.

**A.3.10.2.5.27 Solución concentrada patrón de cloro de aproximadamente .**

A partir de una solución de hipoclorito comercial (blanqueador casero), la cual contiene aproximadamente de 30,000 a 50,000 mg/mL equivalente a cloro, diluir una cantidad apropiada para tener una concentración aproximada de .

**A.3.10.2.5.27.1 Valoración de la solución de hipoclorito.**

Medir 2 mL de ácido acético y de 10 a 25 mL de agua libre de demanda de cloro en un matraz. Añadir aproximadamente 1 g de KI. Medir una cantidad apropiada de la solución patrón de cloro, tomando en cuenta que 1 mL de la solución titulante de tiosulfato de sodio 0,025 N es equivalente aproximadamente a 0,9 mg de cloro. Mezclar. Titular con solución patrón de tiosulfato de sodio 0,025 N hasta la desaparición del color amarillo. Adicionar de 1 a 2 mL de la solución indicadora de almidón y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul (A). De la misma forma titular un blanco de reactivos, adicionando las mismas cantidades de ácido acético, KI e indicador de almidón a 1 mL de agua (B).

Calcular la concentración de cloro de la solución, aplicando la siguiente ecuación:

 *=*

Dónde:

A= mL gastados de Na2S2O4 0,025 N en la titulación de la muestra.

B= mL gastados de Na2S2O4 0,025 N en la titulación del blanco de reactivos.

N= normalidad calculada para el tiosulfato de sodio (0,025N).

**A.3.10.2.5.28 Solución patrón de cloro de .**

De acuerdo con la concentración calculada para la solución madre de cloro, diluir una cantidad apropiada (aproximadamente 100 mL) a un volumen de 1 L.

**A.3.10.2.5.29 Solución patrón concentrada de permanganato**

**A.3.10.2.5.29.1** Preparar una disolución concentrada que contenga , equivale a 0.0281895 N o diluir una disolución comercial de concentración certificada o titular con oxalato de sodio certificado.

Como la masa molecular del KMnO4 es , su peso equivalente es = 31.60752 g de KMnO4 esta cantidad de KMnO4 disuelta en 1000 mL es una disolución 1N, así es una disolución 0,0281895 N. Si la disolución de KMnO4, no es certificada entonces verificar titulando la disolución de KMnO4 con oxalato de sodio, como se indica a continuación.

**A.3.10.2.5.29.2** En caso de no contar con la disolución comercial:

**A.3.10.2.5.29.2.1 P**esar 1.6 g de KMnO4, disolver y llevar a 1 L, guardar en un frasco color ámbar, dejar reposar una semana, decantar cuidadosamente y filtrar a través de fibra de vidrio.

**A.3.10.2.5.29.2.2 Titulación del KMnO4 patrón.**

Pesar por triplicado cerca de 0.100 mg de oxalato de sodio, grado patrón, Na2C2O4. Agregar 100 mL de H20, disolver, adicionar 10 mL de H2SO4 1+1, perlas de ebullición, calentar rápidamente a ebullición suave y mantener esto durante toda la titulación. Titular rápidamente con la disolución de KMnO4 que se va a estandarizar, hasta que el color rosa marque el final de la reacción, y que el color se mantenga durante al menos 1 minuto. 100 mg de oxalato de sodio consumirán cerca de 30 mL de disolución de KMnO4 0.05 N. Valorar un blanco de agua con H2SO4 1+1.

**A.3.10.2.5.29.2.3** Calcular la normalidad de la disolución de KMnO4 con:

Dónde:

A: mL de KMnO4 gastados por el oxalato de sodio.

B: mL promedio de KMnO4 gastados por el blanco

**A.3.10.2.5.30 disolución patrón de permanganato de potasio (KMnO4) 0.00282 N equivalente a 100.00 mg Cl2/L**. Diluir 10.00 mL de disolución concentrada a 100 mL con agua, esta es la **disolución 1.**

**A.3.10.2.5.31 Disolución patrón de permanganato de potasio (KMnO4) (0.000282 N) equivalente a**  . Diluir 10.00 mL de la disolución 1, a 100 mL con agua, esta es la **disolución 2.**

**A.3.10.2.6 Procedimiento.**

**A.3.10.2.6.1 Preparación de la curva de calibración, con hipoclorito o con permanganato de potasio.**

**A.3.10.2.6.1.1 Curva de calibración con hipoclorito.**

**A.3.10.2.6.1.1.1** Medir los siguientes volúmenes de solución patrón de hipoclorito de acuerdo con la tabla No. 1. Llevar a un volumen de 250 mL con agua libre de demanda de cloro.

**Tabla No. 1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Matraz** | **mL de solución patrón de hipoclorito** |  |
| 1 | 0.00 | Blanco |
| 2 | 1.25 | 0.05 |
| 3 | 2.5 | 0.1 |
| 4 | 5.0 | 0.2 |
| 5 | 10.0 | 0.4 |
| 6 | 20.0 | 0.8 |
| 7 | 50 | 2.0 |
| 8 | 75 | 3.0 |
| 9 | 100 | 4.0 |

**A.3.10.2.6.1.1.2** En matraces Erlenmeyer de 250 mL, medir 5 mL de la solución amortiguadora de fosfatos,
5 mL del reactivo de DFD y agregar 100 mL de cada una de las soluciones patrón. Mezclar perfectamente.

**A.3.10.2.6.1.1.3** Llenar la celda del espectrofotómetro y leer a una longitud de onda de 515 nanómetros. Regresar el contenido de la celda al matraz y titular cada solución patrón valorada de SAF. Calcular la concentración de cloro libre en mg/L para cada solución.

**A.3.10.2.6.1.2 Preparación de la curva de calibración con permanganato de potasio.**

De acuerdo a la tabla siguiente, preparar una serie de patrones de KMnO4 que cubra el intervalo de a , a partir de las disoluciones 1 y 2, llevando a 100 mL con agua. Consultar la bibliografía original.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Matraz número** | **Disolución número** | **mL de la disolución de KMnO4** |  |
| 0 | Ninguna | 0 | 0 |
| 1 | Disolución 2 | 1 | 0.1 |
| 2 | Disolución 2 | 5 | 0.5 |
| 3 | Disolución 1 | 1 | 1 |
| 4 | Disolución 1 | 1.5 | 1.5 |
| 5 | Disolución 1 | 3 | 3 |
| 6 | Disolución 1 | 4 | 4 |

Desarrollar color colocando 0.5 mL de disolución amortiguadora de fosfatos y 0.5 mL de reactivo de DFD indicador en matraz y adicionar 10 mL de cada disolución patrón. Si se usan los reactivos para desarrollo de color combinados comerciales, ajustar el tamaño de muestra, según las instrucciones del proveedor.

En el caso de usar mezcla de reactivos para desarrollo de color comercial, ajustar el tamaño de las porciones de disoluciones patrón de la curva de acuerdo a las instrucciones del proveedor y hacer las mediciones de absorbancia.

**A.3.10.2.7 Tratamiento de la muestra.**

**A.3.10.2.7.1** Colocar en un tubo 0,5 mL de la solución amortiguadora y 0.5 mL de la solución de indicador de DFD. Añadir 10 mL de muestra y mezclar. En caso de usar mezcla de reactivos para desarrollo de color manufacturado seguir las instrucciones para ajustar el tamaño de la muestra y patrones.

**A.3.10.2.7.2** Leer a una longitud de onda de 515 nm.

**A.3.10.2.8 Mediciones en el espectrofotómetro~~.~~**

**A.3.10.2.8.1** Fijar la longitud de onda del equipo a 515 nm de acuerdo con las instrucciones del manual de operación.

**A.3.10.2.8.2** Ajustar el instrumento a 0 de absorbancia con el blanco de soluciones patrón.

**A.3.10.2.8.3** Leer la concentración y registrar la absorbancia.

**A.3.10.2.8.4** Elaborar una curva de calibración graficando la absorbancia para cada solución patrón en función de su concentración (en ).

**A.3.10.2.8.5** Ajustar la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Calcular las constantes A y B obtenidas del ajuste de la curva. Obtener la ecuación de la recta.

**A.3.10.2.8.6** De la misma forma leer las muestras y blanco de muestras. Si la lectura de alguna de las muestras rebasa el intervalo de trabajo, diluir a una concentración adecuada con agua libre de cloro, incluyendo en los cálculos al factor de dilución.

**A.3.10.2.9 Cálculos**

De la ecuación de la recta obtenida.

FD

Dónde:

ABS 515 nm es la absorbancia obtenida en la muestra a 515 nm.

A y B son las constantes obtenidas del ajuste de curva.

**A.3.10.2.10 Expresión de resultados.**

**A.3.10.2.10.1** La expresión de resultados debe ser en

**A.3.11 Métodos para la determinación de Trihalometanos.**

**A.3.11.1 Método de cromatografía de gases con detector de captura de electrones.**

**A.3.11.1.1 Fundamento.**

Este método es aplicable para la determinación de los cuatro trihalomentanos (THMs), cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo que son subproductos de aguas que han sido cloradas. Los trihalometanos (THMs) son extraídos de la muestra con pentano, el extracto obtenido es inyectado en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de captura de electrones para separación y análisis.

**A.3.11.1.2 Interferencias.**

**A.3.11.1.2.1** Impurezas contenidas en el solvente de extracción usualmente provocan problemas analíticos. Es necesario realizar pruebas de extracción del disolvente cuando se note una interferencia en el blanco de reactivos. Un disolvente libre de interferencia se define como el disolvente que contiene una concentración menor de lo que el laboratorio determinó como límite de detección para cada analito. No se deben restar valores del blanco del análisis de la muestra como corrección por contaminación.

**A.3.11.1.2.2** Límites de Detección: El método es útil para trihalometanos y disolventes clorados a concentraciones de aproximadamente 0.1 a 200 µg/L. Los niveles de detección dependen de las características del sistema cromatográfico empleado, la relación disolvente agua, y las interferencias presentes en el disolvente.

**A.3.11.1.3 Equipo.**

**A.3.11.1.3.1** Cromatógrafo de gases, de preferencia con temperatura programable, sistema de enfriamiento del horno de columna e inyector con camisa de cuarzo tipo septum, equipado con detector de captura de electrones.

**A.3.11.1.3.2** Agitador mecánico

**A.3.11.1.3.3** Balanza analítica, capaz de medir +/- 0.01g.

**A.3.11.1.4 Material.**

**A.3.11.1.4.1** Frascos y matraces con tapón de rosca con interior recubierto de PTFE.

**A.3.11.1.4.2** Microjeringas de 1, 10, 25 y 100 µL.

**A.3.11.1.4.3** Jeringas hipodérmicas de vidrio de 10 mL.

**A.3.11.1.4.4** Válvula para jeringa tipo Luer de 2 pasos.

**A.3.11.1.4.5** Matraces volumétricos con tapa de vidrio de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL, clase A.

**A.3.11.1.4.6** Viales de 1.8mL para automuestreador, con tapa de cuerda y septa de TFE o equivalente.

**A.3.11.1.4.7** Columna cromatográfica. Puede emplearse cualquiera de las que a continuación se indican:

**A.3.11.1.4.7.1** Columna Capilar de 0.32 mm de diámetro interno con 30 m de longitud y espesor de película de 1 µm, con fase DB-5 o equivalente, con velocidad lineal de 20 cm/s. Programación de Temperatura: 35°C durante 5 min, rampa de 10°C/min a 70°C, seguido de 20°C/min a 200°C.

**A.3.11.1.4.7.2** Columna capilar megaboro de 0.53 mm de diámetro interno con 30 m de longitud y espesor de película 1.5 µm, con fase de DB-5 o equivalente y velocidad lineal de 25 cm/s. Programación de Temperatura: 30°C durante 1 min, rampa 6°C/min hasta 150°C.

**A.3.11.1.4.7.3** Columna empacada de vidrio de 2 mm de diámetro interno y 2 m de longitud, empacada con 1% SP-1000 en Carbopack B (60/80). Programación de temperatura: 50°C con 60 ml/min de flujo o temperatura programable de 45°C durante 1 minuto y rampa de 8°C/min a 240°C.

**A.3.11.1.4.7.4** Columna empacada de vidrio de 2 mm de diámetro interno y 2 m de longitud, empacada con 10% escualeno en Chromosorb WAW (80/100 malla). Programación de temperatura: 67°C con un flujo de 25 mL/min.

**A.3.11.1.4.7.5** Columna empacada de vidrio de 2 mm de diámetro interno y 3 m de longitud, empacada con 6% OV-11/4% SP-2100 en Supelcoport (100/120 malla). Programación de Temperatura: 45°C durante 12 minutos, rampa de calentamiento de 1°C/min a 70°C con 25 ml/min de flujo en la columna.

**A.3.11.1.5 Reactivos.**

**A.3.11.1.5.1** Pentano grado análisis orgánico de trazas (C5H12).

**A.3.11.1.5.2** Metanol grado análisis orgánico de trazas (CH4O).

A.3.11.1.5.3 Hexano grado análisis orgánico de trazas (C₆H₁₄)

**A.3.11.1.5.4** Carbón activado.

**A.3.11.1.5.5** Agua tipo I

**A.3.11.1.5.6** Helio grado cromatográfico.

**A.3.11.1.5.7** Argón con 5% de metano grado cromatográfico.

**A.3.11.1.5.8** Estándares de calibración, con 96% de pureza o mayor.

**A.3.11.1.5.8.1** Bromoformo (CHBr3).

**A.3.11.1.5.8.2** Bromodiclorometano (CHBrCl2).

**A.3.11.1.5.8.3** Dibromoclorometano (CHBr2Cl).

**A.3.11.1.5.8.4** Cloroformo (CHCl3).

**Precaución:** Los trihalometanos son tóxicos, preparar las soluciones en una campana de extracción y utilizar mascarilla con el filtro apropiado para este tipo de reactivos.

**A.3.11.1.5.9 Estándar Interno**.

**A.3.11.1.5.9.1** 1,2 dibromopropano con pureza del 96 % o mayor.

**A.3.11.1.5.10 Disolución de estándares**

**A.3.11.1.5.10.1** **Disolución de estándares secundarios (THMs)**. A partir de las disoluciones de estándares concentradas, preparar disoluciones multicomponentes en metanol a una concentración adecuada, de tal manera que al preparar las disoluciones acuosas para la curva de calibración, no se utilicen más de 20 µL cuando se preparan volúmenes de 100 mL.

**Nota**: Para la preparación de está disolución metanólica no utilizar un volumen menor de 10 µL.

**A.3.11.1.5.10.2 Disoluciones acuosas de estándares de calibración**. Construir una curva de calibración para cada analito (THMs) con cinco a siete concentraciones. La disolución estándar de menor concentración deberá ser mayor al límite de detección pero muy cercano.

**A.3.11.1.5.10.2.1** Preparar cada una de las mezclas de disoluciones estándar de la curva de calibración inyectando rápidamente el volumen requerido de la disolución estándar metanólica en el matraz volumétrico previamente lleno con agua libre de trihalometanos, sumergiendo la aguja dentro del agua, se recomienda inclinar el matraz mientras se inyecta la mezcla de estándares. Tapar inmediatamente el matraz y mezclar suavemente invirtiendo el matraz únicamente tres veces.

**A.3.11.1.5.10.2.2** Procesar los estándares a través de la extracción del mismo modo que las muestras.

**A.3.11.1.5.10.3 Disolución de Estándar interno.** Preparar la disolución estándar concentrada a partir del estándar puro disolviendo con hexano. A partir de esta disolución, preparar una disolución de 30 µg/L disuelta en pentano.

**A.3.11.1.5.10.4 Estándares de prueba de control de calidad.** Preferentemente emplear una mezcla de cada uno de los THMs disueltos en metanol trazables a NIST o al CENAM, o en su caso preparar una mezcla de disolución estándar independiente (MCI) de las disoluciones concentradas con las que se preparó la curva de calibración a concentraciones cercanas al punto medio de la curva de calibración.

**A.3.11.1.5.11 Agua libre de THMs.** Preparar pasando agua tipo I a través de un filtro conteniendo carbón activado o hirviendo el agua y purgándola con un gas inerte (nitrógeno, argón o helio) a un flujo de 100 mL/min por una 1 h manteniendo la temperatura a 90°C. Transvasar mientras el agua se mantiene caliente a una botella de boca estrecha con tapa de cuerda y con sello de TFE.

**A.3.11.1.6 Procedimiento.**

**A.3.11.1.6.1 Extracción**

**A.3.11.1.6.1.1** Permitir que las muestras y estándares se atemperen. Abrir cada vial y descartar 5 mL de muestra o de la disolución estándar, tapar y pesar, registrar el peso. Como alternativa se puede utilizar una jeringa de 25 mL para tomar la muestra y llevar a cabo las subsecuentes extracciones. Agregar 2 mL de pentano al vial de la muestra, agitar vigorosamente durante un minuto. Permitir que las fases se separen en un tiempo de 2 minutos, si no se separan las fases, centrifugar o transferir la emulsión completa a un vial para enfriarlo debajo de los 4°C para promover la separación de fases, empleando una pipeta de vidrio transferir por lo menos 1 mL de la fase superior de pentano a un vial de extracción, opcionalmente transferir la otra mitad del extracto de pentano a otro vial para su reanálisis en caso necesario. Minimizar el tiempo que permanecen a temperatura ambiente y almacenar los extractos a 4°C.

**A.3.11.1.6.1.2** Vaciar el vial de la muestra, enjuagarlo y secarlo. Pesarlo seco con su tapa original y registrar el peso. Calcular el peso de la muestra original por diferencia (peso del vial con muestra – peso del vial vacío), asumiendo la densidad de 1 g/mL, calcular los mililitros de muestra empleada.

**A.3.11.1.6.1.3** Fortificar muestras adicionando un volumen de la mezcla de estándares de trihalometanos para obtener una concentración dentro del intervalo de trabajo (A.3.11.1.5.10.1). Proceder a realizar la extracción como en los numerales A.3.11.1.6.1.1 y A.3.11.1.6.1.2.

**A.3.11.1.6.2 Análisis de la muestra y estándares**

**A.3.11.1.6.2.1** Antes de la extracción de muestras y estándares, preparar y analizar blancos de reactivos para revisar que estén libres de interferencias.

**A.3.11.1.6.2.2** Una vez que los extractos han sido preparados, Inyectar de 1 a 5 µL del extracto del estándar dependiendo de la configuración del instrumento y de la sensibilidad requerida, calcular la curva de calibración, Inyectar exactamente el mismo volumen del extracto en cada ocasión, preferentemente empleando un automuestreador.

**A.3.11.1.6.2.3** Inyectar duplicados del extracto de una disolución estándar para verificar que los volúmenes de inyección son repetibles, y determinar la desviación estándar. La desviación estándar relativa (%DER) no debe ser mayor del 5%. Si %DER es mayor, usar la calibración con estándar interno.

**A.3.11.1.6.2.3** Después de la calibración, analizar el blanco de reactivos, muestras y muestras de control de calidad. Analizar el estándar de prueba de control de calidad cada 20 muestras y al final de la secuencia analítica. El porciento de recuperación del estándar de prueba de control de calidad debe estar entre el 80 y 120%. Desarrollar el promedio histórico en cartas control de cada analito y emplear el 99% de intervalo de confianza con respecto al histórico como criterio de control de validez de los estándares de prueba de control de calidad.

**A.3.11.1.6.3 Procedimiento de análisis con estándar interno**

**A.3.11.1.6.3.1** Añadir el estándar interno al pentano a la concentración especificada, y continuar con la extracción y análisis de muestras y estándares como se describe en los pasos anteriores.

**A.3.11.1.6.4 Identificación de compuestos**

**A.3.11.1.6.4.1** La identificación de compuestos en la muestra está basada en la comparación de tiempos de retención de los probables componentes con los tiempos de retención de los compuestos en la mezcla de estándares. Empleando el tiempo de retención de los estándares analizados, determinar el valor promedio del tiempo de retención de cada componente y la desviación estándar del tiempo de retención. La ventana del tiempo de retención no puede ser más ancha de 0.25 min (en columnas empacadas) y 0.05 min (en columnas capilares), antes y después del tiempo de retención calculado para los estándares. Cuando el 99% de los límites de confianza son más anchos que el valor nominal, es necesario tomar medidas correctivas.

**A.3.11.1.6.4.2 P**ara la identificación del compuesto puede añadirse el estándar al extracto de la muestra y reanalizar. La presencia de dos picos separados en el extracto confirma que el pico no corresponde al compuesto de interés.

**A.3.11.1.7 Medidas de control de calidad.**

**A.3.11.1.7.1 Blanco de reactivos.**

Preparar y analizar blancos de reactivos en cada turno después de la calibración y antes del análisis de la primera muestra. La concentración de los compuestos en el blanco de reactivos no debe ser mayor al límite de detección determinado, si el blanco de reactivos es mayor, buscar la fuente de contaminación, aplicar acción correctiva, y procesar un nuevo blanco de reactivos. Bajo ninguna circunstancia restar los valores del blanco de reactivos a los resultados de la muestra.

**A.3.11.1.7.2 Estándares de prueba de control de calidad.**

Preferentemente obtener los controles de calidad de una fuente distinta y prepararlos independientes de los estándares de calibración. Analizar los controles de calidad como una muestra cada 20 muestras, y al final de una secuencia analítica. Comparar los resultados de concentración conocida de los estándares de prueba y calcular el porciento de recuperación. El porciento de recuperación debe estar entre el 80 y 120%. Desarrollar cartas control de los promedios de recuperación de los estándares de control de calidad con un 99% de intervalo de confianza para aceptar o rechazar la calibración. Si los límites de confianza son mayores a los normales, investigar los estándares, su preparación y su almacenaje o alguna otra fuente potencial de error.

**A.3.11.1.7.3 Sensibilidad del detector**

Mantener el registro de la respuesta del detector para cada analito (THMs) en valores de área o altura, empleando una disolución estándar a una concentración que se encuentre dentro del intervalo de trabajo y que es analizada cada que se lleva a cabo el análisis de muestras. Graficar estos datos para observar tendencias en la sensibilidad del detector. Reparar o reemplazar el detector cuando las cantidades mínimas detectables son alteradas por pérdida de la sensibilidad.

**A.3.11.1.7.4 Muestras fortificadas con concentraciones conocidas.**

Extraer y analizar una muestra fortificada cada diez muestras. Si el laboratorio analiza menos de 10 muestras diarias, cada vez que se realiza una extracción, extraer y analizar una muestra adicionada.

**A.3.11.1.7.5 Análisis duplicado**

Extraer y analizar por duplicado el 10 % de todas las muestras, manteniendo una base de datos actualizada de las muestras fortificadas y muestras duplicadas, revisando los resultados para evaluar la necesidad de revisar el proceso completo.

**A.3.11.1.7.6 Estándar de control del laboratorio**

Trimestralmente, a una muestra de agua libre de compuestos orgánicos, añadir un volumen de una disolución estándar certificada. Extraer y analizar, los resultados de esta muestra deben estar dentro del 20% del valor real de cada compuesto. De no ser así, revisar cada paso de la preparación y análisis para identificar el problema. **A.3.11.1.8 Cálculos**

**A.3.11.1.8.1 Procedimiento con estándar externo**

**A.3.11.1.8.1.1** Emplear este procedimiento solo si el volumen de la inyección puede mantenerse constante. Calcular individualmente los factores de respuesta (FR) para cada estándar analizado de la siguiente manera:

FR = Cantidad de compuesto extraído (µg)/Respuesta (área del pico o altura del pico)

Calcular la cantidad de compuesto para cada estándar:

WS **=** VS X CS

Donde

WScantidad del compuesto, µg

VS Volumen del estándar extraído, L

CS Concentración del estándar preparado en µg/L

**A.3.11.1.8.1.2** Para cada componente determinar el promedio del factor de respuesta (FR) y la desviación estándar de los factores de respuesta empleando todos los estándares de calibración analizados. Si el porciento de la desviación estándar relativa (%DER) es menos del 10%, se puede emplear el FR promedio para calcular la concentración de la muestra.

%DER = (SD/promedio FR) X 100

Donde

SD= Desviación estándar

FR= Factor de respuesta

**A.3.11.1.8.1.3** Si él %DER es mayor del 10%, graficar la curva de calibración de cantidad inyectada contra respuesta, emplear la gráfica para determinar la cantidad del componente presente en cada muestra. Después determinar la concentración dividiendo la cantidad, µg, por el volumen en L, de muestra extraída. Opcionalmente emplear el sistema de datos para preparar una regresión lineal y emplear la ecuación para calcular la cantidad de los componentes a partir de los valores de respuesta.

Cuando se emplee el valor promedio del FR, calcular la concentración como sigue:

Donde

CX es la concentración del compuesto en mg/L

RXRespuesta de la muestra (mm, área, etc)

VXVolumen de la muestra extraída en L

**A.3.11.1.8.2 Procedimiento de estándar interno**.

**A.3.11.1.8.2.1** Para todos los análisis hechos en una secuencia analítica, determinar el promedio y la desviación estándar de la respuesta del estándar interno. Calcular el porciento de la desviación estándar relativa (%DER), si él %DER es mayor del 25%, tomar acciones correctivas para mejorar la precisión del método. Establecer un intervalo de confianza de 99% para la respuesta del estándar interno usando el promedio calculado y la desviación estándar del análisis de la muestras. Rechazar los análisis cuando la respuesta del estándar interno está fuera de los límites y volver a analizar. Después del análisis de los estándares de calibración, calcular los factores de respuesta relativos (FRR) individuales de cada analito en cada estándar de la siguiente manera:

Donde

Rs, Ri Son las respuestas del estándar de calibración y del estándar interno respectivamente.

Cs, Ci son las concentraciones del analito en los estándares de calibración y del estándar interno respectivamente.

**A.3.11.1.8.2.2** Calcular el promedio de los FRR de cada analito, las desviaciones estándar de los FRR y %DER. Si él %DER es menor del 10%, utilizar el valor promedio del FRR; si es mayor, graficar la curva de calibración o la ecuación de regresión lineal como se describe en el procedimiento de estándar externo (A.3.11.1.8.1.3)**.**

**A.3.11.1.8.2.3** Cuando se utilice el promedio de los FRR del estándar interno**, c**alcular la concentración de las muestras con la ecuación siguiente:

Donde

Cxes la concentración del analito en la muestra en mg/L

Rxes la respuesta de la muestra

Ci es la concentración del estándar interno

Ri es la respuesta del estándar interno

**A.3.11.1.9 Informe de Resultados:**

**A.3.11.1.9.1** Reportar cada uno de los trihalometanos (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) en mg/L.

**A.3.11.2 Método para la determinación de trihalometanos por cromatografía de gases con purga y trampa, con detector espectrométrico de Masas**

**A.3.11.2.1 Fundamento.**

Los compuestos volátiles orgánicos son transferidos eficientemente de la fase acuosa a la fase gaseosa mediante burbujeo de un gas inerte (helio o nitrógeno), a través de una muestra de agua contenida en una cámara de purga especialmente diseñada a temperatura ambiente. El vapor es arrastrado a través de una trampa de sorbente que adsorbe los analitos de interés. Después de que se completa la purga, la trampa se calienta para desorber los compuestos y con el mismo gas inerte son introducidos en la columna cromatográfica. El cromatógrafo de gases se programa a una temperatura para separar los compuestos.

Este método es aplicable para la determinación de un amplio intervalo de compuestos purgables orgánicos. El método se puede extender para incluir otros compuestos orgánicos volátiles, siempre que se cumplan todos los criterios de desempeño.

**A.3.11.2.2 Interferencias.**

**A.3.11.2.2.1** Tomar en consideración las impurezas en el gas de purga y compuestos orgánicos de desgasificación. También puede ser ocasionada por la contaminación del equipo y de la tubería de la trampa. Demostrar que el sistema está libre de contaminación bajo condiciones de operación analizando los blancos de reactivos diariamente.

**Nota**: Utilizar blancos sólo para monitorear; son inaceptables las correcciones por valores de blancos. En el sistema de purga y trampa evitar usar tubería de plástico y selladores de rosca que no sean de PTFE, o controladores de flujo con componentes de caucho. Asegurarse que el área analítica no es fuente de contaminación por disolventes de laboratorio particularmente de cloruro de metileno y de metil terbutil éter (MtBe).

**A.3.11.2.2.2** Las muestras pueden contaminarse mediante la difusión de volátiles orgánicos (particularmente fluorocarbonos y cloruro de metileno) a través del sello de la septa durante el envío y almacenamiento. Utilizar un blanco de reactivos preparado a partir de agua y llevado a través de la toma de muestras, manipulación y procedimientos de envío como un control de este tipo de contaminación.

**A.3.11.2.2.3** La contaminación por arrastre puede ocurrir siempre que se analiza una muestra con concentraciones altas del o los analitos e inmediatamente después se analiza una muestra con concentraciones bajas. Para reducir el arrastre enjuagar el dispositivo de purga y la jeringa de inyección de muestra con agua entre muestra y muestra. Después del análisis de una muestra de concentración alta, analizar un blanco de reactivos para verificar que esté libre de contaminación. Para muestras que contienen cantidades de materiales solubles en agua, sólidos suspendidos, compuestos con alto punto de ebullición o altos niveles de compuestos volátiles, entre análisis lavar el dispositivo de purga con una solución detergente, enjuagar con agua destilada y secar en un horno a 105 °C. La trampa y otras partes del sistema también son objeto de contaminación, por lo tanto frecuentemente purgar todo el sistema.

**A.3.11.2.3 Seguridad.**

**A.3.11.2.3.1** La toxicidad o carcinogenicidad de todos los reactivos no se han determinado con precisión. Sin embargo, todas las sustancias deben ser tratadas como potencial peligroso para la salud, por lo que al manipular las disoluciones estándar, los analistas deberán realizarlo bajo campana y utilizar respiradores con filtros especiales para gases tóxicos además del vestuario básico (bata y guantes). Estos materiales estándar puros y las disoluciones preparadas deberán almacenarse en la campana de extracción*.*

**A.3.11.2.4** **Equipos.**

**A.3.11.2.4.1** Sistema de purga y trampa: El sistema de purga y trampa consiste en un dispositivo de purga, trampa y un desorbedor. Existen Muchos sistemas completos disponibles comercialmente.

**A.3.11.2.4.1.1** Dispositivo de purga, diseñado para aceptar muestras de 5 o 25 mL con una columna de agua de al menos 3 cm de profundidad. El espacio de cabeza (headspace) gaseoso entre la columna de agua y la trampa debe tener un volumen total de menos de 15 mL. El gas de purga debe pasar a través de la columna de agua en forma de burbujas finamente divididas con un diámetro menor de 3 mm. Introducir el gas de purga no más de 5 mm de la base de la columna de agua. El dispositivo de purga ilustrado en la figura A.3.11.2-1 cumple estos criterios. Se pueden utilizar otros tipos de dispositivos de purga siempre y cuando se demuestre que su desempeño es adecuado.

**Figura A.3.11.2-1 Dispositivo de purga**



**A.3.11.2.4.1.2** Trampa de al menos 25 cm de largo y con un diámetro interno de al menos 3 mm, empacado con las siguientes longitudes mínimas de adsorbentes: 1.0 cm de empaque de metil silicona, 7.7 cm del polímero 2,6-difenilo óxido, 7.7 cm de sílica gel y 7.7 cm de carbón de coco. Si no se analizan compuestos fluorocarbonados se puede eliminar el carbón e incrementar la sección del polímero hasta 15 cm. Se pueden utilizar sorbentes alternativos que cumplan con todos los criterios de calidad. Existen trampas de sorbentes disponibles comercialmente. Las especificaciones mínimas para la trampa se ilustran en la figura A.3.11.2-2.

**Figura A.3.11.2-2 Especificaciones mínimas de la trampa**

**A.3.11.2.4.1.2.1 Materiales de empaque para la trampa.**

**A.3.11.2.4.1.2.1.1** Se recomienda el empaque de metil silicona pero puede utilizarse otro tipo de empaque (ver A.3.11.2.6.2). El empaque protege el polímero de óxido de difenilo de aerosoles, protege cualquier sitio activo que pudiera desarrollarse durante el proceso de calentamiento y asegura que el polímero esté totalmente adjunto dentro de la zona de calentamiento de la trampa, en consecuencia se eliminan los sitios fríos potenciales. Alternativamente, se puede utilizar lana de vidrio silanizada como espaciador en la entrada de la trampa.

**A.3.11.2.4.2 Cromatógrafo de gases (CG) con detector de espectrometría de masas (MS).**

**A.3.11.2.4.2.1** Utilizar un CG con temperatura programable adecuado para la inyección sin división (splitless), con interface apropiada o interface de inyección directa (split).

**A.3.11.2.4.2.2** Espectrómetro de masas (MS), capaz de escanear de 35 a 300 uma cada 2 s o menos, utilizando 70 eV (nominal) de energía en modo de ionización de impacto electrónico (ElMS), debe ser capaz de producir un espectro de masas que cumpla con todos los criterios de la tabla A.3.11.2-3 cuando se introducen en el CG, 25 ng o menos de 4-bromofluorobenceno (BFB). Para asegurar la precisión suficiente, la velocidad de barrido deseada debe permitir la adquisición de al menos cinco espectros mientras que el componente de una muestra eluye del CG.

**Tabla A.3.11.2-3 Criterios de Abundancia (m/z) del BFB**

|  |  |
| --- | --- |
| **Masa** | **Criterios de abundancia m/z** |
| 50 | 15 a 40 % de masa 95 |
| 75 | 30 a 60 % de masa 95 |
| 95 | Pico base, de masa 95 |
| 96 | 5 a 9 % de masa 95 |
| 173 | <2 % de masa 174 |
| 174 | >50 % de masa 95 |
| 175 | 5 a 9 % de masa 174 |
| 176 | 95 a 101 % de masa 174 |
| 177 | 5 a 9 % de masa 176 |

**A.3.11.2.4.2.3** Interface del CG/MS: Utilizar una interface de acoplamiento directo de la columna dentro del MS, las columnas generalmente utilizadas tienen un diámetro interno de 0.25 a 0.32 mm.

**A.3.11.2.4.2.3.1** Para columnas de 0.53 mm, utilizar un separador de chorro, que incluye una línea de transferencia de todo el vidrio y dispositivo de vidrio de enriquecimiento o interface de división (Split).

**Nota:** Desactivar todos los componentes de vidrio con agente silanizante diclorodimetilsilano.

**A.3.11.2.4.2.3.2** Esta interface es necesaria cuando se utiliza refrigeración criogénica, la cual condensa los componentes desorbidos, sobre una banda estrecha de la pre-columna de sílice fundida no recubierta. Cuando la interface se calienta rápidamente, la muestra es transferida a la columna analítica capilar. Durante la etapa de crioconservación, la temperatura de la sílice fundida en la interface se mantiene a -150ºC bajo una corriente de nitrógeno líquido. Después del periodo de desorción, la interface debe ser capaz de calentarse rápidamente (en 15 s o menos) a 250° C para completar la transferencia de los analitos.

**A.3.11.2.4.4** Sistema de datos: Conectar al espectrómetro de masas una computadora que permita la adquisición y almacenamiento de todas las masas del espectro obtenido a través del programa cromatográfico. El software debe permitir la búsqueda de todos los espectros adquiridos para las masas (m/z) de los iones específicos y graficar las abundancias de tales m/z en función del tiempo o número de scan. Este tipo de gráfico es definido como el perfil de corriente de iones extraídos (EICP). El software también debe permitir la integración de las abundancias de cualquier EICP sobre un tiempo específico o un límite de scan.

**A.3.11.2.5 Material.**

**A.3.11.2.5.1** Jeringas de 0.5, 1.0, 5, y 25 mL de vidrio hipodérmico con punta desmontable.

**A.3.11.2.5.2** Válvulas de jeringa, bilateral, con punta desechable.

**A.3.11.2.5.3** Microjeringas de 10, 25, y 100 µL con 5 cm x 0.15 mm de diámetro interno (ID), el calibre de la aguja de 20, con una longitud suficiente para introducir la jeringa hasta 1 cm dentro del frit de vidrio del dispositivo de purga.

**A.3.11.2.5.4** Envases de 40 mL con tapón de rosca recubierto con PTFE

**A.3.11.2.5.5** Columnas capilares: usar cualquier columna capilar de CG que cumpla con los criterios de desempeño. Asegurarse que el flujo del desorbente sea compatible con la columna elegida. Abajo se enlistan cuatro ejemplos de columnas aceptables.

**A.3.11.2.5.5.1** Columna 1: de 60 m de longitud x 0.75 mm ID VOCOL de amplio calibre, con 1.5 µm de espesor de película.

**A.3.11.2.5.5.2** Columna 2: de 30 m de longitud x 0.53 mm ID DB-624, mega calibre, con 3 µm de espesor de película.

**A.3.11.2.5.5.3** Columna 3: de 30 m de longitud x 0.32 mm ID DB-5, con 1 µm de espesor de película.

**A.3.11.2.5.5.4** Columna 4: de 30 m de longitud x 0.25 mm ID DB-624, con 1.4 µm de espesor de película.

**A.3.11.2.6 Reactivos.**

**A.3.11.2.6.1** Agua Tipo I

**A.3.11.2.6.1.1** Agua libre de THMs**.** Preparar pasando agua tipo I a través de un filtro conteniendo carbón activado o hirviendo el agua y purgándola con un gas inerte (nitrógeno, argón o helio) a un flujo de 100 mL/min por una 1 h manteniendo la temperatura a 90°C. Transvasar mientras el agua se mantiene caliente a una botella de boca estrecha con tapa de cuerda y con sello de TFE.

**A.3.11.2.6.2** Materiales del **e**mpaque de la trampa:

**A.3.11.2.4.1.2.1.1** Polímero 2,6-difenilo óxido-de malla 60/80, grado cromatográfico.

**A.3.11.2.4.1.2.1.2** Empaque de metil-silicona-OV-1 (3%) en chromosorb-W, con malla 60/80 o equivalente.

**A.3.11.2.4.1.2.1.3** Sílica gel de malla 35/60, grado 15 o equivalente.

**A.3.11.2.4.1.2.1.4** Carbón de coco pasado a través de malla 26.

**A.3.11.2.6.3** Metanol libre de THMs.

**A.3.11.2.6.4** Ácido clorhídrico concentrado, HCl, grado reactivo ACS o equivalente.

**A.3.11.2.6.4.1** Ácido clorhídrico1:1 v/v, adicionar cuidadosamente un volumen medido de HCl a un volumen igual de agua libre de THMs.

**A.3.11.2.6.5** Helio o nitrógeno de alta pureza

**A.3.11.2.6.6** Nitrógeno líquido (en caso necesario)

**A.3.11.2.6.7 Disoluciones estándar.**

**A.3.11.2.6.7.1 Disoluciones estándar concentradas de THMs (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo).** Preparar de materiales estándar puros o de disoluciones certificadas. Preparar las disoluciones estándar en metanol. Colocar aproximadamente 9.8 mL de metanol en un matraz volumétrico de 10 mL que ha sido tarado incluyendo el tapón. Dejar reposar el matraz sin tapar, durante unos 10 minutos o hasta que todos las superficies humedecidas con alcohol se hayan secado. Pesar el matraz con una precisión de 0.1 mg.

**A.3.11.2.6.7.1.2** Adicionar los materiales de referencia como se indica adelante:

**A.3.11.2.6.7.1.3** Para líquidos: usando una jeringa de 100 µL o una pipeta de vidrio con punta capilar desechable, inmediatamente adicionar dos o más gotas del material de referencia en el matraz. Asegurarse de que las gotas caigan directamente en el alcohol sin tocar el cuello del matraz. Después volver a pesar el matraz, llevar a volumen, tapar y agitar invirtiéndolo varias veces. Calcular la concentración en µg/L de ganancia neta en el pesaje.

**A.3.11.2.6.7.1.4** Para gases halocarbonados: que tienen punto de ebullición por debajo de 30 °C (bromometano, cloroetano, clorometano, diclorofluorometano, triclorofluorometano y cloruro de vinilo), Llenar una jeringa con el estándar puro hasta la marca, insertar la aguja de la jeringa dentro del matraz hasta 5 mm por encima del menisco del metanol, lentamente introducir el gas dentro de la superficie. El gas se disolverá en el metanol. Volver a pesar el matraz, llevar a volumen, tapar y agitar invirtiéndolo varias veces. Calcular la concentración en µg/L de ganancia neta en el pesaje.

**A.3.11.2.6.7.1.5** Cuando la pureza de un compuesto es ≥ 96 %, calcular la concentración de la disolución sin considerar la pureza para el cálculo. Preferentemente usar estándares preparados comercialmente certificados por el fabricante o una fuente independiente.

**A.3.11.2.6.7.1.6** Transferir la disolución estándar a un envase con tapón de rosca recubierto con PTFE. Almacenar con un mínimo espacio de cabeza (headspace) y protegido de la luz a una temperatura ≤ 6 °C.

**A.3.11.2.6.8 Disoluciones estándares de trabajo.**

**A.3.11.2.6.8.1 Disolución estándar de THMs:** A partir de las disoluciones de estándares concentradas, preparar disoluciones multicomponentes en metanol a una concentración adecuada, de tal manera que al preparar las disoluciones acuosas para la curva de calibración, no se utilicen más de 20 µL cuando se preparan volúmenes de 100 mL.

**Nota**: Para la preparación de está disolución metanólica no utilizar un volumen menor de 10 µL.

**A.3.11.2.6.8.2 Disolución estándar interno/estándar subrogado,** Preparar una disolución que contenga fluorobenceno (estándar interno) y 1,2-diclorobenceno-d4 (estándar subrogado) en metanol, a una concentración de 5 µg/mL de cada compuesto.

**A.3.11.2.6.8.2.1** Otros compuestos subrogados recomendados son: 4-bromofluorobenceno, 1,4-difluorobenceno, 1,2-dicloroeteno-d4 y tolueno-d8, pueden utilizarse otros compuestos dependiendo de los requerimientos del análisis y de los analitos que se requieren cuantificar.

**A.3.11.2.6.8.2.2** Otros estándares internos recomendados son el clorobenceno-d5 y el 1,4-diclorobenceno-d4, se pueden utilizar otros compuestos siempre y cuando tengan tiempos de retención similares a los analitos detectados.

**A.3.11.2.6.8.3** **Disoluciones acuosas de estándares de calibración**. Construir una curva de calibración para cada analito (THMs) con cinco a siete concentraciones. La disolución estándar de menor concentración deberá ser mayor al límite de detección pero muy cercano.

**A.3.11.2.6.8.3**.1 Preparar cada una de las mezclas de disoluciones estándar de la curva de calibración inyectando rápidamente el volumen requerido de la disolución estándar metanólica (mezcla de estándares de THMs, ver A.3.11.2.6.8.1) en el matraz volumétrico previamente lleno con agua libre de THMs, sumergiendo la aguja dentro del agua, se recomienda inclinar el matraz mientras se inyecta la mezcla de estándares. Posteriormente adicionar a cada matraz 5.0 µL de la mezcla de estándar interno y estándar subrogado de 5 µg/L cada uno (ver A.3.11.2.6.8.2)por cada 25 mL de disolución estándar de calibración preparada, para obtener una concentración equivalente a 1.0 µg/L. Tapar inmediatamente los matraces y mezclar suavemente invirtiéndolos únicamente tres veces.

**A.3.11.2.7 Control de calidad**

**A.3.11.2.7.1** Antes del análisis de las muestras leer un blanco para demostrar que todas las partes del equipo en contacto con la muestra y los reactivos están libres de interferencias.

**A.3.11.2.7.2** Los blancos de reactivos, muestras fortificadas y replicados deben someterse a los mismos procedimientos analíticos que los utilizados en las muestras.

**A.3.11.2.7.3** El laboratorio debe demostrar la competencia inicial y mantener los registros de esto.

**A.3.11.2.7.4** Durante el análisis de rutina, se deben analizar blancos de reactivos, muestras fortificadas y duplicados de muestras. Se deben agregar subrogados a las muestras y a la muestras de control de calidad.

**A.3.11.2.7.5** Siempre que sea posible, el laboratorio debe analizar materiales de referencia certificados y participar en estudios pruebas de aptitud.

**A.3.11.2.7.6** El laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad para asegurarse de que la integridad de la muestra no se vea comprometida durante el proceso de recolección y manipulación de las muestras, por ejemplo, asegurándose que las tapas y septas de los viales no presenten fugas.

**A.3.11.2.8 Procedimiento.**

**A.3.11.2.8.1 Optimización del CG/MS.** Cargar el instrumento con los parámetros de funcionamiento adecuados de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

**A.3.11.2.8.1.1** La tabla A.3.11.2-4 proporciona condiciones de operación recomendadas para el cromatógrafo de gases y los tiempos de retención y LDMs. que se pueden lograr bajo estas condiciones.

**Tabla** **A.3.11.2-4. Límites de detección obtenidas con las condiciones de operación recomendadas**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Analito | Tiempo de Retención (min) | LDMs (µg/L) | Ion primario (m/z) |
| Cloroformo | 7.00 | 0.126 | 83 |
| Bromodiclorometano | 10.47 | 0.112 | 83 |
| Dibromoclorometano | 13.24 | 0.133 | 129 |
| Bromoformo | 15.60 | 0.131 | 173 |

Condiciones CG: Columna: J&W DB-624, 30 m, 0.25 mm ID, 1.4 µm película; Programa de temperatura: 35 °C, 4 min; 4 °C/min; 50 °C, 0 min; 10 °C/min; 175 °C, 4 min

**A.3.11.2.8.1.2** Un ejemplo de las separaciones obtenidas con la columna especificada se muestra en el cromatograma siguiente (figura A.3.11.2-5**).**  Pueden utilizarse otras columnas cromatográficas o condiciones diferentes si se cumplen los criterios de control de calidad.

**Figura A.3.11.2-5 Cromatograma CG/MS.**



Columna: J&W DB-624, 30 m, 0.25 mm ID, 1.4 µm de película; Programa de temperatura: 35 °C, 4 min; 4 °C/min; 50 °C, 0 min; 10 °C/min; 175 °C, 4 min

**A.3.11.2.8.2 Prueba de desempeño**.

**A.3.11.2.8.2.1** Cada laboratorio debe desarrollar los criterios de desempeño requeridos para la aplicación de este método de prueba.

**A.3.11.2.8.2.2** Al comienzo de cada periodo de 12 horas de análisis y antes del análisis de blancos, estándares y muestras verificar el sistema CG/MS inyectando 25 ng de 4-bromofluorobenceno (BFB) directamente en la columna del cromatógrafo. Si se dificulta la inyección directa, adicionar 1 µL de disolución de BFB de 25 µg/mL a 25 mL de agua en una jeringa utilizada para transferir muestras para dispositivos de purga y analizar como una muestra. Obtener un espectro de masas de corrección de fondo y confirmar que se cumplen los criterios de abundancia m/z descritos en la tabla A.3.11.2-3. Si no se cumplen todos los criterios, repetir la prueba hasta que se cumplan los criterios. Las pruebas de desempeño requieren los siguientes parámetros del instrumento:

* Energía de electrón: 70 eV (nominal)
* Intervalo de masas: 35 a 300 uma
* Tiempo de scan: al menos 5 scan/pico pero no más de 2s/scan.

**A.3.11.2.8.2.3** Antes del uso inicial, acondicionar la trampa toda la noche a 180 °C o de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pasar un gas inerte a un flujo mínimo de 20 mL/min en dirección inversa. Ventilar el efluente de la trampa a una campana, no a la columna analítica.

**A.3.11.2.8.2.4** Antes del uso diario, acondicionar la trampa por 10 minutos a 180 °C pasando el gas inerte en dirección inversa. La trampa puede ser ventilada a la columna analítica durante el acondicionamiento diario; sin embargo, la columna debe ser corrida a través del programa de temperatura antes del análisis de las muestras.

**A.3.11.2.8.2.5** Conectar el dispositivo de purga y trampa al Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas.

**A.3.11.2.8.3 Calibración del sistema**

**A.3.11.2.8.3.1** Preparar las disoluciones finales conteniendo las concentraciones requeridas de estándares (de cada THM) de calibración, incluyendo subrogados y/o estándares internos (ver A.3.11.2.6.8.3), y transferir 5 mL al dispositivo de purga utilizando el automuestreador, o manualmente utilizando una jeringa. Si los volúmenes de muestra son mayores de 5 mL, por ejemplo muestras de 25 mL, entonces los volúmenes de los estándares de calibración deben ser los mismos.

**A.3.11.2.8.3.2 Procedimiento de calibración con estándar externo**

**A.3.11.2.8.3.2.1** Emplear este procedimiento solo si el volumen de la inyección puede mantenerse constante. Analizar cada concentración de la curva de calibración**.** Calcular individualmente los factores de respuesta (FR) para cada estándar analizado de la siguiente manera:

FR = Cantidad de compuesto extraído (µg)/Respuesta (área del pico o altura del pico)

Calcular la cantidad de compuesto para cada estándar:

WS **=** VS X CS

Donde

WScantidad del compuesto, µg

VS Volumen del estándar extraído, L

CS Concentración del estándar preparado en µg/L

**A.3.11.2.8.3.2.2** Para cada componente determinar el promedio del factor de respuesta (FR) y la desviación estándar de los factores de respuesta empleando todos los estándares de calibración analizados. Si el porciento de la desviación estándar relativa (%DER) es menos del 20 %, se puede emplear el FR promedio para calcular la concentración de la muestra.

%DER = (DE/promedio FR) X 100

Donde

DE= Desviación estándar

FR= Factor de respuesta

**A.3.11.2.8.3.2.3** Si él %DER es mayor del 20 %, graficar la curva de calibración de cantidad inyectada contra respuesta, emplear la gráfica para determinar la cantidad del componente presente en cada muestra. Después determinar la concentración dividiendo la cantidad, µg, por el volumen en L, de muestra extraída. Opcionalmente emplear el sistema de datos para realizar una regresión lineal y emplear la ecuación para calcular la cantidad de los componentes a partir de los valores de respuesta.

Cuando se emplee el valor promedio del FR, calcular la concentración como sigue:

Donde

CX es la concentración del compuesto en mg/L

RXRespuesta de la muestra (mm, área, etc)

VXVolumen de la muestra extraída en L

**A.3.11.2.8.3.3 Procedimiento de calibración con estándar interno**. Emplear este procedimiento cuando el volumen de la inyección no se mantiene constante.

**A.3.11.2.8.3.3.1** Analizar cada concentración de la curva de calibración. Para todos los análisis hechos en una secuencia analítica, determinar el promedio y la desviación estándar de la respuesta del estándar interno. Calcular el porciento de la desviación estándar relativa (%DER), si él %DER es mayor del 20%, tomar acciones correctivas para mejorar la precisión del método. Establecer un intervalo de confianza de 99% para la respuesta del estándar interno usando el promedio calculado y la desviación estándar del análisis de la muestras. Rechazar los análisis cuando la respuesta del estándar interno está fuera de los límites y volver a analizar. Después del análisis de los estándares de calibración, calcular los factores de respuesta relativos (FRR) individuales de cada analito en cada estándar de la siguiente manera:

Donde

Rs, Ri Son las respuestas del estándar de calibración y del estándar interno respectivamente.

Cs, Ci son las concentraciones del analito en los estándares de calibración y del estándar interno respectivamente.

**A.3.11.2.8.3.3.2** Calcular el promedio de los FRR de cada analito, las desviaciones estándar de los FRR y %DER. Si él %DER es menor del 20%, utilizar el valor promedio del FRR; si es mayor, graficar la curva de calibración o la ecuación de regresión lineal como se describe en el procedimiento de estándar externo.

**A.3.11.2.8.3.3.3** Cuando se utilice el promedio de los FRR del estándar interno**, c**alcular la concentración de las muestras con la ecuación siguiente:

Donde

Cxes la concentración del analito en la muestra en mg/L

Rxes la respuesta de la muestra

Ci es la concentración del estándar interno

Ri es la respuesta del estándar interno

**A.3.11.2.8.4 Análisis de la muestra.**

**A.3.11.2.8.4.1** Las muestras deben almacenarse en viales con tapa con un espacio mínimo de cabeza, a 4 °C o menos y en un área libre de disolventes orgánicos. El tamaño de alguna burbuja formada durante el enfriamiento de la muestra no debe ser mayor de 5-6 mm, cuando se observe alguna burbuja en el vial se debe revisar que éste no presente fuga, de ser así la muestra debe descartarse. Todas las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible, después de haber sido recolectadas, generalmente en un máximo de 14 días después de la recolección.

**A.3.11.2.8.4.2** Poner a temperatura ambiente la muestra y transferir 5 mL al dispositivo de purga utilizando el automuestreador, o manualmente utilizando una jeringa. Si los volúmenes de muestra son mayores de 5 mL, por ejemplo muestras de 25 mL, entonces los volúmenes de los estándares de calibración deben ser los mismos.

**A.3.11.2.8.4.3** Para tomar la alícuota de la muestra que será inyectada en el sistema de purga, utilizar una jeringa con válvula de cierre. Retirar el émbolo de la jeringa y cerrar la válvula. Abrir el envase de la muestra y cuidadosamente colocar la muestra dentro del barril de la jeringa. Colocar nuevamente el émbolo de la jeringa y antes de presionar el émbolo, invertir la jeringa y abrir la válvula, posteriormente presionar el émbolo para eliminar el aire y ajustar el volumen de la muestra a 25 mL.

Si hay muestra suficiente disponible, utilizar otra jeringa para tomar una segunda alícuota, para su análisis por duplicado (una vez que la tapa de la muestra se ha removido, la muestra no se puede almacenar, debido al espacio de cabeza (headspace).

**A.3.11.2.8.4.4** Adicionar una cantidad apropiada de la mezcla de los estándares subrogado y estándar interno (ver A.3.11.2.6.8.2) a través del orificio de la válvula y cerrarla. Unir con el dispositivo de purga, abrir las válvulas e inyectar la muestra en el recipiente de purga. Cerrar las válvulas y purgar la muestra por 11 minutos a temperatura ambiente a un flujo de 40 mL/min (helio o nitrógeno). Si el vapor de agua causa problemas en el espectrómetro de masas, utilizar una purga seca de 3 minutos y/o a módulo de control de humedad.

**A.3.11.2.8.4.5** Absorber los materiales atrapados en la cabeza de la columna cromatográfica a 180 °C mientras pasa el gas inerte a un flujo compatible con la columna de elección y comenzar un programa de temperatura en el CG.

**A.3.11.2.8.4.6** Establecer el sistema de auto-drenaje para la cámara de purga vacío mientras la trampa está siendo absorbido dentro del CG, o alternativamente, utilizar una jeringa de muestra para vaciar el recipiente. Lavar la cámara con dos enjuagues de 25 mL de agua si las muestras que se están analizando están altamente contaminadas. Asegurarse que todas las áreas humedecidas durante la purga están también humedecidas durante el enjuague para maximizar el enjuague.

**A.3.11.2.8.4.7** Reacondicionar la trampa en el horno a la temperatura de acuerdo a lo que recomienda el fabricante por 5 a 7 minutos. Dejar que la trampa se enfríe a temperatura ambiente antes de introducir la siguiente muestra en el recipiente de purga. Cuando todos los compuestos de la muestra han sido eluidos de la columna cromatográfica, terminar la adquisición de datos y guardar los archivos. Usar un software que muestre el rango completo de los espectros de masas y un apropiado EICP. Si la abundancia de un ion excede el sistema del intervalo de trabajo, diluir la muestra en una segunda jeringa con agua y analizar.

**Nota:** Tener cuidado con la muestra porque los compuestos pueden ser volátiles y se pueden perder si se reabre la muestra. Estimar la dilución necesaria y expulsar el exceso de muestra de la segunda jeringa, inyectar esa porción en un recipiente de purga y con una segunda jeringa, adicionar el agua necesaria para tener un total de 25 mL en el recipiente de purga.

**A.3.11.2.9 Cálculos.**

**A.3.11.2.9.1** Una vez que los compuestos han sido identificados, la cuantificación de dicho compuestos se basa en la abundancia del área integrada del ion característico primario (EICP), el estándar interno utilizado debería tener el tiempo de retención muy cercano al analito de interés.

**A.3.11.2.9.2** Si el volumen de la inyección puede mantenerse constante, determinar la concentración de cada uno de los analitos en la muestra utilizando el procedimiento de estándar externo como se indica en el numeral A.3.11.2.8.4.3.2**.**

**A.3.11.2.9.3** Si el volumen de la inyección no se mantiene constante determinar la concentración de cada uno de los analitos en la muestra utilizando el procedimiento de estándar interno como se indica en el numeral A.3.11.2.8.4.3.2**.**

**A.3.11.2.10 Informe de prueba.**

**A.3.11.1.10.1** Reportar cada uno de los THMs (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) en mg/L.

**A.3.14 Métodos de prueba para la determinación de cianuros.**

**A.3.14.1 Seguridad en la determinación de cianuros.**

**A.3.14.1.1 Medidas precautorias en el manejo de cianuros.**

**A.3.14.1.1.1** Las sales de cianuro se descomponen en contacto con agua, humedad, carbonatos alcalinos, ácidos produciendo cianuro de hidrógeno.

**A.3.14.1.1.2** La mezcla de cianuros metálicos con cloratos, percloratos, nitratos o nitritos metálicos, causa explosiones violentas.

**A.3.14.1.2 Riesgos**

**A.3.14.1.2.1** En presencia de agua, CO2 y disoluciones ácidas, se genera ácido cianhídrico (HCN) el cual es inflamable.

**A.3.14.1.2.2** El HCN es tóxico y puede ser fatal si se absorbe a través de la piel, se ingiere o se inhala.

**A.3.14.1.2.3** La absorción de 50 a 100 mg de cianuros en una sola dosis puede causar un colapso inmediato, cesando la respiración. En todos los casos, la absorción del cianuro por el organismo es muy rápida, unos segundos si se trata por las vías respiratorias y unos 30 minutos si es por vía oral. En el caso de intoxicación cutánea, dependiendo de la intensidad de ésta, el proceso de intoxicación puede ser de 4 a 6 horas.

**A.3.14.1.3 Protección personal.**

**A.3.14.1.3.1** Realizar la determinación en área específica con campana extractora de gases.

**A.3.14.1.3.2** Utilizar un respirador con filtro o mascarilla con filtro adecuado.

**A.3.14.1.3.3** Utilizar guantes y protectores de mangas.

**A.3.14.1.3.4** Lentes de seguridad ajustados y careta.

**A.3.14.1.3.5** Traje de protección y zapatos cerrados.

**A.3.14.1.4 En caso de derrames o fugas.**

**A.3.14.1.4.1** Contar con regadera de seguridad y lavaojos.

**A.3.14.1.4.2** Contar con traje de protección completo incluyendo equipo autónomo de respiración.

**A.3.14.1.4.3** Evacuar la zona de peligro. Limpiar la sustancia derramada e introducirla en un recipiente hermético y confinar en un lugar seguro. **NUNCA** poner en contacto directo con el agua.

**A.3.14.1.4.4** Adiestramiento de personal paramédico y/o medico en protocolo o procedimiento en caso de intoxicación.

**A.3.14.1.5 En caso de incendio y explosión.**

**A.3.14.1.5.1** Utilizar polvo químico alcalino. No utilizar agua, espuma y CO2.

**A.3.14.1.6** **Tratamiento en caso de envenenamiento.**

**A.3.14.1.6.1 El nitrito de amilo**, se presenta en ampolletas y la victima debe inhalarla en forma inmediata posterior al envenenamiento, en intervalos de 15 segundos de inhalación por 15 segundos de descanso y repetir a los tres minutos por 15 minutos máximo.

**A.3.14.1.6.2** Trasladar al paciente lo antes posible a un centro hospitalario donde se le debe administrar nitrito de sodio al 3% (300 mg en 10 mL) por vía intravenosa, administrar en dos partes en cuatro minutos. Se puede repetir la mitad de la dosis si no hay mejoría.

**A.3.14.1.6.3** Posteriormente se debe administrar tiosulfato de sodio intravenoso, cuya presentación es de ampolletas de 50 mL que contienen 12.5 gramos de tiosulfato de sodio. Se puede repetir la mitad de la dosis si no hay mejoría.

**A.3.14.1.6.4** También puede utilizarse hidroxicobalamina para facilitar la eliminación de cianuro y diazepam para el control de las convulsiones.

**A.3.14.1.6.5** La administración del nitrito de amilo será realizada por una persona capacitada para tal efecto.

**Nota:** El nitrito de amilo es inflamable, por ello debe administrarse en un lugar libre de toda fuente de ignición.

**A.3.14.1.6.6** Los exámenes complementarios a realizarse son:

**A.3.14.1.6.6.1** Cianuro en sangre y tiocianatos en sangre y orina, la presencia de estos elementos indica intoxicación por cianuro.

**A.3.14.1.7 Primeros auxilios.**

**A.3.14.1.7.1 Inhalación.**

**A.3.14.1.7.1.1** Llevar a la víctima a un lugar ventilado.

**A.3.14.1.7.1.2** Suministrarle nitrito de amilo.

**A.3.14.1.7.1.3** Suministrarle oxígeno.

**A.3.14.1.7.1.4** Trasladar a la víctima al centro hospitalario más cercano.

**A.3.14.1.7.2 Ingestión.**

**A.3.14.1.7.2.1** Inducir al vomito si la victima está consciente.

**A.3.14.1.7.2.2** Suministrarle el nitrito de amilo.

**A.3.14.1.7.2.3** Suministrarle oxígeno.

**A.3.14.1.7.2.4** Dar 100 gramos de carbón activado mezclado con 300 mL de agua.

**A.3.14.1.7.2.5** Trasladar a la víctima al centro hospitalario más cercano.

**A.3.14.1.7.3 Contacto con la piel.**

**A.3.14.1.7.3.1** Quitar la ropa contaminada y lavar la piel con abundante agua con jabón.

**A.3.14.1.7.3.2** Suministrarle el nitrito de amilo

**A.3.14.1.7.3.3** Suministrarle oxígeno.

**A.3.14.1.7.3.4** Trasladar a la víctima al centro hospitalario más cercano.

**A.3.14.2 Método presuntivo para la determinación de cianuros.**

**A.3.14.2.1 Fundamento.**

La prueba establece la presencia o ausencia de cianuros y cloruro de cianógeno (CNCl).

Con la práctica y dilución la prueba revela el intervalo de concentración aproximada de estos compuestos, desarrollando color y comparados con estándares tratados similarmente.

Los cianuros susceptibles de clorar, con la cloramina T forman cloruro de cianógeno. El cloruro de cianógeno produce un color azul-rojizo con el reactivo de ácido barbitúrico-piridina.

Para la determinación del contenido de cloruro de cianógeno en la muestra, se omite la adición de cloramina T (precaución el cloruro de cianógeno es un gas toxico, evite su inhalación).

Es importante tomar en cuenta la influencia de las interferencias posibles: agentes oxidantes, sulfuros, ácidos grasos, carbonatos, aldehídos. Para su detección y eliminación es necesario consultar la bibliografía original.

**A.3.14.2.2 Materiales.**

**A.3.14.2.2.1** Platos de porcelana con 6 ó 12 cavidades

**A.3.14.2.2.2** Pipetas beral.

**A.3.14.2.2.3** Agitadores de vidrio.

**A.3.14.2.3 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.14.2.3.1** Agua reactivo tipo I o tipo II.

**A.3.14.2.3.2 Disolución de cloramina T.**

**A.3.14.2.3.2.1** Disolver 1 g del polvo blanco soluble en agua, en 100 mL de agua. Preparar semanalmente y guardar en refrigerador.

**A.3.14.2.3.3 Solución de indicador.**

**A.3.14.2.3.3.1** Disolver 20 mg de para dimetil amino benzal rodanina en 100 mL de acetona.

**A.3.14.2.3.4 Disolución de cianuro de potasio.**

**A.3.14.2.3.4.1** Disolver 1.6 g de hidróxido de sodio y 2.51 g de cianuro de potasio en un matraz volumétrico de 1000 mL con agua tipo I y llevar a volumen, se tiene aproximadamente 1 mL = 1 mg CN. **Precaución:** El cianuro de potasio es altamente tóxico, evitar el contacto o su inhalación.

**A.3.14.2.3.4.2** Estandarizar esta solución con una solución de nitrato de plata, tomando 25 mL de la solución de cianuro, diluir a 100 mL usando la solución diluida de hidróxido de sodio, agregar 0.5 mL de indicador p- dimetil amino benzal rodanina y titular con la solución de nitrato de plata. Esta solución deberá estandarizarse semanalmente ya que puede sufrir degradaciones.

**A.3.14.2.3.5 Reactivo de ácido barbitúrico-piridina.**

**A.3.14.2.3.5.1** Colocar 15 gramos de ácido barbitúrico en un matraz volumétrico de 250 mL y agregar suficiente agua para lavar las paredes y humedecer el ácido barbitúrico. Adicionar 75 mL de piridina y mezclar. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico concentrado, mezclar, enfriar a temperatura ambiente. Diluir al volumen y mezclar hasta que el ácido barbitúrico esté disuelto. La disolución es estable por 6 meses si es almacenado en botella ámbar bajo refrigeración; descartar si se presenta precipitación.

**A.3.14.2.3.6** Disolución de ácido clorhídrico 1+9.

**A.3.14.2.3.7 Indicador de disolución acuosa de fenolftaleína.**

**A.3.14.2.3.7.1** Disolver 5 g de sal sódica de fenolftaleína en agua reactivo y llevar con agua reactivo a 1 litro.

**A.3.14.2.3.8** Carbonato de sodio anhidro Na2CO3.

**A.3.14.2.3.9** Formaldehido al 37%, grado farmacéutico.

**A.3.14.2.4 Procedimiento.**

**A.3.14.2.4.1** Si la muestra tiene pH mayor a 10 neutralizar una porción de muestra de 20 a 25 mL.

**A.3.14.2.4.2** Agregar aproximadamente 250 mg de carbonato de sodio y agitar para disolver.

**A.3.14.2.4.3** Agregar una gota de indicador de fenolftaleína.

**A.3.14.2.4.4** Agregar gota a gota HCl 1+9 con agitación constante hasta que la disolución se decolore.

**A.3.14.2.4.5** Colocar en cavidades separadas del plato de porcelana 3 gotas de muestra y 3 gotas de agua reactivo (blanco).

**A.3.14.2.4.6** A cada cavidad agregar una gota de disolución de cloramina T y mezclar con un agitador de vidrio.

**A.3.14.2.4.7** Agregar una gota de disolución de ácido barbitúrico-piridina a cada cavidad y otra vez mezclar.

**A.3.14.2.4.8** Después de un minuto, la porción de muestra tomará un color de rosa a rojo, a una concentración ≥ =

**A.3.14.2.4.9** La porción de blanco será de color de amarillo tenue solo a causa del color de los reactivos. Comparar el resultado anterior con un patrón de

**A.3.14.2.4.10 Si se sospecha que hay presencia de tiocianato (SCN-), probar una muestra pre tratada de acuerdo a lo siguiente.**

**A.3.14.2.4.10.1** Calentar de 20 a 25 mL de muestra en un baño de agua que se encuentre a 50°C.

**A.3.14.2.4.10.2** Agregar 0.1 mL de formaldehido y calentar por 10 min.

**A.3.14.2.4.10.3** Este tratamiento enmascarará hasta

**A.3.14.2.4.10.4** Repetir el procedimiento de prueba como se indicó arriba (ver numerales A.3.14.2.4.1 al A.3.14.2.4.9).

**A.3.14.2.4.10.5** El desarrollo de color indicará la presencia de tiocianato (SCN-). Comparando la intensidad del color en las 2 pruebas se puede juzgar la concentración relativa de CN y SCN.

**A.3.14.2.4.10.6** Si la coloración es intensa mediante diluciones de la muestra y pruebas adicionales se puede permitir aproximarse a la concentración real.

**A.3.14.2.5 Expresión de resultados.**

**A.3.14.2.5.1** La expresión de resultados debe ser en  ycon dos cifras decimales.

**A.3.14.3 Método potenciométrico para la determinación de cianuros.**

**A.3.14.3.1 Fundamento.**

Después de un tratamiento preliminar de la muestra por destilación, el cianuro alcalino obtenido puede ser determinado potenciométricamente usando un electrodo de ión selectivo para cianuros, en un potenciómetro en milivolts relativos. Este método puede ser usado para un intervalo de concentración de 0.05 a 10 mg CN/L.

Es importante tomar en cuenta la influencia de las interferencias posibles y consultar la bibliografía original consultada.

**A.3.14.3.2 Aparatos e instrumentos.**

**A.3.14.3.2.1** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

**A.3.14.3.2.2** Potenciómetro con escala expandida o ionizador.

**A.3.14.3.2.3** Electrodo de ión selectivo para cianuros.

**A.3.14.3.2.4** Agitador magnético con barra cubierta de teflón.

**A.3.14.3.2.5** Parrilla de calentamiento con control de temperatura.

**A.3.14.3.2.6** Aparato de destilación (figura 1), incluye:

**A.3.14.3.2.6.1** Matraz de destilación ”claissen” o similar. Capacidad de 1 L, con tubo de entrada y aditamento para un condensador enfriado por agua.

**A.3.14.3.2.6.2** Absorbedor de gas. Con tubo dispersor de gas equipado con salida provista de un filtro de porosidad media.

**A.3.14.3.2.6.3** Elemento de calentamiento ajustable.

**A.3.14.3.2.6.4** Juntas de vidrio ST. Recubiertas con Teflón o con un lubricante apropiado para el matraz de destilación y el condensador. Pueden usarse también juntas de hule.

**A.3.14.3.3 Materiales.**

**A.3.14.3.3.1** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

**A.3.14.3.3.2** Material común de laboratorio.

**A.3.14.3.4 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.14.3.4.1** Agua reactivo tipo I o tipo II libre de cianuros

**A.3.14.3.4.2 Solución de hidróxido de sodio (NaOH)**

**A.3.14.3.4.2.1** Disolver 40 g de NaOH en agua tipo I y diluir a 1 L.

**A.3.14.3.4.3 Solución de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl2: 6H2O)**

**A.3.14.3.4.3.1** Disolver 510 g de MgCl2.6H2O en agua tipo I y diluir a 1 L.

**A.3.14.3.4.4** Solución de ácido sulfúrico (H2SO4) 1:1 en agua tipo I.

**A.3.14.3.4.5** Carbonato de plomo en polvo (PbCO3).

**A.3.14.3.4.6** Ácido sulfámico (NH2SO3H)

**A.3.14.3.4.7 Solución diluida de hidróxido de sodio (NaOH)**

**A.3.14.3.4.7.1** Disolver 1.6 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 1000 mL.

**A.3.14.3.4.8 Solución de indicador.**

**A.3.14.3.4.8.1** Disolver 20 mg de para dimetil amino benzal rodanina en 100 mL de acetona.

**A.3.14.3.4.9 Solución concentrada del estándar de cianuro de potasio.**

**A.3.14.3.4.9.1** Disolver 1.6 g de hidróxido de sodio y 2.51 g de cianuro de potasio en un matraz volumétrico de 1000 mL con agua tipo I y llevar a volumen, se tiene aproximadamente 1 mL = 1 mg CN. **Precaución:** El cianuro de potasio es altamente tóxico, evitar el contacto o su inhalación.

**A.3.14.3.4.9.2** Estandarizar esta solución con una solución de nitrato de plata, tomando 25 mL de la solución de cianuro, diluir a 100 mL usando la solución diluida de hidróxido de sodio, agregar 0.5 mL de indicador p- dimetil amino benzal rodanina y titular con la solución de nitrato de plata. Esta solución deberá estandarizarse semanalmente ya que puede sufrir degradaciones.

**A.3.14.3.4.10 Solución estándar de nitrato de plata (AgNO3).**

**A.3.14.3.4.10.1** Disolver 3.27 g de nitrato de plata en un matraz volumétrico de 1000 mL con agua tipo I y llevar a volumen.

**A.3.14.3.4.11 Solución estándar de cianuro de potasio.**

**A.3.14.3.4.11.1** De acuerdo a la valoración obtenida anteriormente calcular el volumen de la solución concentrada de cianuro de potasio que deberá tomarse (aproximadamente 25 mL), diluir en un matraz volumétrico de 100 mL con solución diluida de hidróxido de sodio y llevar al volumen, acercar la equivalencia a 1 mL = 0.25 mg de CN.

**A.3.14.3.4.12 Solución estándar diluida de cianuro de potasio.**

**A.3.14.3.4.12.1** Diluir 100 mL de la solución anterior en un matraz volumétrico de 1000 mL con solución diluida de hidróxido de sodio y llevar al volumen, 1 mL = 0.025 mg de CN. (Preparar esta solución diariamente y guardarla en un frasco de vidrio ámbar con tampón esmerilado).

**A.3.14.3.4.13 Solución de nitrato de potasio (KNO3)**

**A.3.14.3.4.13.1** Disolver 100 g de nitrato de potasio en agua tipo I y diluir a 1000 mL. Ajustar el pH a 12 con hidróxido de potasio. Esta es la solución de llenado del electrodo de referencia. No se utiliza cuando tenemos un electrodo combinado.

**A.3.14.3.5 Procedimiento**

**A.3.14.3.5.1** El tratamiento preliminar varía de acuerdo con la sustancia interferente que está presente.

**A.3.14.3.5.2** Los sulfuros, ácidos grasos y agentes oxidantes se eliminan por procedimientos especiales. La mayoría de otras sustancias se quitan por destilación.

**A.3.14.3.5.3 Destilación de la muestra.**

**A.3.14.3.5.3.1** El ácido cianhídrico (HCN) se libera de la muestra acidificada por destilación y purgado con aíre. El HCN gaseoso se recolecta pasándolo a través de una solución absorbedora de NaOH. La solución de cianuro se determina por un procedimiento potenciométrico.

**A.3.14.3.5.4 Procedimiento para la destilación**

**A.3.14.3.5.4.1** Añadir 500 mL de la muestra, conteniendo no más de 10 mg CN/L (dilúyase si es necesario con agua tipo I) al matraz de destilación.

**A.3.14.3.5.4.2** Añadir 10 mL de solución de NaOH (40 g de NaOH/L) al lavador de gases y diluir, si es necesario con agua, para obtener una profundidad adecuada de líquido en el absorbedor. No usar más de 225 mL del volumen total de la solución absorbedora. Si se sabe que se tienen sulfuros agregar 50 o más mg de PbCO3 en polvo a la solución absorbedora para precipitar los sulfuros. Conectar el tren, consistente en la entrada de aíre del matraz de destilación, el matraz, condensador, lavador de gases, trampa de succión y aspirador. Ajustar la succión de modo que entre aproximadamente una burbuja de aíre/segundo al matraz de ebullición. Este flujo de aíre acarreará el HCN del matraz al absorbedor y normalmente evitará la inversión del flujo de HCN a través de la entrada de aíre. Si este flujo de aíre no evita el regreso del flujo en el tubo de entrada del destilado incrementarlo a 2 burbujas de aíre/segundo. Observar la velocidad de la purga de aíre en el absorbedor, dado que el nivel del líquido debe estar entre 6.5 mm - 10 mm. Mantener el flujo de aíre durante toda la reacción.

**A.3.14.3.5.4.3** Agregar 2 g de ácido sulfámico a través del tubo de entrada de aire y lavar con agua el tubo.

**A.3.14.3.5.4.4** Añadir 50 mL de solución de ácido sulfúrico (1 + 1) a través del tubo de entrada de aíre. Enjuagar el tubo con agua y permitir que el aíre mezcle el contenido del matraz durante 3 minutos. Opcionalmente añadir 20 mL de reactivo de MgCl2 a través de la entrada de aíre y lavar con una corriente de agua. Puede formarse un precipitado que se disolverá al calentar.

**A.3.14.3.5.4.5** Calentar a ebullición rápida no se debe permitir que el condensador se inunde o que los vapores se eleven más allá de la parte media del condensador. El nivel de reflujo adecuado es de 40 a 50 gotas/minuto. Reflujar cuando menos durante 1 hora. Quitar el calentamiento pero mantener el flujo de aíre. Enfriar durante 15 minutos y drenar el contenido del lavador de gases en un frasco aparte. Enjuagar el tubo conector entre el condensador y el lavador de gases con agua, añadir el agua al líquido drenado y diluir a 250 mL en un matraz volumétrico.

**A.3.14.3.5.4.6** En la destilación se tiene recuperación cuantitativa, aún de los cianuros refractarios tales como los complejos de hierro. Para obtener la recuperación completa del cianuro de cobalto emplear un pretratamiento con radiación ultravioleta. Si se sospecha una recuperación incompleta, destilar nuevamente colocando una nueva carga de NaOH en el lavador de gases y someter a reflujo durante una hora más. El cianuro del segundo reflujo, si existe, indicará la totalidad de la recuperación.

**A.3.14.3.5.4.7** Como medida de control de calidad, probar periódicamente el aparato, reactivos y otras variables potenciales en el ámbito de concentración de interés. Por ejemplo, debe obtenerse un mínimo de recuperación de 100±4 % para un estándar de

**A.3.14.3.5.5 Preparación de la curva de calibración**

**A.3.14.3.5.5.1** Empleando una microbureta de Kock, con la solución estándar diluida de cianuro de potasio, preparar 4 o más diluciones que contengan 2.5, 0.250, 0.125 y 0.025 μg CN/mL, en solución diluida de hidróxido de sodio, (1.6 g de NaOH/L).

**A.3.14.3.5.5.2** Transferir aproximadamente 100 mL de cada una de estas soluciones en un recipiente de 250 mL, preenjuagado con una pequeña porción de la solución que se va a analizar.

**A.3.14.3.5.5.3** Sumergir los electrodos, mezclar bien con el agitador magnético a 25ºC, deberá mantenerse siempre la misma velocidad de agitación para todas las lecturas (estándares y muestra).

**A.3.14.3.5.5.4** Siempre se debe trabajar de la concentración más baja a la más alta a causa de que el equilibrio se alcanza más lentamente.

**Precaución:** La membrana del electrodo se disuelve en soluciones de concentraciones mayores de 25 μg CN-/mL. No usarlo en soluciones arriba de esta concentración.

**A.3.14.3.5.5.5** Graficar la concentración del ión cianuro sobre el eje logarítmico contra el potencial desarrollado por la solución sobre el eje lineal. Una línea recta con pendientes de aproximadamente 59 milivolts por decena, indica que el instrumento y electrodos están operando apropiadamente.

**A.3.14.3.5.5.6** Registrar la pendiente de la línea obtenida (milivolts/decena de concentración). Puede existir poca variación de la pendiente desde un valor teórico de 59.2 milivolts/decena causadas por las variaciones de manufactura y de potenciales de los electrodos de referencia.

**A.3.14.3.5.6 Medición de la muestra**

**A.3.14.3.5.6.1** Colocar 100 mL del destilado alcalino o una porción diluida a 100 mL con solución de hidróxido de sodio, dentro de un recipiente de 250 mL, cuando se miden concentraciones bajas de ión cianuro, primero enjuagar el recipiente y electrodos con un volumen pequeño de muestra, sumergir los electrodos para CN y mezclar con un agitador magnético a la misma velocidad usada para la curva de calibración, después de que alcance el equilibrio (al menos 5 minutos y no más de 10), registrar los valores obtenidos en milivolts en el ión analizador o el encontrado en la gráfica antes elaborada, calcular la concentración como se indicó anteriormente.

**A.3.14.3.6 Cálculos**

**Curva ajustada**

+ A = C

Dónde:

**A** y **B** son las constantes obtenidas en el ajuste de curva.

**RmV** es la lectura en milivolts relativos para patrones y muestras.

**Cálculo final con la influencia de los volúmenes utilizados**

Dónde:

 Obtenidos de la curva ajustada.

**X** = mL de la solución de Hidróxido de sodio con (CN) absorbido en solución, obtenidos en la destilación.

**Y** = Volumen de la muestra original en mL.

**A.3.14.3.7 Expresión de resultados.**

**A.3.14.3.7.1** La expresión de resultados debe ser en y con dos cifras decimales.

**A.3.14.4 Método colorimétrico para la determinación de Cianuros.**

**A.3.14.4.1 Fundamento.**

Los cianuros son liberados como HCN (ácido cianhídrico) por reflujo de la muestra con un ácido fuerte. El HCN se absorbe en una disolución de NaOH. El ion cianuro en la disolución absorbente se hace reaccionar con cloramina–T a un pH menor de 8 para formar el cloruro de cianógeno; el CNCl forma un color rojo-azul al reaccionar con la disolución de ácido piridina-barbitúrico. La absorbancia máxima del color en disolución acuosa se encuentra entre 575 nm y 582 nm, la cual es proporcional a la concentración del ion cianuro.Precaución el HCN y el CNCl son tóxicos; evitar su inhalación.

Es importante tomar en cuenta la influencia de las interferencias posibles.

**A.3.14.4.2 Interferencias.**

**A.3.14.4.2.1** Los agentes oxidantes como el cloro pueden destruir la mayoría de los cianuros durante el almacenamiento y la manipulación, por lo cual esta interferencia debe ser eliminada al momento del muestreo.

**A.3.14.4.2.2** Una elevada concentración de carbonato puede afectar la destilación causando gasificación excesiva cuando se añade el ácido. El dióxido de carbono liberado puede reducir significativamente el contenido de NaOH del absorbedor.

**A.3.14.4.2.3** El ácido sulfhídrico o sulfuros metálicos.

**A.3.14.4.2.4** La presencia de nitratos y/o nitritos pueden interferir en los resultados.

**A.3.14.4.3 Aparatos e instrumentos.**

**A.3.14.4.3.1** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

**A.3.14.4.3.2** Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.

**A.3.14.4.3.3** Mantilla o parrilla de calentamiento.

**A.3.14.4.3.4** Potenciómetro.

**A.3.14.4.3.5** Aparato de destilación (figura 1). El matraz de destilación Claissen modificado debe ser de 1 L de capacidad con un tubo de entrada y un condensador. El absorbedor de gas puede ser un frasco lavador de gases tipo Fisher-Milligan.

**A.3.14.4.3.6** Equipo de vacío para el arrastre de gases en el destilador durante el pretratamiento de la muestra.

**A.3.14.4.3.7** Espectrómetro disponible para utilizarse a 578 nm con celdas de vidrio o cuarzo de 1 cm de paso óptico.

**Figura 1. Aparato para destilación de cianuros.**



**A.3.14.4.4 Materiales.**

**A.3.14.4.4.1** Vasos de precipitados de 25 o 50 mL.

**A.3.14.4.4.2** Vasos de precipitados de 1000 mL.

**A.3.14.4.4.3** Matraces volumétricos de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.

**A.3.14.4.4.4** Bureta de 50 mL graduada en 0.1 mL.

**A.3.14.4.4.5** Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL o pipeta de pistón de 1 a 10 mL.

**A.3.14.4.4.6** Barra magnética con cubierta de teflón.

**A.3.14.4.5 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.14.4.5.1** Agua reactivo.

**A.3.14.4.5.2** Cromato de potasio (K2CrO4).

**A.3.14.4.5.3** Cianuro de potasio (KCN) o disolución patrón de cianuro con certificado de análisis trazable a patrones nacionales o internacionales. Reactivo altamente tóxico, evitar el contacto o su inhalación.

**A.3.14.4.5.4** Ácido sulfúrico concentrado (H2SO4).

**A.3.14.4.5.5** Ácido sulfámico (H2NSO3H).

**A.3.14.4.5.6** Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl2•6H2O).

**A.3.14.4.5.7** Hidróxido de sodio (NaOH).

**A.3.14.4.5.8** Nitrato de bismuto [(Bi)NO3)3].

**A.3.14.4.5.9** Cloruro de sodio (NaCl). Con una pureza mayor de 99.95%.

**A.3.14.4.5.10** Nitrato de plata (AgNO3).

**A.3.14.4.5.11** p-dimetilamino benzal rodanina (C12H12N2OS2).

**A.3.14.4.5.12** Acetona (C3H6O).

**A.3.14.4.5.13** Cloramina-T trihidratada (C7H7ClNNaO2S•3H2O).

**A.3.14.4.5.14** Ácido barbitúrico (C4H4N2O3).

**A.3.14.4.5.15** Ácido clorhídrico concentrado (HCl).

**A.3.14.4.5.16** Acetato de sodio trihidratado (C2H3NaO2•3H2O).

**A.3.14.4.5.17** Tiosulfato de sodio (Na2S2O3).

**A.3.14.4.5.18** Carbonato de plomo (PbCO3).

**A.3.14.4.5.19** Almidón.

**A.3.14.4.5.20** Yoduro de potasio (KI).

**A.3.14.4.5.21** Ácido acético glacial (CH3COOH).

**A.3.14.4.5.22** Acetato de plomo [Pb(CH3COO)2].

**A.3.14.4.5.23** Papel indicador de acetato de plomo comercial.

**A.3.14.4.5.24** Piridina (C5H5N).

**A.3.14.4.5.25 Disolución indicadora de rodanina al 0.02%.**

**A.3.14.4.5.25.1** Disolver 20 mg de p-dimetilamino benzal rodanina en 100 mL de acetona. Mantener esta disolución almacenada en frasco ámbar y en refrigeración.

**A.3.14.4.5.26 Disolución concentrada de hidróxido de sodio.**

**A.3.14.4.5.26.1** Pesar aproximadamente 40.0 g de hidróxido de sodio, disolver y llevar a un volumen de 1 L con agua previamente hervida y enfriada para eliminar la presencia de CO2 (dióxido de carbono).

**A.3.14.4.5.27 Disolución diluida de hidróxido de sodio.**

**A.3.14.4.5.27.1** Diluir 40 mL de la disolución concentrada de hidróxido de sodio y llevar a un volumen de 1 L en un matraz volumétrico con agua libre de CO2 (dióxido de carbono).

**A.3.14.4.5.28 Disolución patrón de cloruro de sodio 0.0141 N.**

**A.3.14.4.5.28.1** Disolver 0.8241 g de NaCl (previamente secado a 140°C durante 2 h), en agua tipo I y llevar a 1000 mL en un matraz volumétrico. Bajo estas condiciones 1.00 mL equivale a 500 µg del ion Cl**–**.

Ajustar esta equivalencia al peso registrado.

**A.3.14.4.5.29 Disolución de cromato de potasio al 5%.**

**A.3.14.4.5.29.1** Disolver 50 g de K2CrO4 en aproximadamente 100 mL de agua. Añadir disolución de AgNO3 0.1 N hasta la formación de un precipitado color rojo. Dejar reposar 12 h; filtrar y diluir a 1 L con agua.

**A.3.14.4.5.30 Disolución patrón de nitrato de plata 0.02 N.**

**A.3.14.4.5.30.1** Disolver 3.27 g de AgNO3 en agua y llevar a un volumen de 1 L. Guardar la disolución en frasco color ámbar y en refrigeración.

Si se utiliza una disolución comercial de nitrato de plata 0.1 N, diluir 200 mL de ésta a un volumen de 1000 mL con agua.

**A.3.14.4.5.31 Valoración.**

**A.3.14.4.5.31.1** Tomar por triplicado una alícuota de 10 mL de la disolución de NaCl con material volumétrico y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL llevar a un volumen aproximado de 100 mL con agua. Adicionar 1 mL de disolución de cromato de potasio y titular con la disolución patrón de (AgNO3) 0.02 N hasta la aparición de la coloración amarillo-rojizo permanente.

**A.3.14.4.5.31.2** Preparar un blanco de reactivos utilizando 100 mL de agua conteniendo 1 mL de disolución de cromato de potasio.

**A.3.14.4.5.31.3** Calcular la normalidad de la disolución aplicando la siguiente ecuación:

En donde:

**N** =normalidad.

**V** =alícuota tomada de la disolución patrón (10 mL).

**A** = volumen (mL) gastados de AgNO3 0.02 N en la valoración del patrón.

**B** = volumen (mL) gastados de AgNO3 0.02 N en la valoración del blanco.

Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

**A.3.14.4.5.32 Disolución madre de**

**A.3.14.4.5.32.1** Disolver 1.6 g de NaOH y 2.51 g de KCN en un matraz volumétrico de 1 L. Llevar al volumen con agua.

**A.3.14.4.5.33 Valoración de la disolución.**

**A.3.14.4.5.33.1** Medir 25 mL de esta disolución y diluir a 100 mL con disolución diluida de NaOH añadir aproximadamente 0.5 mL del indicador de rodanina. Titular con disolución valorada de AgNO3 0.02 N, hasta el primer cambio de color amarillo canario a salmón. 1 mL de solución de AgNO3 0.02N equivale a 1.00 mg de CN**–**.

**A.3.14.4.5.33.2** Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

**A.3.14.4.5.33.3** Puede utilizarse una disolución patrón comercial de 1 mg/mL con certificado de análisis trazable a patrones nacionales o internacionales la cual ya no requiere valoración.

**A.3.14.4.5.34 Disolución de nitrato de bismuto.**

**A.3.14.4.5.34.1** Pesar aproximadamente 30.0 g de nitrato de bismuto, disolver en 100 mL de agua, manteniéndose en agitación, adicionar 250 mL de ácido acético glacial. Agitar hasta que se disuelva el nitrato de bismuto y llevar a un volumen de 1 L con agua.

**A.3.14.4.5.35 Disolución de ácido sulfámico.**

**A.3.14.4.6.35.1** Pesar aproximadamente 40.0 g de ácido sulfámico, disolver en 500 mL de agua y llevar a un volumen de 1 L.

**A.3.14.4.5.36 Ácido sulfúrico 1:1**

**A.3.14.4.5.36.1** Añadir lentamente 500 mL de ácido sulfúrico concentrado a 500 mL de agua.

**A.3.14.4.5.37 Disolución de cloruro de magnesio.**

**A.3.14.4.5.37.1** Pesar aproximadamente 510.0 g de cloruro de magnesio, disolver y llevar al volumen de 1 L con agua.

**A.3.14.4.5.38 Disolución de cloramina T.**

**A.3.14.4.5.38.1** Pesar aproximadamente 1.0 g de cloramina T y llevar a un volumen de 100 mL con agua. Almacenar en refrigeración. Preparar semanalmente.

**A.3.14.4.5.39 Disolución intermedia de cianuros de**

**A.3.14.4.5.39.1** Basado en la concentración para la disolución madre de cianuros, calcular el volumen requerido (aproximadamente 10 mL) y llevar a 1 L con disolución diluida de NaOH.

**A.3.14.4.5.40 Disolución patrón de cianuros de**

**A.3.14.4.5.40.1** Medir 10 mL de la disolución intermedia de cianuros y llevar a un volumen de 100 mL con disolución diluida de NaOH. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

**A.3.14.4.5.41 Disolución de ácido piridina-barbitúrico.**

**A.3.14.4.5.41.1** Pesar aproximadamente 15.0 g de ácido barbitúrico, colocar en un matraz volumétrico de 250 mL, lavar las paredes del matraz con máximo 5 mL de agua. Adicionar 75 mL de piridina y mezclar. Adicionar 15 mL de HCl concentrado, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Diluir al volumen con agua y mezclar hasta que el ácido barbitúrico se disuelva. Almacenar en frasco ámbar y en refrigeración. Desechar si presenta precipitación.

**A.3.14.4.5.42 Disolución amortiguadora de acetato de sodio.**

**A.3.14.4.5.42.1** Pesar aproximadamente 410.0 g de acetato de sodio, disolver y llevar a un volumen de 500 mL con agua. Ajustar a un pH de 4.5 con ácido acético glacial.

**A.3.14.4.6 Procedimiento.**

**A.3.14.4.6.1 Preparación de la curva de calibración de cianuros.**

**A.3.14.4.6.1.1** De acuerdo a la tabla siguiente, medir los siguientes volúmenes de disolución patrón de cianuros de en matraces volumétricos de 50 mL. Diluir a 40 mL con solución de hidróxido de sodio (1.6 g de NaOH/L), como se indica en la siguiente tabla. Agregar 1 mL de solución amortiguadora de acetato y 2 mL de solución de cloramina T, tapar y mezclar por inversión. Dejar reposar exactamente 2 minutos. Agregar 5 mL de reactivo de piridina-acido barbitúrico, diluir al volumen total con agua reactivo y reposar exactamente 8 minutos. Medir las absorbancia contra agua reactivo a 578 nm. Preparar la curva de calibración diariamente.

**Tabla. Curva de calibración de Cianuros.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Volumen dedisolución de trabajo de(mL) |  |  |  | mL de solución de NaOH(1.6 g de NaOH/L) |
| 1.0 | 0.00100 | 0.00002 | 0.02 | 39 |
| 5.0 | 0.00500 | 0.0001 | 0.10 | 35 |
| 10.0 | 0.01000 | 0.0002 | 0.20 | 30 |

Usar celdas de 1 cm de paso de luz. Para concentraciones menores a 0.02 µg de CN/mL usar celdas de 10 cm de paso de luz.

**A.3.14.4.6.1.2** Elaborar una curva de calibración, graficando las lectura de absorbancia en función de su concentración en de cada uno de los puntos de la curva patrón.

**A.3.14.4.6.1.3** Ajustar la curva de calibración obtenida mediante método de mínimos cuadrados. Calcular la pendiente, el coeficiente de correlación y la ordenada al origen. Obtener la ecuación de la recta.

**A.3.14.4.6.2 Destilación de la muestra.**

**A.3.14.4.6.2.1** Medir 500 mL de muestra, conteniendo no más de en el matraz de destilación de 1 L.

**A.3.14.4.6.2.2** Medir una alícuota de 10 mL de la disolución concentrada de NaOH, colocarla dentro del tubo de adsorción, añadir agua hasta que la espiral esté cubierta. No utilizar un volumen total de disolución de adsorción mayor a 225 mL. Conectar el matraz de ebullición, el condensador, el absorbedor y la trampa, tal como se muestra en la Figura 1.

**A.3.14.4.6.2.3** Ajustar la bomba de vacío, empezar con un flujo de aire lento que entre por el matraz tipo Claissen y dejar que se estabilice entre 2 o 3 burbujas de aire por segundo desde el tubo de entrada.

**A.3.14.4.6.2.4** Utilizar papel de acetato de plomo para verificar que la muestra no contenga sulfuros. Si el papel se torna negro, la prueba es positiva; en este caso, tratar la muestra por adición de 50 mL de la disolución de nitrato de bismuto a través del tubo de entrada de aire después de que la tasa de entrada de aire esté estable.

**A.3.14.4.6.2.5** Mezclar por 3 min antes de la adición de ácido sulfúrico. Otra forma de eliminar los sulfuros es adicionar 50 mg de PbCO3 a la disolución de absorción antes de la destilación. Filtrar el destilado antes del desarrollo del color.

**A.3.14.4.6.2.6** Para eliminar la interferencia de nitratos y/o nitritos adicionar 50 mL de disolución de ácido sulfámico a la muestra a través del tubo de entrada de aire y lavar con agua; mezclar por 3 min antes de la adición de ácido sulfúrico.

**A.3.14.4.6.2.7** Lentamente añadir ácido sulfúrico 1:1 a través del tubo de entrada de aire y lavar con agua, permitir que el flujo de aire mezcle el contenido del matraz por 3 min. Adicionar 20 mL de la disolución de cloruro de magnesio dentro del tubo de entrada de aire y lavar con agua.

**A.3.14.4.6.2.8** Calentar la disolución hasta ebullición. Dejar en reflujo por lo menos 1 h. Al cabo de este tiempo apagar la fuente de calor y continuar con el flujo de aire por lo menos durante 15 min más. Al finalizar enfriar el matraz de ebullición, desconectar el absorbedor y cerrar la bomba de vacío.

**A.3.14.4.6.2.9** Drenar la disolución del absorbedor dentro de un matraz volumétrico de 250 mL. Lavar el tubo conector y el absorbedor con agua, colectando en el mismo matraz. Llevar al volumen con agua. Esta disolución es estable durante 24 h.

**A.3.14.4.6.2.10** Destilar una muestra de agua de forma simultánea como blanco de reactivos.

**A.3.14.4.6.3 Desarrollo de color.**

**A.3.14.4.6.3.1** Medir una alícuota de 40 mL de la disolución obtenida en la destilación de la muestra y del blanco de reactivos en matraces volumétricos de 50 mL.

**A.3.14.4.6.3.2** A cada uno de los matraces adicionar 1 mL de disolución amortiguadora de acetato de sodio y 2 mL de la disolución de cloramina T, mezclar. Dejar estabilizar durante 2 min.

**A.3.14.4.6.3.3** Adicionar 5 mL del reactivo de piridina- ácido barbitúrico y llevar al volumen con agua reactivo. Mezclar y dejar que la muestra se estabilice durante 8 min.

**A.3.14.4.6.3.4** Leer la absorbancia a una longitud de onda de 578 nm. Preparar un blanco con 40 mL de NaOH (1.6 g /L), con el procedimiento de desarrollo de color y medir su absorbancia.

**A.3.14.4.6.3.5** Si la lectura de alguna de las muestras rebasa el intervalo de trabajo tomar una alícuota menor de muestra, llevar a 500 mL con disolución diluida de NaOH y destilar nuevamente.

**A.3.14.4.7 Cálculos.**

Obtener los mg de CN**–** en la muestra y en el blanco de reactivos con la siguiente ecuación ajustada:

Dónde:

m y b son las constantes obtenidas en el ajuste de curva

ABS 578

Calcular la concentración final con la influencia de todos los volúmenes involucrados, con la siguiente ecuación:

Dónde:

**A** = concentración en la muestra calculados con la ecuación de la recta ajustada.

**B** = concentración en el blanco de reactivos calculados con la ecuación de la recta ajustada.

**250** = volumen total del destilado en m.

**50** = volumen de aforo de la alícuota del destilado en mL, para desarrollar color.

**C** = volumen original de la muestra utilizada para la destilación en mL.

**40** = volumen de la alícuota del destilado en mL.

**A.3.14.4.8 Expresión de los resultados.**

**A.3.14.4.8.1** La expresión de resultados debe ser en  y con dos cifras decimales.

**A.3.14.5 Método de flujo segmentado mediante digestión UV y destilación.**

**A.3.14.5.1 Fundamento.**

Los cianuros son liberados como HCN, por reflujo de la muestra con un ácido fuerte. El HCN se absorbe en una disolución de NaOH. El ion cianuro en la disolución absorbente se hace reaccionar con cloramina T a un pH menor de 8, para formar el cloruro de cianógeno. Después de que la reacción termine, se adiciona el reactivo de piridina- ácido barbitúrico formando un compuesto colorido que es medido espectrométricamente a una longitud de onda de 570 nm. La determinación se realiza mediante destilación por digestión UV y análisis por flujo segmentado (SFA).

Es importante tomar en cuenta la influencia de las interferencias posibles. Para su detección y eliminación es necesario consultar la bibliografía original.

**A.3.14.5.2 Interferencias.**

**A.3.14.5.2.1** La mayoría de las interferencias se reducen o eliminan por destilación antes de la formación de color.

**A.3.14.5.2.2** Los tiocianatos se descomponen a cianuro por radiación UV produciendo una interferencia positiva.

**A.3.14.5.2.3** Se deben eliminar de la muestra sulfuros y agentes oxidantes.

**A.3.14.5.3 Aparatos e instrumentos.**

**A.3.14.5.3.1** Equipo para SFA. (Figura 2, ejemplo).

**A.3.14.5.3.2** Bomba peristáltica multicanal.

**A.3.14.5.3.3** Automuestrador acceso directo o aleatorio.

**A.3.14.5.3.4** Detector con longitud de onda a 570 nm.

**A.3.14.5.3.5** Digestor UV.

**A.3.14.5.3.6** Cartucho de destilación para cianuros en línea.

**A.3.14.5.3.7** Cartucho reactor específico para prueba de cianuros.

**A.3.14.5.3.8** Baño criogénico con bomba de recirculación.

**A.3.14.5.3.9** Equipo de muestras, bote de muestra frascos ámbar con PTFE.

**A.3.14.5.3.10** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

**A.3.14.5.3.11** Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.

**A.3.14.5.3.12** Potenciómetro.

**A.3.14.5.3.13** Agitador tipo vórtex.

**A.3.14.5.3.14** Microbureta de 10 mL graduada en 0.1 mL**.**

**A.3.14.5.3.15** Pipetas de pistón de diferentes volúmenes.

**Figura 2. Diagrama para el sistema de Flujo Segmentado.**



**A.3.14.5.4 Materiales.**

**A.3.14.5.4.1** El material debe lavarse con detergente y agua, enjuagarse 2 veces con agua tipo I y secarse entre 110 a 150°C durante 1 h. No someter a secado térmico el material volumétrico.

**A.3.14.5.4.2** Tubos vial de teflón para automuestreador.

**A.3.14.5.4.3** Gradillas para tubos.

**A.3.14.5.4.4** Papel filtro No. 41, de 185 mm de diámetro.

**A.3.14.5.4.5** Papel filtro No. 1, de 185 mm de diámetro.

**A.3.14.5.4.6** Vasos de precipitado de 1000 mL de plástico.

**A.3.14.5.4.7** Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 500 mL.

**A.3.14.5.4.8** Perillas.

**A.3.14.5.4.9** Pipetas Pasteur.

**A.3.14.5.4.10** Matraces Erlenmeyer de 500, 1000, 2000 y 3000 mL.

**A.3.14.5.4.11** Matraces volumétricos de 100 mL, 500 mL, 1000 mL.

**A.3.14.5.4.12** Contenedores de plástico.

**A.3.14.5.4.13** Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 mL.

**A.3.14.5.4.14** Barra magnética recubierta con teflón.

**A.3.14.5.4.15** Papel absorbente.

**A.3.14.5.5** **Reactivos y disoluciones.**

**Nota:** Filtrar y desgasificar todos los reactivos antes de su uso.

**A.3.14.5.5.1** Ácido barbitúrico (C4H4N2O3).

**A.3.14.5.5.2** Cloramina T trihidratada (C7H7SO2NNaCl•3H2O).

**A.3.14.5.5.3** Dowfax 2AI.

**A.3.14.5.5.4** Ácido clorhídrico concentrado (HCl).

**A.3.14.5.5.5** Ácido hipofosforoso 50% p/v (H3PO2).

**A.3.14.5.5.6** Ácido fosfórico concentrado (H3PO4).

**A.3.14.5.5.7** Cianuro de potasio KCN, o disolución patrón de cianuro con certificado de análisis trazable a patrones nacionales o internacionales.

**A.3.14.5.5.8** Fosfato monobásico de potasio (KH2PO4).

**A.3.14.5.5.9** Piridina (C5H5N).

**A.3.14.5.5.10** Hidróxido de sodio (NaOH).

**A.3.14.5.5.11** Fosfato dibásico de sodio (Na2HPO4).

**A.3.14.5.5.12** p–dimetilamino benzal rodanina (C12H12N2OS2).

**A.3.14.5.5.13** Acetona (C3H6O).

**A.3.14.5.5.14** Agua reactivo.

**A.3.14.5.5.14.1** Desgasificar y desionizar el agua por una de las siguientes formas:

**A.3.14.5.5.14.1.1** Colocar agua tipo I a vacío con agitación magnética o por sonicación en un periodo de 15 a 20 min.

**A.3.14.5.5.14.1.2** Purgar el agua tipo I con una corriente de nitrógeno (u otro gas inerte) a través de un contenedor de vidrio por aproximadamente 5 min.

**A.3.14.5.5.14.1.3** Hervir el agua tipo I en un matraz Erlenmeyer por 15 a 20 min. Quitar el matraz de la fuente de calor y tapar con otro matraz en posición invertida y permitir enfriar a temperatura ambiente.

**A.3.14.5.5.14.1.4** Preparar el agua al momento de su uso o almacenarla en un contenedor perfectamente tapado y sellado o bajo ligero vacío para protegerla de la reabsorción de gases atmosféricos.

**A.3.14.5.5.15** **Disolución de arranque.**

**A.3.14.5.5.15.1** Adicionar 2 mL de disolución DOWFAX 2Al en aproximadamente 800 mL de agua tipo I en un matraz volumétrico de 1 L. Llevar al volumen con agua tipo I y mezclar perfectamente.

**A.3.14.5.5.16 Reactivos de destilación.**

**A.3.14.5.5.16.1** Agregar 125 mL de ácido fosfórico y 25 mL de ácido hipofosforoso en aproximadamente 250 mL de agua en un matraz volumétrico de 500 mL.

**A.3.14.5.5.16.2** Enfriar a temperatura ambiente. Llevar al volumen con agua tipo I y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución semanalmente.

**A.3.14.5.5.17 Buffer de fosfatos pH 5.2.**

**A.3.14.5.5.17.1** Disolver 13.6 g de fosfato monobásico de potasio y 0.28 g de fosfato dibásico de sodio en aproximadamente 800 mL de agua tipo I en un matraz volumétrico de 1.0 L. Llevar al volumen con agua tipo I y mezclar, almacenarla en refrigeración.

**A.3.14.5.5.18 Buffer de fosfatos disolución de trabajo.**

**A.3.14.5.5.18.1** Agregar 1 mL de DOWFAX 2AI a 500 mL de la disolución buffer de fosfatos pH5.2 y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución diariamente.

**A.3.14.5.5.19 Reactivo de cloramina** **T.**

**A.3.14.5.5.19.1** Disolver 2.0 g de cloramina T trihidratada en aproximadamente 400 mL de agua tipo I en un matraz volumétrico de 500 mL.

**A.3.14.5.5.19.2** Llevar al volumen de aforo con agua tipo I y mezclar perfectamente. Preparar esta disolución diariamente.

**A.3.14.5.5.20 Reactivo piridina–ácido barbitúrico.**

**A.3.14.5.5.20.1** Pesar 7.5 g de ácido barbitúrico y transferir a un vaso de precipitado de 500 mL, enjuagar las paredes del vaso con 50 mL de agua tipo I.

**A.3.14.5.5.20.2** Con agitación agregar 37.5 mL de piridina y 7.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.

**A.3.14.5.5.20.3** Agregar 300 mL de agua tipo I y agitar hasta que el ácido barbitúrico esté completamente disuelto.

**A.3.14.5.5.20.4** Transferir el contenido del vaso cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 mL, llevar al volumen con agua tipo I y mezclar.

**A.3.14.5.5.20.5** Filtrar la disolución a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm.

**A.3.14.5.5.20.6** Preparar esta disolución semanalmente.

**A.3.14.5.5.21 Hidróxido de sodio 1 N.**

**A.3.14.5.5.21.1** Pesar aproximadamente 40.0 g de hidróxido de sodio, disolver y llevar a un volumen de 1 L con agua tipo I, mezclar.

**A.3.14.5.5.22 Hidróxido de sodio 0.1 N.**

**A.3.14.5.5.22.1** Medir 100 mL de la disolución de hidróxido de sodio 1 N, transferir a un matraz volumétrico de 1 L y llevar al volumen con agua tipo I, mezclar.

**A.3.14.5.5.23 Disolución indicadora de rodanina al 0.02 %.**

**A.3.14.5.5.23.1** Disolver 20 mg de p-dimetilamino benzal rodanina en 100 mL de acetona. Mantener esta disolución almacenada en frasco ámbar y en refrigeración.

**A.3.14.5.5.24 Disolución patrón de cloruro de sodio 0.0141 N.**

**A.3.14.5.5.24.1** Disolver 0.8241 g de NaCl (previamente secado a 140°C durante 2 h), en agua destilada y llevar a 1000 mL en un matraz volumétrico. Bajo estas condiciones 1.00 mL equivale a 500 µg del ion Cl**–**. Ajustar esta equivalencia al peso registrado.

**A.3.14.5.5.25 Disolución de cromato de potasio al 5%.**

**A.3.14.5.5.25.1** Disolver 50 g de K2CrO4 en aproximadamente 100 mL de agua. Añadir disolución de AgNO3 0.1 N hasta la formación de un precipitado color rojo. Dejar reposar 12 h; filtrar y diluir a 1 L con agua.

**A.3.14.5.5.26 Disolución patrón de nitrato de plata 0.02 N.**

**A.3.14.5.5.26.1** Disolver 3.27 g de AgNO3 en agua y llevar a un volumen de 1 L. Guardar la disolución en frasco color ámbar y en refrigeración.

**A.3.14.5.5.26.2** Si se utiliza una disolución comercial de nitrato de plata 0.1 N, diluir 200 mL de ésta a un volumen de 1000 mL con agua.

**A.3.14.5.5.27 Valoración de la disolución.**

**A.3.14.5.5.27.1** Tomar por triplicado una alícuota de 10 mL de la disolución de NaCl con material volumétrico y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL llevar a un volumen aproximado de 100 mL con agua. Adicionar 1 mL de disolución de cromato de potasio y titular con la disolución patrón de (AgNO3) 0.02 N hasta la aparición de la coloración amarillo-rojiza permanente.

**A.3.14.5.5.27.2** Preparar un blanco de reactivos utilizando 100 mL de agua conteniendo 1 mL de disolución de cromato de potasio.

**A.3.14.5.5.27.3** Calcular la normalidad de la disolución aplicando la siguiente ecuación:

**A.3.14.5.5.27.4 Disolución patrón de AgNO3 0.02 N.**

Dónde:

**N** = Normalidad.

**V** = alícuota tomada de la disolución patrón (10 mL).

**A** = mL gastados de AgNO3 0.02 N en la valoración del patrón.

**B** = mL gastados de AgNO3 0.02 N en la valoración del blanco.

Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

**A.3.14.5.5.28 Disolución patrón de cianuro de .**

**A.3.14.5.5.28.1** Disolver 2 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 900 mL de agua tipo I en un matraz volumétrico de 1.0 L.

**A.3.14.5.5.28.2** Agregar 0.2505 g de cianuro de potasio y agitar hasta que se disuelva.

**A.3.14.5.5.28.3** Llevar al volumen de 1000 mL con agua tipo I y mezclar perfectamente.

**A.3.14.5.5.28.4** Almacenar en recipiente ámbar y refrigerar. Si se almacena adecuadamente este reactivo es estable hasta por 4 semanas.

**A.3.14.5.5.29 Valoración de la disolución.**

**A.3.14.5.5.29.1** Medir 25 mL de esta disolución y diluir a 100 mL con disolución de NaOH 0.1 N, añadir aproximadamente 0.5 mL del indicador de rodanina. Titular con disolución valorada de AgNO3 0.02 N, hasta el primer cambio de color amarillo canario a salmón.

1 mL de solución de AgNO3 0.02 N equivale a 1.00 mg de CN**–**.

Esta disolución deberá valorarse semanalmente o antes de su uso.

**A.3.14.5.5.30 Disolución intermedia de cianuro de .**

**A.3.14.5.5.30.1** Con una pipeta volumétrica agregar 10 mL de disolución patrón de cianuro de en aproximadamente 80 mL de solución de NaOH (1.6 g de NaOH/L) en un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen de 100 mL con la solución de NaOH y mezclar perfectamente. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

**A.3.14.5.5.31 Disolución de trabajo de cianuro**

**A.3.14.5.5.31.1** Con una pipeta volumétrica agregar 10 mL de disolución de trabajo de cianuro de en aproximadamente 80 mL de solución de NaOH (1.6 g de NaOH/L) en un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen de 100 mL con la solución de NaOH y mezclar perfectamente. Preparar previamente a su uso y mantener en una botella de vidrio cerrada.

**A.3.14.5.5.31.2** Para obtener la solución anterior se puede utilizarse directamente, una disolución patrón comercial de con certificado de análisis trazable a patrones nacionales o internacionales la cual ya no requiere valoración.

**A.3.14.5.6 Procedimiento.**

**A.3.14.5.6.1** Seguir las instrucciones suministradas por el fabricante o el método estandarizado del laboratorio de análisis.

**A.3.14.5.6.2 Acondicionamiento del equipo para Análisis por Flujo Segmentado.**

**A.3.14.5.6.2.1 Estabilización del instrumento.**

**A.3.14.5.6.2.1.1** Conectar las mangueras de reactivos de la bomba al contenedor con la disolución de inicio.

**A.3.14.5.6.2.1.2** Establecer la velocidad de la bomba al 40% para permitir que fluya la disolución de inicio a través de todo el sistema.

**A.3.14.5.6.2.1.3** Verificar que la celda del detector esté libre de burbujas y el flujo sea constante con la disolución de inicio hasta la obtención de una línea base estable a 570 nm.

**A.3.14.5.6.2.2 Manejo del instrumento.**

**A.3.14.5.6.2.2.1** Instalar el cartucho como se muestra en el diagrama de flujo.

**A.3.14.5.6.2.2.2** Encender el equipo excepto la bomba y el digestor UV.

**A.3.14.5.6.2.2.3** Encender la bombilla de condensación y enfriamiento.

**A.3.14.5.6.2.2.4** Programar la temperatura de destilación del calentador con el controlador del módulo a 160°C.

**A.3.14.5.6.2.2.5** Verificar que el módulo de destilación del cianuro esté encendido y configurado como ilustra el diagrama de flujo.

**A.3.14.5.6.2.2.6** Conectar la línea de los reactivos de destilación, al contenedor de agua tipo I, así como el buffer de fosfatos, piridina ácido barbitúrico y cloramina T.

**A.3.14.5.6.2.3.7** Cuando la temperatura del calentador del módulo de destilación alcance aproximadamente 150°C encender la bomba y hacer fluir los reactivos a través del sistema. Encender el digestor UV.

**A.3.14.5.6.2.2.8** Una vez que la temperatura se ha estabilizado aproximadamente a 160°C verificar que:

**A.3.14.5.6.2.2.8.1** No haya líquido acumulado de reflujo en la bombilla de la cabeza de destilación.

**A.3.14.5.6.2.2.8.2** El líquido de condensación de la columna tenga una apariencia homogénea y brillante en la pared interna.

**A.3.14.5.6.2.2.8.3** Permitir la estabilización de la línea base.

**A.3.14.5.6.2.2.9** Analizar la curva de calibración, blancos, muestras y muestras control.

**A.3.14.5.6.2.2.10** Una vez finalizado el análisis apagar el módulo de calentamiento y permitir a la columna de vidrio regresar a temperatura ambiente. Purgar con disolución de inicio en todo el sistema al menos de 10 a 15 min, detener la bomba, liberar la tensión en todas las mangueras y apagar el equipo.

**A.3.14.5.6.2.2.11 Notas de operación.**

**A.3.14.5.6.2.2.11.1** Adicionar hidróxido de sodio al contenedor del desecho para asegurar que no se desprenda gas de ácido cianhídrico.

**A.3.14.5.6.2.2.11.2** Periódicamente (1 o 2 veces a la semana) enjuagar con hidróxido de sodio 1 N durante 10-15 min a temperatura ambiente la cabeza de destilación y reflujo para prevenir la acumulación de depósitos, posteriormente enjuagar con grandes cantidades de agua tipo I.

**A.3.14.5.6.2.2.11.3** Advertencia: Nunca ensamble la disolución de hidróxido de sodio 1N a través del sistema de destilación.

**A.3.14.5.6.2.2.11.4** No bombear líquidos que contengan surfactantes a través del sistema de destilación en caliente.

**A.3.14.5.6.2.2.11.5.** En el módulo de destilación utilizar una manguera pre-humedecida de polietileno para reducir daños o rupturas por lo caliente.

**A.3.14.5.6.2.2.11.6** Si se acumula el líquido en la bombilla de reflujo de la cabeza de destilación:

**A.3.14.5.6.2.2.11.7** Desconectar la manguera ácida del desecho no volátil y permitir que se drene el líquido.

**A.3.14.5.6.2.2.11.8** Reconectar la manguera y verificar que el baño de destilación esté funcionando adecuadamente, asegurar que la bobina de destilación esté situada adecuadamente sobre él así como el calentador y que la cabeza de destilación esté purgada con la bobina del calentador.

**A.3.14.5.6.2.2.11.9** Si persisten los problemas apagar el baño del calentador del destilador y esperar a que el vidrio regrese a temperatura ambiente. Purgar el sistema con NaOH 1 N, enjuagar con agua tipo I y secar con acetona.

**A.3.14.5.6.2.2.11.10** Si el problema aún continúa, elevar la temperatura en 5.0°C hasta que la destilación se realice de manera suave. No incrementar la temperatura por encima de 180°C.

**A.3.14.5.7 Cálculos.**

Obtener el resultado en mg de directamente de la curva de calibración. En caso de que alguna de las muestras rebasa el intervalo de trabajo hacer una dilución de la muestra y considerar este factor en el cálculo final.

**A.3.14.5.8 Expresión de los resultados.**

**A.3.14.5.8.1** La expresión de resultados debe ser en  ycon dos cifras decimales.

**A.3.15 Métodos para la determinación de radiactividad alfa y beta total.**

**A.3.15.1 Método de medición de radioactividad por centelleo líquido.**

**A.3.15.1.1 Fundamento.**

La radioactividad en el ambiente puede estar presente tanto de manera natural como artificial, por lo que una medición regular de los niveles de actividad alfa y beta en agua es invaluable para detectar de forma oportuna una posible contaminación.

La técnica de centelleo líquido se basa en un recuento interno de la radiación de la muestra mediante la mezcla de un líquido centelleador (sensor) y la solución portadora del radionúclido, constituyendo fuente radiactiva y detector todo en uno, donde la eficiencia del recuento está  determinada por la naturaleza de la muestra y no con la geometría detector-fuente, ya que la radiación ionizante genera destellos luminosos en ciertos sólidos, la luz que es detectada se transforma en un pulso eléctrico para permitir su medición, con una mínima preparación de la muestra y algunos días de reposo.

**A.3.15.1.2 Medidas de seguridad y disposición de desechos.**

Utilizar campana de extracción y guantes de látex para el trabajo con muestras marcadas, muestras de intercomparación o muestras por arriba del fondo. Tener precaución con el manejo del tiempo muerto del detector para evitar su saturación.

**A.3.15.1.3 Aparatos e Instrumentos.**

**A.3.15.1.3.1** Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

**A.3.15.1.3.2** Parrilla de calentamiento con agitación

**A.3.15.1.3.3** Campana de extracción

**A.3.15.1.3.4** Horno

**A.3.15.1.3.5** Espectrómetro con detector de centelleo líquido.

**A.3.15.1.3.6** Potenciómetro.

**A.3.15.1.4 Materiales.**

**A.3.15.1.4.1** Viales de polietileno recubiertos de PTFE.

**A.3.15.1.4.2** Tiras reactivas para medición de pH.

**A.3.15.1.4.3** Envases de plástico de al menos 1L.

**A.3.15.1.4.4** Probetas de diferentes volúmenes.

**A.3.15.1.4.5** Vasos de precipitado de diferentes volúmenes.

**A.3.15.1.4.6** Otros (material común de laboratorio)

**A.3.15.1.5 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.15.1.5.1** Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua tipo II.

**A.3.15.1.5.2** Agua tipo II.

**A.3.15.1.5.3** Líquido centelleador, con alto grado admisión de agua.

**A.3.15.1.5.4** Ácido nítrico (HNO3).

**A.3.15.1.5.5** Etanol 95%.

**A.3.15.1.5.6** Cromato de sodio Na2CrO4.

**A.3.15.1.5.7** Cloruro férrico FeCl3.6H2O.

**A.3.15.1.5.8** Blanco de reactivos. Muestra de agua tipo II procesada con la misma metodología que las muestras problema.

**A.3.15.1.5.9** Estándares. Utilizar disoluciones certificadas o trazables a una fuente certificada.

**A.3.15.1.5.9.1** Para emisores beta se utilizan principalmente 3H, 210Pb, 210Bi, 99Tc, 90Sr-, 90Y y 40K.

**A.3.15.1.5.9.2** Para emisores alfa 239Pu.

**A.3.15.1.6 Procedimiento**

**A.3.15.1.6.1 Calibración.**

**A.3.15.1.6.1.1** Para la calibración es necesario preparar:

**A.3.15.1.6.1.1.1** Soluciones de estándar en agua destilada.

**A.3.15.1.6.1.1.2** Agente extintor, cromato de sodio Na2CrO4 o cloruro férrico FeCl3.6H2O.

**A.3.15.1.6.1.1.3** Preparación de patrones de calibración.

**A.3.15.1.6.1.1.3.1** Trasferir a viales diferentes cantidades de solución estándar de emisores alfa y de beta y llevar a 10 mL con agua destilada, adicionar un volumen de 10 mL de solución de centelleo. Dejar en reposo por al menos 18 días para asegurar el equilibrio. Ajustar el pH a 1.5 en caso de requerirse.

**A.3.15.1.6.2** **Acondicionamiento de equipo.**

**A.3.15.1.6.2.1** Se realiza la verificación del equipo, ajustándolo según especificaciones del fabricante en la eficiencia de detección establecida por el laboratorio.

**A.3.15.1.6.3 Preparación y análisis de las muestras.**

**A.3.15.1.6.3.1** Las muestras deben ser colectadas en envases de plástico en un mínimo de 1 L, acidificándolas en el momento del muestreo con ácido nítrico hasta obtener un pH entre 1.5 y 2.5, verificar el pH final con tira reactiva.

**A.3.15.1.6.3.2** Preparar el blanco acidificando un volumen de 10 mL de agua destilada hasta un pH de 1.5, adicionar 10 mL de solución de centelleo, contenidos en un vial, agitar y colocar junto con los patrones previamente preparados.

**A.3.15.1.6.3.3** Las muestras a determinar se preparan en un volumen de 10 mL en serie de viales, adicionando a cada muestra 10 mL de solución de centelleo y se dejan en reposo por al menos 2 días para asegurar el equilibrio.

**A.3.15.1.6.4** **Medición directa.**

**A.3.15.1.6.4.1** Se procede a medir colocando la serie de patrones, blanco y muestras en el equipo de centelleo el tiempo necesario para obtener una estadística adecuada, siguiendo el procedimiento para actividad alfa y para actividad beta.

**A.3.15.1.7 Cálculos**

**A.3.15.1.7.1 Cálculo de actividad alfa.**

**Actividad = (rg,α – r0,α) / (εα. 𝓋)**

En donde:

**rg, α** es la medición de actividad alfa.

**r0, α** es la medición del blanco de la medición alfa.

**εα** es la eficiencia de medición alfa.

**𝓋** es el volumen de muestra.

**A.3.15.1.7.2 Cálculo de actividad beta.**

**Actividad = (rg,β – r0,β) / (εβ. 𝓋)**

En donde:

**rg, 𝝱** es la medición de actividad beta.

**r0**, es la medición del blanco de la medición beta.

**ε𝝱** es la eficiencia de medición beta.

**𝓋** es el volumen de muestra.

**A.3.15.1.8 Informe de resultados.**

El resultado de actividad alfa y beta total se reportará como Bq/L (Becquerel por litro), reportando también para la correcta interpretación, el estándar de calibración utilizado.

**A.3.15.2. Medición de la radiactividad alfa y beta global por evaporación**

**A.3.15.2.1 Fundamento:** la técnica de detección de las partículas alfa y beta de una muestra de agua se basa en el poder de ionización de estas partículas en los gases inertes y la respuesta eléctrica obtenida cuando el sistema opera en un voltaje correspondiente a la región proporcional, así como en la discriminación electrónica de las señales eléctricas de partículas alfas y betas. Para que la muestra esté en condiciones de ser contada en el sistema de detección se debe tomar un volumen determinado por las condiciones de concentración de sólidos disueltos, y ser concentrada en una plancheta metálica de 20 cm2 en forma de finas deposiciones (espesor másico).

Para la estimación del volumen a tomar es necesario contar con el dato de la concentración de sólidos disueltos, lo cual se realiza a través de la medición de la conductividad en cada muestra. Las muestras son evaporadas lentamente en parrillas de calentamiento, siendo adicionadas previamente con ácido nítrico para propiciar la digestión de material orgánico.

El método debe ser validado, tomando en cuenta las características de las muestras a analizar, y los límites establecidos en la normativa aplicable; por lo que se deben emplear estándares de referencia alfa y beta con energías características y el cálculo de eficiencia de conteo en función de los espesores másicos.

**A.3.15.2.2 Interferencias y limitaciones del método:** La presencia de una gran cantidad de sólidos disueltos en la muestra provoca que se obtengan depósitos gruesos en las planchetas y por lo tanto altos espesores másicos que afectan la detección, sobre todo de las partículas alfa de menor penetración que las partículas beta, disminuyendo los eventos de interacción con el gas detector y el número de cuentas, e incrementando la incertidumbre en el conteo.

La presencia de sólidos suspendidos debe ser evitada; para lo cual se recomienda en estos casos una filtración previa a la evaporación.

Algunos emisores dependiendo de su naturaleza fisicoquímica no son factibles a determinar por el método de depósito en plancheta y conteo mediante sistema proporcional de flujo; algunos de ellos como el yodo  pueden ser eliminados a temperaturas de secado de 105 °C.

La preservación de las muestras con ácido nítrico interfiere en la determinación del volumen a tomar en función de la conductividad (sólidos disueltos), así como en la volatilidad de los radioyodos y radiocesios a la temperatura de evaporación.

El volumen de muestra determinado por la conductividad, tiene como limitantes prácticos y técnicos, el manejo de volúmenes mayores a 1 L y menores a 50 mL.

**A.3.15.2.3 Aparatos e Instrumentos.**

A.3.15.2.3.1 Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

A.3.15.2.3.2 Parrilla de calentamiento con agitación.

A.3.15.2.3.3 Campana de extracción

A.3.15.2.3.4 Estufa de secado

A.3.15.2.3.5 Conductímetro.

A.3.15.2.3.6 Sistema detector proporcional de flujo de bajo fondo

**A.3.15.2.3.6.1** Para el conteo, según la región de voltaje (diferencia de potencial) donde se realizará la medición, se puede utilizar un contador proporcional de ventana delgada o contadores alternativos como cámara de ionización, proporcional interno o Geiger, que permitan acomodar una charola de conteo.

El contador proporcional de ventana delgada, fuertemente blindado, de flujo de gas, con circuito anticoincidencia es recomendable debido a sus características de operación (rango de medición amplio pero no tanto como el del contador proporcional interno, bajo fondo y alta sensibilidad).

El sistema contador proporcional interno tiene mayor nivel de fondo para el conteo beta, pero una mayor eficiencia de conteo en actividad alfa.

En el contador Geiger, la actividad alfa no puede ser determinada de forma separada.

**A.3.15.2.4 Materiales.**

**A.3.15.2.4.1** Probetas de diferentes volúmenes.

**A.3.15.2.4.2** Vasos de precipitado de diferentes volúmenes.

**A.3.15.2.4.3** Propipeta.

**A.3.15.2.4.4** Piseta.

**A.3.15.2.4.5** Pipeta Pasteur o desechable.

**A.3.15.2.4.6** Desecador.

**A.3.15.2.4.7** Pinzas.

**A.3.15.2.4.8** Charola de plástico.

**A.3.15.2.4.9** Equipo de filtración para embudos tipo büchner, filtro de membrana o de vidrio poroso

**A.3.15.2.4.10** Sistema de vacío.

**A.3.15.2.4.11** Matraz Kitazato.

**A.3.15.2.4.12** Papel absorbente.

**A.3.15.2.4.13** Papel filtro Whatman No. 42 de 5 cm de diámetro.

**A.3.15.2.4.14** Papel mylar.

**A.3.15.2.4.15** Plancheta acanalada de acero inoxidable de 20 cm2 de área.

**A.3.15.2.4.16** Plancheta de plástico 20 cm2 de área, con anillo externo.

**A.3.15.2.4.17** Otros (material común de laboratorio)

**A.3.15.2.5** Reactivos y disoluciones. Grado reactivo salvo que se indique lo contrario.

**A.3.15.2.5.1** Acetona.

**A.3.15.2.5.2** Solución indicadora de anaranjado de metilo al 0.05%.

**A.3.15.2.5.3** Ácido nítrico, HNO3 1N

**A.3.15.2.5.4** Agua tipo II

**A.3.15.2.5.5** Acetona

**A.3.15.2.5.6** Gas detector P10 (mezcla de Argón- Metano).

**A.3.15.2.5.7** Solución de acrílico transparente, (puede utilizarse una solución de barniz transparente para uñas con acetona).

**A.3.15.2.5.9** Estándares. Como estándares deberán utilizarse soluciones certificadas o trazables a un organismo metrológico nacional y/o internacional.

**A.3.15.2.5.9.1** Para el cálculo de la eficiencia por autoabsorción en la determinación de actividad beta total se recomienda un estándar emisor beta puro como Sr-90 en equilibrio con Itrio-90 certificado por NIST o equivalente.

**A.3.15.2.5.9.2** Para la medición de actividad alfa total, los estándares recomendados son uranio natural, Torio-230, Plutonio-239 y Americio 241, considerar para la adquisición de estándares, el hecho de que materiales como el plutonio son clasificados como estratégicos y por tanto difíciles de adquirir.

**A.3.15.2.6.1** Optimización del equipo. Los parámetros mínimos que deben optimizase en el equipo proporcional de flujo de bajo fondo son: voltaje de operación alfa, voltaje de operación beta, traslape y fondo alfa y beta. Una vez establecidos éstos parámetros, las determinaciones de alfa-beta global se realizarán en el voltaje de operación beta en modo simultáneo, para ello se emplean estándares radiactivos de emisores alfa y beta.

**A.3.15.2.6.2 Determinación de pérdida de radiación por auto-absorción**.

Para las energías críticas alfas de 8 MeV y de betas de 60 KeV, se debe considerar el fenómeno de autoabsorción, por lo que se recomienda que los espesores másicos en los depósitos en las planchetas no sean mayores a los 10 mg/cm2, lo cual se logra depositando soluciones con bajo contenido de sólidos, o bien que éstos hayan sido reducidos por digestión con ácido nítrico, previo al depósito en la plancheta.

**A.3.15.2.6.3 Calibración de las eficiencias del conteo de emisores alfa y beta**

**A.3.15.2.6.3.1** Determinar la eficiencia de conteo de emisores beta mediante la preparación de muestras de prueba adicionadas con soluciones estándares de actividad conocida y cantidades crecientes de sales disueltas.

**A.3.15.2.6.3.2** Pesar cantidades crecientes de una sal (como Na2CO3), desde 1 a 10 mg y disolverlas en una cantidad mínima de agua a fin de obtener en el evaporado, un espesor másico similar a las esperadas en las muestras, desde 1 a 10 mg/cm2.

**A.3.15.2.6.3.3** Adicionar a cada solución preparada en A.3.15.2.6.3.2 la misma concentración de un estándar emisor beta (como Sr-90), de actividad conocida, y depositar en las planchetas metálicas mediante evaporación controlada, hasta sequedad, a fin de contar con capas uniformes.

**A.3.15.2.6.3.4** Completar el secado en estufa sin flujo de aire a 103 - 105°C, dejar enfriar en desecador, pesar y fijar el evaporado con la solución de barniz y llevar a conteo en el sistema proporcional de flujo. Obtener la razón entre las desintegraciones por segundo esperadas (actividad adicionada) y las cuentas por minuto obtenidas, eficiencia, para los diferentes espesores másicos probados. Graficar la eficiencia como una función del espesor másico y ajustar a un modelo matemático para conocer los parámetros de comportamiento. Vigilar la uniformidad del depósito en las planchetas, particularmente en el rango de 0 a 3 mg/cm2.

**A.3.15.2.6.3.5** Para la determinación de la eficiencia de emisores alfa, seguir el paso A.3.15.2.6.3.2 al A.3.15.2.6.3.4 utilizando una solución de estándar de Americio 241, sal de uranio natural en equilibrio secular (no utilizar uranio empobrecido), Torio-230 o Plutonio 239.

**A.3.15.2.6.3.6** Cuando la actividad beta es contada en presencia de la actividad alfa mediante sistemas de conteo proporcionales de flujo de gas (en la meseta beta), las partículas alfa también son contadas. Este resultado puede afectarse por el espesor másico del depósito; ya que las partículas alfa son más fácilmente absorbidas por el incremento del espesor de la muestra que las partículas beta, las proporciones de las cuentas alfa/beta varían. Si la actividad alfa es significativa realizar las correcciones por traslape.

**A.3.15.2.6.4. Incertidumbre estándar de conteo:**

Para determinar la incertidumbre estándar de conteo, s de cuentas por minuto (cpm) netas (n), se aplica la siguiente ecuación:

**scpm n=√scpm t2+scpm f2**

Donde

**scpm n**= incertidumbre de conteo neto

**scpm t**= incertidumbre de conteo total

**scpm n**= incertidumbre de conteo de fondo

**A.3.15.2.6.5 Análisis de la muestra mediante evaporación**

**A.3.15.2.6.5.1** Para que las muestras sean consideradas “aptas” para análisis por ésta técnica, el espesor másico obtenido deberá estar dentro del rango de la curva de calibración de eficiencia. En caso de que el espesor másico obtenido salga fuera del rango de calibración, se puede realizar la cuantificación de la actividad alfa mediante un método de separación selectivo de los emisores alfa, tal como el Método de Coprecipitación.

**A.3.15.2.6.5.2** Evitar una distribución de sólidos desigual, particularmente en el rango de 0 a 3 mg/cm2.

**A.3.15.2.6.5.3** **Actividad total de la muestra:**

**A.3.15.2.6.5.3.1** Para estimar el volumen a emplear de muestra, Realizar una curva de conductividad contra volumen, empleando muestras de 01.g de KCl en 50,100, 250, 500 y 1000 ml de agua tipo II, obtener la conductividad y elaborar una curva y obtener el ajuste apropiado. Medir la conductividad a la muestra y estimar el volumen a utilizar.

**A.3.15.2.6.5.3.2** Para muestras que no requieren filtración, colocar el volumen de muestra calculado en un vaso de precipitado, adicionar 1 o 2 gotas de indicador anaranjado de metilo, y agregar ácido nítrico 1 N hasta el vire a rosa, y se somete a evaporación.

**A.3.15.2.6.5.3.3** Evaporar hasta un volumen mínimo e iniciar el depósito del líquido en una plancheta metálica acanalada, cuidando que la capa de sólido resultante sea homogénea

**A.3.15.2.6.5.3.4** Completar el secado en estufa de secado sin flujo de aire a 103 a 105°C.

**A.3.15.2.6.5.3.5** Enfriar en desecador y pesar.

**A.3.15.2.6.5.3.6** Fijar el evaporado con la solución de barniz con acetona.

**A.3.15.2.6.5.3.7** Contar la actividad alfa y/o beta.

**A.3.15.2.6.5.3.8** Almacenar la muestra en un desecador si se desea verificar el decaimiento.

**A.3.15.2.6.5.4 Actividad de la materia disuelta** (Sólidos solubles).

Proceder como en A.3.15.2.6.5.3.1. Utilizar una muestra filtrada a través de un filtro de membrana de 0.45 µm.

**A.3.15.2.6.5.4.1** Para muestras que tengan solidos insolubles visibles se recomienda filtrar el volumen indicado por la conductividad con un mínimo de 50 y un máximo de 1000 mL, la muestra se filtra con papel filtro whatman No 42 de 5 cm. Utilizar la muestra filtrada y proceder como en A.3.15.2.6.5.3.1

**A.3.15.2.6.5.5** Actividad de la materia suspendida. Cuando la muestra presenta sólidos insolubles visibles se requiere filtrar la muestra.

**A.3.15.2.6.5.5.1** Tomar el volumen indicado por la conductividad de la muestra.

**A.3.15.2.6.5.5.2** Filtrar en papel filtro Whatman No 42 de 5 cm de diámetro, se recomienda filtrar el volumen indicado por la conductividad, que puede ir desde un mínimo de 50 mL y un máximo de 1000 mL.

**A.3.15.2.6.5.5.3** Secar en estufa sin flujo de aire durante 30 minutos a 103-105 °C.

**A.3.15.2.6.5.5.4** Transferir el papel filtro a planchetas plásticas de 5 cm de diámetro.

**A.3.15.2.6.5.5.5** Enfriar en desecador, pesar, y cubrir con papel mylar fijándolo mediante el anillo externo, y contar la actividad alfa y beta en un sistema proporcional de flujo.

**A.3.15.2.6.5.5.6** Si las partículas de la muestra tienden a dispersarse, tratar la muestra con unas pocas gotas de solución de acrílico transparente, secar al aire y contar.

**A.3.15.2.6.5.6** Actividad de la materia suspendida (Sólidos insolubles): Si es imposible filtrar las aguas en un tiempo razonable, solo informar actividad global.

**A.3.15.2.7 Cálculos.**

**A.3.15.2.7.1** Actividad alfa. Calcular la actividad alfa en Bequerel por litro (Bq/L), mediante la siguiente ecuación:

**𝐴𝑙𝑝ℎ𝑎 (𝐵𝑞𝐿)=𝑐𝑝𝑚 𝑛 60 𝑒 𝑣**

Dónde:

**cpm n** = cuentas por minuto netas alfa (cuentas de la muestra – cuentas del fondo).

**e** = eficiencia total del detector calibrado (ver **A.3.15.2.6.3**).

**v** = volumen de la muestra empleada, L.

Expresar el error del conteo como se describe en **A.3.15.2.6.4.2.**

**A.3.15.2.7.2** **Actividad beta.**

Calcular la actividad beta  en Bequerel por litro (Bq/L), mediante la siguiente ecuación:

**𝑏𝑒𝑡𝑎 (𝐵𝑞𝐿)=𝑐𝑝𝑚 𝑛 60 𝑒 𝑣**

Dónde:

**cpm n** = cuentas por minuto netas beta (cuentas de la muestra – cuentas del fondo).

**e** = eficiencia total del detector calibrado (ver **A.3.15.2.6.3**).

**v** = volumen de la muestra empleada, L.

Expresar el error del conteo como se describe en **A.3.15.2.6.4.2.**

Calcular e informar la incertidumbre estándar combinada indicando el factor de cobertura K, empleando todos las fuentes involucradas o por lo menos involucrar la incertidumbre de conteo.

**A.3.15.2.8 Informe de resultados.**

**A.3.15.2.8.1** En el informe de resultados de la prueba de radiactividad incluir el resultado de actividad alfa y beta total y se informará como Bq/L (Becquerel por litro).

**A.3.16 Métodos de prueba para la determinación de metales por plasma inductivamente acoplado con espectrometría de masas (ICP-MS) o plasma inductivamente acoplado con espectrometría de emisión óptica (ICP-OES).**

**A.3.16.1 Método por plasma inductivamente acoplado con espectrometría de masas (ICP-MS) para la determinación de aluminio, antimonio, arsénico, bario, cadmio, cobre, cromo, manganeso, mercurio, níquel, plomo, selenio y plata.**

**A.3.16.1.1 Generalidades.**

**A.3.16.1.1.1 Fundamento.**

El método mide los iones producidos por una radio-frecuencia del plasma inductivamente acoplado. Las especies de los analitos presentes en un líquido son nebulizados y el aerosol resultante es transportado por el gas argón a la antorcha de plasma. Los iones producidos por las altas temperaturas son arrastrados en el gas de plasma y se introducen, por medio de una interfase al espectrómetro de masas. Los iones producidos en el plasma se clasifican en función de sus relaciones masa-carga y se cuantifican con un canal multiplicador de electrones. Se deben evaluar las interferencias y validar las correcciones aplicadas o los datos marcados para indicar problemas. La corrección de interferencias debe incluir la compensación por los iones de fondo aportados por el gas de plasma, reactivos y componentes de la matriz de la muestra.

El plasma inductivamente acoplado con espectrometría de masas (ICP-MS) es aplicable a la determinación de concentraciones menores a ng/L de un gran número de elementos en muestras de agua.

Se requiere un estándar interno adecuado para cada analito determinado por ICP-MS. Los estándares internos recomendados son 6Li, 45Sc, 89Y, 103Rh, 115In, 159Tb, 169Ho, y 209Bi. El estándar interno de litio debe tener una gran abundancia de 6Li, de modo que la interferencia de litio nativo en la muestra se reduzca al mínimo. Puede ser necesario utilizar otros elementos como estándar interno cuando las muestras contienen cantidades nativas significativas del estándar interno recomendado.

**A.3.16.1.1.2 Interferencias**

**A.3.16.1.1.2.1 Interferencias isobáricas elementales,** son causadas por isótopos de diferentes elementos que forman iones atómicos con la misma relación nominal de masa-carga (m/z). Debe utilizarse un sistema de datos para corregir estas interferencias. Esto implica determinar la señal de otro isótopo del elemento de interferencia y restar la señal apropiada de la señal isotópica del analito. Ya que los instrumentos comerciales de ICP-MS nominalmente proporcionan una unidad de resolución al 10% de la altura del pico, corrientes iónicas muy altas en masas adyacentes también pueden contribuir a las señales de iones a la masa de interés. Aunque este tipo de interferencia es poco frecuente, no se corrige fácilmente, y las muestras presentan un problema significativo. Se puede requerir utilizando otro isótopo mejorar la resolución, la separación de la matriz, o el análisis verificado y documentado, o el uso de otro método.

**A.3.16.1.1.2.2 Interferencias de iones isobáricos moleculares y doblemente cargados,** son causadas por los iones que consisten en más de un átomo o carga, respectivamente. En la literatura han sido identificadas la mayoría de las interferencias isobáricas que pueden afectar a las determinaciones en ICP-MS. Los ejemplos incluyen al ión 75ArCl en la señal de 75As y los iones de MoO+ en los isótopos de cadmio. La corrección de las interferencias isobáricas moleculares se basa en las abundancias isotópicas naturales. Los coeficientes más precisos para un instrumento pueden determinarse a partir de la relación de las señales de isótopos netos observados para una solución estándar en una concentración que proporcione un conteo estadístico adecuado (˂ 1 %). Debido a que la abundancia natural de 35Cl (75.77 %) es 3.13 veces la abundancia de 37Cl (24.23 %), la corrección de cloruro para arsénico se puede calcular (aproximadamente) de la siguiente manera (en donde la contribución de 38Ar37Cl+ para m/z 75 es un insignificante 0.06 % de la señal de 40Ar35Cl+):

La señal Corregida de arsénico (usando abundancias de isótopos naturales para aproximaciones de coeficientes) = (señal de m/z 75) - (3.13) (señal de m/z 77) + (2.73) (señal de m/z 82),

Donde el término final se ajusta para cualquier contribución de selenio para una m/z 77.

**Nota:** Los valores de arsénico pueden estar parcialmente altos por este tipo de ecuación cuando la señal neta para una m/z 82 es causada por iones distintos al 82Se+, (por ejemplo, 81BrH+ de residuos de bromo).

En cuanto a la ecuación de arsénico mostrada anteriormente, los coeficientes se podrían mejorar. Los coeficientes más apropiados para un instrumento en particular se pueden determinar a partir de la relación de las señales de isótopos netos observados para una solución estándar a una concentración que proporcione un recuento adecuado preciso (<1 por ciento).

Similarmente, la señal corregida de cadmio (usando la abundancia de los isótopos naturales para la aproximación de los coeficientes) = (señal de m/z 114) - (0.027) (señal de m/z 118) - (1.63) (señal de m/z 108).

Donde los 2 últimos términos se ajustan para cualquier contribución de 114Sn+ o 114MoO+ a m/z 114.

**Nota:** Los valores de cadmio pueden ser parcialmente bajos por este tipo de ecuación cuando los iones 92ZrO+ contribuyen a m/z 108, pero el uso de m/z 111 para Cd están aún sujetos para las interferencias aditivas directas (94ZrOH+) y las indirectas (90ZrO+) cuando está presente el Zr.

**A.3.16.1.1.2.2.1** Además se puede utilizar la quelación en fase sólida para eliminar las interferencias isobáricas de elementos y fuentes moleculares. El método se basa en resinas quelantes tales como iminodiacetato u otras resinas adecuadas que selectivamente concentran a los elementos de interés mientras que eliminan los elementos de interferencia de la muestra.

**A.3.16.1.1.2.3 Interferencias físicas,** están asociadas con los procesos de nebulización y de transporte de la muestra, así como con la eficiencia de transmisión de iones. Los procesos de nebulización y de transporte pueden ser afectados si un componente de la matriz provoca un cambio en la tensión superficial o en la viscosidad. Los cambios en la composición de la matriz pueden causar una supresión o un incremento significativo de la señal. También los sólidos disueltos se pueden depositar en la punta del nebulizador y en la interfaz de los skimmers reduciendo el tamaño del orificio y el desempeño del instrumento. Se recomienda disminuir los niveles de sólidos totales por debajo de 0.2% (2.000 mg/L) para minimizar la deposición sólida. Además se puede utilizar un estándar interno para corregir las interferencias físicas, si se compara con el analito, de modo que los dos elementos estén igualmente afectados por los cambios de la matriz. Cuando se presentan interferencias físicas mayores en una muestra, se observa una supresión significativa de las señales del estándar interno (a menos del 30% de las señales en el estándar de calibración), generalmente se elimina el problema Diluyendo cinco veces la muestra (1+4) (ver A.3.16.1.6.3).

**A.3.16.1.1.2.4 Interferencias de memoria**, pueden ocurrir cuando hay grandes diferencias de concentración entre las muestras o los estándares que se analizan de forma secuencial. El depósito de la muestra en el muestreador o en los conos skimmer, spray chamber y el tipo de nebulizador, afectan la magnitud de las interferencias de memoria. El período de lavado entre las muestras debe ser lo suficientemente largo para eliminar interferencias significativas de memoria.

**A.3.16.1.2 Aparatos e Instrumentos**

**A.3.16.1.2.1** Plasma inductivamente acoplado con espectrometría de masas (ICP-MS)

**A.3.16.1.2.1.1** Se requiere un sistema capaz de proporcionar una resolución, mayor o igual a 1.0 uma al 10 % de la altura del pico. El sistema debe tener un intervalo de masa de al menos 6 a 240 uma y un sistema de datos que permita correcciones de interferencias isobáricas y la aplicación de la técnica de estándar interno. Se recomienda el uso de un controlador de flujo de masa para el nebulizador de argón y una bomba peristáltica para la solución de la muestra.

**A.3.16.1.2.2** Pipetas volumétricas de pistón de 10 a 100 µL.

**A.3.16.1.3 Material**

**A.3.16.1.3.1** Matraces volumétricos de polipropileno de 10, 25, 50, 100 y 200 mL

**A.3.16.1.3.2** Vasos de precipitados de diferentes volúmenes

**A.3.16.1.3.3** Frascos de diferentes volúmenes de polietileno o fluorocarbono (TFE ó PFA)

**A.3.16.1.4 Reactivos y disoluciones.**

**A.3.16.1.4.1** Los ácidos utilizados en la preparación de estándares y en el procesamiento de la muestra deben ser de alta pureza. Se recomiendan ácidos bidestilados, debido a la alta sensibilidad del ICP-MS. Utilizar ácido nítrico menor al 2 % (v/v) para minimizar el daño de la interfaz y para reducir las interferencias de iones moleculares isobáricos con los analitos. Se han observado mayores interferencias de iones moleculares cuando se utiliza ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. Sin embargo concentraciones de antimonio y plata entre 50 a 500 µg/L requieren de HCl 1% (v /v) para estabilizarse; para concentraciones mayores de 500 µg/L de plata (Ag) será necesario una concentración mayor de HCl. En consecuencia, disminuirá la precisión de los analitos que requieren correcciones moleculares debido a la presencia de iones cloruro tales como As y V.

**A.3.16.1.4.2** Agua tipo I.

**A.3.16.1.4.3** Soluciones patrón estándar para cada analito pueden ser comprados o preparados a partir de productos químicos de ultra-alta pureza (99.99 % o de mayor pureza).

**A.3.16.1.4.4 Solución patrón de estándar interno de bismuto** (Bi2O3). 1 mL= 100 µg Bi: Disolver 0.1115 g de Bi2O3 en una cantidad mínima de HNO3 diluido, adicionar 10 mL de HNO3 concentrado y diluir a 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.5** **Solución patrón de estándar interno de holmio** (Ho2 (CO3)2•5H2O), 1 mL= 100 µg Ho: Disolver 0.1757 g Ho2 (CO3)2•5H2O en 10 mL de agua grado reactivo y 10 mL de HNO3. Después de la disolución, calentar la solución y desgasificar. Añadir 10 mL de. HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.6** **Solución patrón de estándar interno de indio**. 1 mL= 100 µg In: Disolver 0.1000 g de indio metálico en 10 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.7** **Solución patrón de estándar interno de litio** (Li2CO3). 1 mL= 100 µg 6Li: Disolver 0.6312 g - átomo- 95 % 6Li, Li2CO3 en 10 mL de agua grado reactivo y 10 ml de HNO3. Después de la disolución, calentar la solución y desgasificar. Añadir 10 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.8** **Solución patrón de estándar interno de rodio** (NH4)3RhCl6). 1 mL= 100 µg de Rh: Disolver 0.3593 g de hexaclorodato de amonio (III) (NH4)3RhCl6) en 10 mL de agua grado reactivo. Añadir 100 ml de HCl concentrado y diluir a 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.9** **Solución patrón de estándar interno de escandio** (Sc2O3). 1 mL = 100 µg Sc: Disolver 0.15343 g Sc2O3 en 10 mL de HNO3 (1+1) caliente. Añadir 5 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.10** **Solución de patrón de estándar interno de terbio** (Tb2 (CO3)3.5 H2O). 1 mL = 100 µg Tb: Disolver 0.1828 g Tb2 (CO3)3.5 H2O en 10 mL de HNO3 (1+1). Después de la disolución, calentar y desgasificar. Añadir 5 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.11** **Solución de patrón de estándar interno de itrio** (Y2(CO3)3 .3 H2O). 1 mL = 100 µg Y: Disolver 0.2316 g Y2(CO3)3 .3 H2O en 10 mL de HNO3 (1+1. Adicionar 5 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.12 Solución estándar de interferencia de titanio** ((NH4)2TiF6).  1 mL = 100 µg Ti: Disolver 0.4133 g (NH4)2TiF6 en agua grado reactivo. Adicionar 2 gotas de HF concentrado y diluir a 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.13** **Solución estándar de interferencia de molibdeno** ((NH4)2MoO4). 1 mL = 100 µg Mo: Disolver 0.2043 g (NH4)2MoO4 en agua grado reactivo. Diluir hasta 1000 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.14** **Solución estándar conservadora de Oro para mercurio** (AuCl3).1 mL = 100 µg: Se recomienda la compra de la solución de AuCl3 de alta pureza preparada en matriz de ácido clorhídrico diluido.

**A.3.16.1.4.15** **Mezcla de soluciones estándar de calibración**. Diluir cada una de las soluciones estándar a niveles de concentración en el intervalo lineal para el instrumento en HNO3 al 1 % (v / v). Las soluciones estándar de calibración deben contener una concentración adecuada de un estándar interno apropiado para cada analito. Los estándares internos se pueden adicionar en línea al momento del análisis mediante un segundo canal de la bomba peristáltica y un manifold de mezclado apropiado. Generalmente, un estándar interno no debe tener una uma mayor de 50 con respecto al analito. Los estándares internos recomendados incluyen 6Li, 45Sc, 89Y, 103Rh, 115In, 159Tb, 169Ho, y 209Bi. Antes de preparar la mezcla de estándares, cada solución concentrada se debe analizar por separado para determinar las posibles interferencias espectrales o la presencia de impurezas. Tener cuidado al preparar la mezcla de estándares para que los elementos sean compatibles y estables. Transferir las disoluciones de mezcla de estándares en envases de fluorocarbono ( FEP), lavadas con ácido para su almacenamiento.

Se deben preparar estándares vigentes, según sea necesario, ya que la concentración puede cambiar con el tiempo. Los estándares de calibración deben ser verificados inicialmente utilizando un estándar de control de calidad (ver **A.3.16.1.4.20**).

**A.3.16.1.4.16** **Blanco de calibración.** Preparar HNO3 1 % v/v en agua grado reactivo, junto con las concentraciones seleccionadas de los estándares internos. El uso de HCl para antimonio y plata se cita en el numeral **A.3.16.1.4.1.**

**A.3.16.1.4.17** **Blanco de preparación (blanco de reactivos).** Preparar junto con la preparación de las muestras y agregar las mismas cantidades de reactivos que las soluciones de las muestras.

**A.3.16.1.4.18 Blanco de lavado.** Preparar una cantidad suficiente de disolución de HNO3 1 a 2 % (v /v) en agua grado reactivo para lavar el sistema entre los estándares y las muestras. Si se va a analizar mercurio, el blanco de enjuague también debe contener disolución sol de AuCl3 a una concentración de 2 µg/mL (ppm).

**A.3.16.1.4.19 Solución de comprobación de interferencia (SCI).** Las concentraciones finales de la solución SCI de la Tabla 1 sirven para evaluar correcciones de interferencias conocidas de los analitos, para permitir la adecuada verificación de la corrección de las interferencias.

**Tabla 1. Componentes y concentraciones recomendadas de la solución de comprobación de Interferencia (SCI).**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Componentes de la solución**  | **Concentración de la Solución A (mg/L)** | **Concentración de la Solución AB (mg/L)** |
| Al | 100.0 | 100.0 |
| Ca | 300 | 300.0 |
| Fe | 250.0 | 250.0 |
| Mg | 100.0 | 100.0 |
| Na | 250.0 | 250.0 |
| P | 100.0 | 100.0 |
| K | 100.0 | 100.0 |
| S | 100.0 | 100.0 |
| C | 200.0 | 200.0 |
| Cl | 2000.0 | 2000.0 |
| Mo | 2.0 | 2.0 |
| Ti | 2.0 | 2.0 |
| As | 0.0 | 0.1 |
| Cd | 0.0 | 0.1 |
| Cr | 0.0 | 0.2 |
| Co | 0.0 | 0.2 |
| Cu | 0.0 | 0.2 |
| Mn | 0.0 | 0.2 |
| Hg | 0.0 | 0.02 |
| Ni | 0.0 | 0.2 |
| Se | 0.0 | 0.1 |
| Ag | 0.0 | 0.05 |
| V | 0.0 | 0.2 |
| Zn | 0.0 | 0.1 |

**A.3.16.1.4.19.1** Estas soluciones deben ser preparadas a partir de reactivos de ultra alta pureza. Se pueden obtener comercialmente o se pueden preparar de la siguiente manera:

**A.3.16.1.4.19.2** **Mezcla SCI, disolución I**. Preparar adicionando 13.903 g de Al (NO3)3. 9H2O, 2.498 g de CaCO3 (secado a 180 °C durante 1 hora antes de pesar), 1.000 g de Fe, 1.658 g de MgO, 2.305 g de Na2CO3, y 1.767 g de K2CO3 a 25 mL de agua tipo I Adicionar lentamente 40 mL de HNO3 (1+1). Después de que la disolución esté completa, calentar la solución para desgasificar. Dejar enfriar y diluir hasta 1000 mL con agua tipo I.

**A.3.16.1.4.19.3** **Mezcla SCI, disolución II**. Preparar adicionando lentamente 7.444 g de H3PO4 al 85%, 6.373 g de H2SO4 al 96%, 40.024 g de HCl al 37%, y 10.664 g de ácido cítrico (C6O7H8) a 100 mL de agua tipo I. Diluir a 1000 mL con agua tipo I.

**A.3.16.1.4.19.4** **Mezcla SCI, disolución III**. Preparar adicionando 1.00 mL de cada disolución patrón de 100 µg/mL de arsénico, bario, plomo, mercurio, cadmio, selenio, cromo, cobalto, cobre, manganeso, níquel, plata, vanadio, y zinc, en aproximadamente 50 mL de agua grado reactivo. Añadir 2.0 mL de HNO3 concentrado y diluir hasta 100.0 mL con agua grado reactivo.

**A.3.16.1.4.19.5 Disoluciones SCI de trabajo.**

**A.3.16.1.4.19.5.1 Disolución SCI-A**. Preparar adicionando 10.0 mL de la mezcla SCI disolución I, 2.0 mL de solución concentrada de titanio y de la solución concentrada de molibdeno de 100 µg/mL cada una y 5.0 mL de mezcla SCI disolución II. Diluir a 100 mL con agua tipo I. Preparar semanalmente.

**A.3.16.1.4.19.5.2** **Disolución SCI-AB**. Preparar adicionando 10.0 mL de la mezcla SCI disolución I, 2.0 mL de solución patrón de titanio, y de solución patrón de molibdeno de 100 µg/mL y 5.0 mL de mezcla SCI disolución II y 2.0 mL de mezcla SCI disolución III. Diluir a 100 mL con agua tipo I. Preparar semanalmente considerando que la solución puede precipitar la plata más rápidamente.

**A.3.16.1.4.20 Disolución estándar de control de calidad de verificación inicial (CVI)**. Preparar en la misma matriz ácida con las que se preparan las disoluciones estándares de calibración. Esta disolución debe ser un estándar independiente cuya concentración debe estar cercana al punto medio del intervalo lineal a una concentración distinta de la utilizada para la calibración del instrumento. Un estándar independiente se define como un estándar compuesto de los analitos de una fuente diferente de los utilizados para la calibración del instrumento.

**A.3.16.1.4.21 Solución de sintonización del espectrómetro de masas (tuning).** Preparar una solución que contenga elementos que representen todas las regiones de masas de interés (por ejemplo, 10 µg/ L de Li, Co, In, y Tl) para verificar que la resolución y la calibración de las masas del instrumento estén dentro de las especificaciones requeridas (ver A.3.16.1.5.2.1). Esta solución también se utiliza para verificar que el instrumento ha alcanzado la estabilidad térmica (ver A.3.16.1.5.1.4).

**A.3.16.1.4.22** Argón grado de alta pureza (99.99 %).

**A.3.16.1.4.23** Gases auxiliares, ejemplo:

**A.3.16.1.4.23.1** Hidrógeno de alta pureza (99.99 %).

**A.3.16.1.4.23.2** Helio de alta pureza (99.99 %).

**A.3.16.1.5 Procedimiento**

**A.3.16.1.5.1 Preparación de la muestra.**

**A.3.16.1.5.1.1** El uso de este método debe ser operado por personal capacitado en el reconocimiento y en la corrección de interferencias espectrales, químicas y físicas en ICP-MS.

**Nota**: Se recomienda el uso de contenedores de polietileno o fluorocarbono (TFE ó PFA) en este método.

**A.3.16.1.5.1.2** Si se va a analizar mercurio, el procedimiento de digestión debe utilizar una mezcla de ácido nítrico y clorhídrico a través de todas las etapas de la digestión para evitar que el mercurio se pierda. Si no se ha añadido a la muestra como conservante, se debe adicionar oro (Au) para obtener una concentración final de 2 mg/L (utilizar 2.0 mL de A.3.16.1.4.14 por cada 100 mL de muestra) para preservar el mercurio y para evitar que se quede en el sistema de introducción de muestra.

**A.3.16.1.5.1.3** Colocar el instrumento con los parámetros de funcionamiento adecuados de acuerdo con las instrucciones del fabricante del instrumento. Dejar por lo menos 30 minutos para que el instrumento se equilibre antes de analizar las muestras. Esto se debe verificar mediante el análisis de una solución de sintonización al menos cuatro veces, la desviación estándar relativa deberá ser <5% para los analitos contenidos en la solución de sintonización.

**Nota**: El instrumento debe tener características que lo protejan de las altas corrientes de iones. Si no es así, se deben tomar precauciones para proteger el detector de altas corrientes de iones. Un canal multiplicador de electrones o multiplicador de película activa sufre de fatiga después de haber sido expuesto a altas corrientes de iones. Esta fatiga puede durar desde varios segundos hasta horas dependiendo del tiempo de la exposición. Durante este período de tiempo, los factores de respuesta están cambiando constantemente, lo que invalida la curva de calibración, causa inestabilidad, e invalida el análisis de la muestra.

**A.3.16.1.5.1.4** calibrar el instrumento como se indica en el numeral A.3.16.1.5.2.

**A.3.16.1.5.1.5** Lavar el sistema con la solución blanco de lavado hasta que los niveles de señal regresen a los niveles del límite de detección del instrumento o del método de cuantificación (generalmente cerca de 30 segundos) antes del análisis de cada muestra (ver **A.3.16.1.5.2.4**). Nebulizar cada muestra hasta que se logre una señal de estado estable (normalmente unos 30 segundos) antes del registro de resultados. Analizar la solución de verificación inicial y el blanco de calibración a una frecuencia de por lo menos una vez cada 10 muestras analíticas. Se pueden utilizar sistemas de inyección de flujo, siempre y cuando puedan cumplir con los criterios de desempeño de este método.

**A.3.16.1.5.1.6** Diluir y volver a analizar las muestras que están más concentradas que el intervalo lineal para un analito (o especies necesarias para una corrección) o medir un isótopo alterno, pero menos abundante. La linealidad de la masa alterna debe ser confirmada mediante una calibración adecuada (ver A.3.16.1.5.2.2 y A.3.16.1.5.2.5). Alternativamente aplicar cromatografía de quelación en fase sólida para eliminar la matriz como se describe en el numeral A.3.16.1.1.2.2.1.

**A.3.16.1.5.2 Calibración y normalización**

**A.3.16.1.5.2.1** Llevar a cabo la calibración de las masas y resolución de los controles en las regiones de la masa de interés. Los parámetros de calibración de masas y resolución son los criterios que se deben cumplir antes del análisis de las muestras. Si la calibración de masa difiere más de 0.1 uma del valor verdadero, entonces se debe ajustar al valor correcto la calibración de la masa. La resolución también debe verificarse y debe tener menor de 0.9 uma de ancho total al 10 % de la altura del pico.

**A.3.16.1.5.2.2** Calibrar el instrumento para los analitos de interés (los isótopos recomendados para los analitos especificados en esta método se encuentran en la Tabla 2), utilizar el blanco de calibración y realizar al menos una calibración inicial de acuerdo con el procedimiento del fabricante del instrumento. Enjuagar el sistema con el blanco de lavado entre cada solución estándar. Utilizar el promedio de al menos tres integraciones para la calibración y el análisis de las muestras.

**A.3.16.1.5.2.3** Se observa una mayor estabilidad de la calibración si el instrumento está expuesto a la solución de control de las interferencias después de la limpieza del muestreador y los conos skimmer. También mejora el rendimiento si se enjuaga con agua el instrumento durante 5 o 10 minutos antes de que se corra el blanco de calibración.

**A.3.16.1.5.2.4** Todas las masas que podrían afectar la calidad de los resultados deben ser controladas para determinar los efectos potenciales de los componentes de la matriz en los picos de los analitos. Los isótopos que se recomienda controlar se enumeran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Isotopos recomendados para los elementos seleccionados**

|  |  |
| --- | --- |
| **Elemento de interés** | **Masa** |
| Al | **27** |
| Sb | 121, **123** |
| As | **75** |
| Ba | 138, 137, 136, **135**, 134 |
| Be | **9** |
| Bi (IS) | 209 |
| Cd | **114**, 112, **111**, 110, 113, 116, 106 |
| Ca (I) | 42, 43, **44**, 46, 48 |
| Cl (I) | 35, 37, (77, 82)a |
| Cr | **52**, **53**, **50**, 54 |
| Co | **59** |
| Cu | **63**, **65** |
| Ho (IS) | 165 |
| In (IS) | **115**, 113 |
| Fe (I) | **56**, **54**, **57**, 58 |
| Ln (I) | 139 |
| Pb | **208**, **207**, **206**, 204 |
| Li (IS) | 6b, 7 |
| Mg (I) | 24, **25**, **26** |
| Mn | **55** |
| Hg | 202, **200**, 199, 201 |
| Mo (I) | 98, 96, 92, **97**, 94, (108)a |
| Ni | 58, **60**, 62, **61**, 64 |
| K (I) | **39** |
| Rh (IS) | 103 |
| Sc (IS) | 45 |
| Se | 80, **78**, **82**, **76**, **77**, 74 |
| Ag | **107**, **109** |
| Na (I) | **23** |
| Tb (IS) | 159 |
| Tl | **205**, 203 |
| V | **51*, 50*** |
| Sn (I) | 120, **118** |
| Y (IS) | 89 |
| Zn | 64, **66**, **68**, **67**, 70 |

**Nota:** Este método se recomienda sólo para aquellos analitos que se mencionan. Se incluyen otros elementos en esta tabla, ya que son interferentes potenciales (I) o porque se utilizan comúnmente como estándar interno (IS). Los isótopos se enumeran en orden descendente de abundancia natural y Los usados más generalmente están subrayados y con letra negrita, sin embargo, ciertas matrices pueden requerir el uso de isótopos alternativos.

a Estas masas también son útiles para la corrección de interferencias.

b El estándar interno debe ser enriquecido en el isótopo 6Li. Esto reduce al mínimo la interferencia de litio nativo.

**A.3.16.1.5.2.5** Inmediatamente después de realizada la calibración, ésta debe ser verificada y documentada para cada analito utilizando la solución de verificación inicial. Cuando las mediciones exceden ± 10% del valor aceptado, cancelar el análisis, corregir el problema, recalibrar el instrumento y volver a verificar la nueva calibración. Cualquier muestra analizada bajo una calibración fuera de control se debe volver a analizar. Durante una secuencia, se puede corregir la pendiente de la curva utilizando una solución estándar cuya concentración se encuentre dentro del intervalo de la curva volver a calibrar para corregir la deriva del instrumento. Después de una muestra de control de calidad inaceptable, por ejemplo un CCV, se debe volver a calibrar, y a continuación analizar soluciones de control (CCV y CCB) antes de que se analicen las muestras.

**A.3.16.1.6 Medidas de control de calidad**

**A.3.16.1.6.1** Se deben mantener y estar disponibles todos los datos de control de calidad para una fácil referencia o inspección.

**A.3.16.1.6.2** Determinar el límite de detección del instrumento (LDI) para cada analito en mg/L mediante el cálculo del promedio de las desviaciones estándar de tres corridas realizadas en días no consecutivos a partir del análisis de una disolución blanco con siete mediciones consecutivas por día. Cada medición debe realizarse como si se tratara de una muestra analítica por separado (es decir, cada medición debe ser seguida por un enjuague y/o cualquier otro procedimiento normalmente realizado. Los LDIs se deben determinar por lo menos cada tres meses y registrar en la biblioteca del instrumento.

**A.3.16.1.6.3** En cada análisis se deben monitorear las intensidades de todos los estándares internos. Si la intensidad de cualquier estándar interno en una muestra se encuentra por debajo del 30 % con respecto a la intensidad del estándar interno en la calibración inicial, se debe sospechar de un efecto significativo de la matriz, por lo que deberá realizarse lo siguiente: en primer lugar, asegurarse de que el instrumento no se ha desviado observando las intensidades del estándar interno en la matriz limpia más cercana (blanco de calibración). Si también se observan intensidades bajas del estándar interno en el blanco de calibración más cercano, terminar el análisis, corregir el problema, volver a calibrar, verificar la nueva calibración y volver a analizar las muestras afectadas. Si no se ha producido una desviación, se deben eliminar los efectos de la matriz diluyendo la muestra afectada. La muestra se debe diluir cinco veces (1+4) y volver a analizar con la adición de cantidades apropiadas de estándar interno. Si la primera dilución no elimina el problema, se debe repetir este procedimiento hasta que las intensidades del estándar interno sean superiores al 30 %. Los resultados reportados se deben corregir para todas las diluciones.

**A.3.16.1.6.4** Para obtener resultados del analito de calidad conocida, es necesario medir más de los analitos de interés con el fin de aplicar las correcciones o para determinar si son necesarias las correcciones de interferencia. Por ejemplo, óxido de tungsteno molecular puede ser muy difícil de distinguir de los isótopos de mercurio. Si las concentraciones de fuentes de interferencia (como C, Cl, Mo, Zr, W) son tales que, en el factor de corrección, el analito es menor que el límite de cuantificación y la concentración de las interferencias es insignificante, los datos pueden ir sin corregirse. Tener en cuenta que el monitoreo de las fuentes de interferencia no necesariamente requiere el monitoreo del interferente en sí, sino que puede monitorearse una especie molecular para indicar la presencia del interferente. Cuando se utilizan ecuaciones de corrección, también se deben cumplir todos los criterios de control de calidad. Se requiere un extenso control de calidad para las correcciones de interferencia en todo momento. Las masas monitoreadas deben incluir aquellos elementos cuyos iones moleculares de hidrógeno, oxígeno, hidroxilo, cloro, nitrógeno, carbono y azufre, podrían afectar a los analitos de interés. Se pueden detectar Interferencias insospechadas mediante la adición de componentes de la matriz a una muestra para observar cualquier impacto en las señales de analito. Cuando una fuente de interferencia está presente, los elementos de la muestra afectados deben ser marcados para indicar: (a) el porcentaje de corrección de interferencia que se aplica a los datos o (b) una interferencia sin corregir en virtud de la ecuación elemental utilizado para la cuantificación. Las proporciones de isótopos de un elemento o grupo de iones moleculares proporcionan información útil para el aseguramiento de la calidad.

**Nota:** Sólo son aceptables para su uso en este método, las correcciones de interferencia en elementos isobáricos, moleculares y doblemente cargadas que utilizan las relaciones de respuesta isotópicas observadas o las relaciones de óxido-padre (un óxido del estándar interno tal como se describe en la A.3.16.1.1.2.2).

**A.3.16.1.6.5** Prueba de dilución (dilución en serie): Si la concentración del analito se encuentra dentro del intervalo dinámico lineal del instrumento y lo suficientemente elevada (como mínimo, un factor al menos 100 veces mayor que la concentración en el blanco de reactivos, el análisis de una dilución de cinco veces (1+4), debe estar dentro del ± 10% de la determinación inicial. Si no es así, debe sospecharse de un efecto de interferencia. Incluir una prueba de dilución por cada veinte muestras (o menos) de cada matriz en un lote.

**A.3.16.1.6.6** Adición enriquecida post-digestión: un analito adicionado a una porción de una muestra preparada, o su dilución, debe tener un recobro dentro de 75 a 125 % del valor conocido o dentro de los criterios de aceptación del laboratorio. La adición debe basarse en la concentración de cada elemento de interés en la muestra. Si el recobro no se encuentra dentro de los límites especificados, la muestra debe diluirse y volver a analizarse para compensar el efecto de la matriz. Los resultados deben estar dentro del 10% de la determinación inicial. También se puede utilizar el método de adición de estándar para compensar este efecto.

**A.3.16.1.6.7** Analizar una muestra control de laboratorio (MCL) para cada analito utilizando los mismos método de preparación de la muestra, métodos analíticos y procedimientos de QA/QC empleados para las muestras de ensayo. Preparar y analizar un MCL para cada lote de muestra constituida de 20 muestras o menos.

**A.3.16.1.6.8** Comprobar la calibración del instrumento analizando apropiadamente las soluciones de control de calidad como sigue:

**A.3.16.1.6.8.1** Comprobar la calibración del instrumento usando un blanco de calibración y la solución inicial de verificación de la calibración.

**A.3.16.1.6.8.2** Verificar la calibración a una frecuencia de cada 10 muestras analíticas con el estándar de verificación inicial del instrumento y el blanco de calibración. Estas soluciones también se deben analizar para cada analito al comienzo del análisis y después de la última muestra.

**A.3.16.1.6.8.3** Los resultados de la solución de verificación de la calibración inicial y el estándar de verificación del instrumento deben estar dentro del ± 10% del valor esperado. Si no es así, dar por terminado el análisis, corregir el problema, y volver a calibrar el instrumento. Cualquier muestra analizada bajo una calibración fuera de control se debe volver a analizar.

**A.3.16.1.6.8.4** Los resultados del blanco de calibración deben ser menores a 3 veces el límite de detección del instrumento LDI para cada elemento. Si este no es el caso, identificar la causa y corregir y volver a analizar las muestras afectadas. Si el laboratorio consistentemente tiene concentraciones superiores a 3 veces el LDI, debe ser reevaluado el LDI.

**A.3.16.1.6.9** Verificar la magnitud de las interferencias isobáricas elementales y de iones moleculares y la adecuación de las correcciones al inicio de una serie de análisis o una vez cada 12 horas, lo que sea más frecuente. Realizar esto mediante el análisis de la comprobación de las soluciones de interferencia A y AB. El analista debe tener en cuenta que puede ocurrir la precipitación de la solución AB con algunos elementos, especialmente con la plata. Consultar el numeral A.3.16.1.1.2 para evaluar las interferencias y las posibles soluciones si se necesita orientación adicional.

**A.3.16.1.6.10** Analizar una muestra por duplicado para cada matriz por cada lote 20 muestras.

**A.3.16.1.6.10.1** Determinar la diferencia relativa del porcentaje (DRP) entre las dos determinaciones, de la siguiente manera:

Dónde:

**DRP** = diferencia relativa del porcentaje

**D1** = primer valor de muestra

**D2** = segundo valor de la muestra (por duplicado)

**A.3.16.1.6.11** El resultado de DRP no debe ser mayor al 20 % para los analitos con una concentración mayor a 100 veces el límite de detección instrumental LDI. Si el resultado es mayor, se debe identificar la causa, corregirse, y reanalizar el lote de muestras.

**A.3.16.1.7 Análisis de resultados y cálculos**

**A.3.16.1.7.1** Reportar en miligramos por litro (mg/L). Considerar el facto de dilución, si se realizaron diluciones

**A.3.16.1.7.2** Los cálculos deben incluir las correcciones de interferencia, la normalización del estándar interno y la suma de las señales para las masas 206, 207 y 208 m/z para el plomo (para compensar las diferencias en las abundancias de estos isótopos entre las muestras y los estándares).

**A.3.16.2 Método de prueba para la determinación de antimonio, aluminio, arsénico, bario, cadmio, cobre, cromo, manganeso, níquel, plomo, selenio, hierro y plata por plasma inductivamente acoplado con espectrometría de emisión óptica (ICP-OES).**

**A.3.16.2.1 Fundamento.**

El método de Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utilizando sistemas ópticos simultáneos o secuenciales y un sistema de plasma de vista axial y radial, es utilizado para la determinación de metales, metaloides y algunos elementos no metálicos en disolución acuosa.

La muestra en solución es aspirada (nebulizada) continuamente en un plasma de argón inductivamente acoplado, donde los analitos de interés se convierten en átomos de fase gaseosa de estado excitado o iones. A medida que los átomos o iones de estado excitado vuelven a su estado fundamental, emiten energía en forma de luz a longitudes de onda que son características de cada elemento. La intensidad de la energía emitida a la longitud de onda elegida es proporcional a la cantidad del elemento en la muestra analizada.

Las muestras de agua se conservan mediante tratamiento con ácido y se digieren si es necesario. El análisis directo por ICP-OES debe llevarse a cabo solamente sobre matrices acuosas relativamente limpias.

**A.3.16.2 Interferencias.**

**A.3.16.2.2.1** Las interferencias espectrales son causadas por emisión de fenómenos continuos o de recombinación, la luz extraviada de una línea de emisión de un elemento a alta concentración, la sobreposición de líneas espectrales de otro elemento o por sobreposición de espectros de banda moleculares no resueltos.

**A.3.16.2.2.2** La emisión de ruido de fondo de luz extraviada puede compensarse generalmente por la substracción de la emisión de fondo medida a los lados adyacentes del pico de la longitud de onda del elemento. Los barridos espectrales de las muestras o de soluciones unielementales en las regiones analíticas puede indicar cuándo es conveniente utilizar una longitud de onda alterna por alguna interferencia espectral, además, puede mostrar las posiciones más apropiadas de corrección de fondo a los lados adyacentes del pico del elemento o a un solo lado. La localización de la posición para medir la intensidad de ruido de fondo va a ser determinada por la complejidad del espectro adyacente al pico de la longitud de onda del analito. Estas localizaciones deben estar libres de interferencias espectrales (interelemento o moleculares), o adecuadamente corregidas para reflejar el mismo cambio en la intensidad de fondo como ocurre en el pico de la longitud de onda.

**A.3.16.2.2.3** Las sobreposiciones espectrales pueden evitarse utilizando una longitud de onda alterna o pueden compensarse por ecuaciones que corrigen contribuciones por interferencias interelemento, los instrumentos que utilizan ecuaciones para la corrección interelemento requieren que sean analizados los elementos interferentes al mismo tiempo que los analitos de interés. Cuando estas interferencias no son corregidas, generarán determinaciones falsas positivas o parcialmente positivas. El analista puede aplicar factores de corrección interelemento calculados en su instrumento con los intervalos de concentración probados para compensar los efectos de elementos interferentes.

**A.3.16.2.2.4** En la tabla A.3.16.2**.**2 se muestran (ver anexo) algunas interferencias espectrales (IEC) potenciales observadas para las longitudes de onda recomendadas. Cuando se usan ecuaciones de corrección interelemento, la interferencia puede expresarse como equivalentes de concentración del analito (es decir, concentraciones de analito falsas positivas) que resultan de 100 mg/L del elemento de interferencia.

**A.3.16.2.2.4.1** Por ejemplo, si el As se determina a 193.696 nm en una muestra que contiene aproximadamente 10 mg/L de Al, de acuerdo con la tabla A.3.16.2**.**2, 100 mg/L de Al producirá una señal falsa positiva para un nivel de As equivalente a aproximadamente 1.3 mg/L. Por lo tanto, la presencia de 10 mg/L de Al resultará en una señal falsa positiva para As equivalente a aproximadamente 0.13 mg/L. Se advierte al usuario que otros instrumentos pueden presentar niveles de interferencia algo diferentes a los mostrados en la tabla A.3.16.2.2. Los efectos de interferencia deben evaluarse para cada instrumento individual, ya que las intensidades variarán.

**A.3.16.2.2.5** Las interferencias físicas están asociadas con la nebulización de la muestra y el proceso de transporte de la misma. Cambios en viscosidad y tensión superficial pueden causar malos resultados, especialmente en muestras conteniendo altas concentraciones de sólidos disueltos o altas concentraciones de ácido. Si existen interferencias físicas, estas deben ser reducidas: utilizando nebulizadores para un contenido alto de sólidos, diluyendo la muestra, utilizando una bomba peristáltica o utilizando un elemento apropiado como estándar interno. Otro problema que puede ocurrir con un alto contenido de sólidos disueltos es la acumulación de sales en el tubo inyector de la antorcha, lo cual afecta el flujo de transporte del aerosol ocasionando variación instrumental. Este problema puede controlarse utilizando: un nebulizador para un contenido alto de sólidos, humidificando el argón antes de la nebulización, lavando suficientemente entre muestra y muestra o diluyendo la muestra.

**A.3.16.2.2.6** Las interferencias químicas incluyen la formación de compuestos moleculares, efectos de ionización y efectos de vaporización del soluto. Normalmente, estos efectos no son significativos en la técnica de ICP-OES, pero si se observan pueden ser minimizadas mediante una cuidadosa selección de las condiciones de operación.

**A.3.16.2.2.7** Las interferencias de efecto de memoria son generadas cuando los analitos de una muestra anterior contribuyen en la medición de una nueva muestra. Los efectos de memoria pueden ocasionarse por la acumulación de la muestra en el tubo del nebulizador, en la antorcha del plasma y en la cámara de nebulización. Si se sospecha de interferencias por efectos de memoria, la muestra debe volver a analizarse después de un periodo prolongado de lavado.

**A.3.16.2.3 Aparatos e Instrumentos**

**A.3.16.2.3.1** Plasma inductivamente acoplado con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES).

**A.3.16.2.3.1.1** Espectrómetro de emisión controlado a través de una computadora, con capacidad de realizar corrección de fondo.

**A.3.16.2.3.1.2** Generador de radiofrecuencia

**A.3.16.2.3.1.3** Bomba peristáltica para introducir los estándares y las muestras al nebulizador.

**A.3.16.2.3.1.4** Control automático de los flujos de argón para control exacto y poder reproducir las condiciones del plasma.

**A.3.16.2.3.1.5** Automuestreador

**A.3.16.2.3.1.6** Nebulizador ultrasónico

**A.3.16.2.3.2** Unidad de microondas que proporcione una energía de 600 a 1600 W, dependiendo del número de muestras de capacidad, que pueda programarse dentro de ± 10 W de la energía requerida y que cuente con sensor de temperatura y presión y un controlador de microondas.

**A.3.16.2.3.2.1** El sistema requiere de vasos de digestión de teflón PFA de 75 a 100 mL de capacidad capaces de resistir presiones de 500 psi como máximo y una temperatura máxima de 210 °C.

**A.3.16.2.3.3** Balanza analítica, para la preparación de estándares y reactivos.

**A.3.16.2.4 Materiales**

**A.3.16.2.4.1** Pipetas volumétricas de pistón de diferentes capacidades.

**A.3.16.2.4.2** Matraces volumétricos de diferentes capacidades

**A.3.16.2.4.3** Probetas graduadas

**A.3.16.2.4.4** Embudos

**A.3.16.2.5 Reactivos y disoluciones estándar de referencia**

**A.3.16.2.5.1** A menos que se indique otro grado, los reactivos que se requieren en el método deben ser tipo ACS (American Chemical Society) grado reactivo analítico. Prever que los reactivos sean de la pureza necesaria para permitir su uso sin que afecte la exactitud en la determinación.

**A.3.16.2.5.2** Agua tipo I

**A.3.16.2.5.3** Ácido clorhídrico concentrado (HCl) con la pureza necesaria para evitar contaminación de las muestras.

**A.3.16.2.5.3.1** Disolución de ácido clorhídrico HCl (1:1). Agregar 500 mL de HCl concentrado a 400 mL de agua contenidos en un matraz volumétrico de 1 L y llevar al volumen.

**A.3.16.2.5.4** Ácido nítrico concentrado (HNO3) con la pureza necesaria para evitar contaminación de las muestras.

**A.3.16.2.5.5 Disoluciones patrón estándar para cada analito**. Estas disoluciones pueden ser compradas o preparadas a partir de productos químicos de ultra-alta pureza (99.99 % o de mayor pureza). Todas las sales deben ser secadas por 1 hora a 105 °C, con algunas excepciones específicas anotadas.

**PRECAUCIÓN**: Muchas sales de metales son extremadamente tóxicas si son inhalados o ingeridos. Lavarse las manos cuidadosamente después de su manejo.

**A.3.16.2.5.5.1** Para la preparación de las disoluciones estándares concentradas típicas proceder conforme a lo siguiente. Calcular las concentraciones en base al peso de metal puro añadido, o mediante el uso de la fracción del elemento y el peso de la sal de metal añadido.

**A.3.16.2.5.5.2** Disolución concentrada de aluminio, 1 mL = 1000 μg Al. En un vaso disolver 1.000 g of aluminio metálico con 4.0 mL de HCl (1:1) y 1.0 mL de HN03 conc. Calentar lentamente para disolver el metal. Una vez que se haya disuelto completamente, transferir la disolución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 10.0 mL de HCl (1:1) y diluir al volumen con agua grado reactivo.

**A.3.16.2.5.5.3** Disolución concentrada de antimonio, 1 mL = 1000 μg Sb. En un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver 2.6673 g de K(SbO)C4H4O6 (fracción del elemento Sb = 0.3749),con agua grado reactivo, adicionar 10 mL de HCl (1:1), y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.4** Disolución concentrada de arsénico, 1 mL = 1000 μg As. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.3203 g de As2O3 (fracción del elemento As = 0.7574), con 100 mL de agua conteniendo 0.4 g de NaOH. Acidificar la disolución con 2 mL de HNO3 conc. y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.5** Disolución concentrada de Bario, 1 mL = 1000 μg de Ba. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.5163 g de BaCl2 (fracción del elemento Ba = 0.6595), previamente secado a 250 °C por 2 horas con 10 mL de agua y 1 mL de HCl (1:1). Adicionar 10 mL más de HCl (1:1) y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.6** Disolución concentrada de Cadmio, 1 mL = 1000 μg Cd. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.1423 g de CdO (fracción del elemento Cd = 0.8754), en una cantidad mínima de HNO3 (1:1). Calentar para incrementar la velocidad de disolución. Adicionar 10 mL de HNO3 concentrado y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.7** Disolución concentrada de Cromo, 1 mL = 1000 μg Cr. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.9231 g de CrO3 (fracción del elemento Cr = 0.5200), en agua. Cuando se haya disuelto acidificar con 10 mL de HNO3 concentrado y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.8** Disolución concentrada de Cobre, 1 mL = 1000 μg Cu. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.2564 g de CuO (fracción del elemento Cu = 0.7989) en una cantidad mínima de HNO3 (1:1). Adicionar 10 mL de HNO3concentrado y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.9**  Disolución concentrada de Hierro (1000 μg/mL Fe) - En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.4298 g de Fe2O3 en una mezcla caliente de 20 mL de HCl al 50 % y 2 mL de HNO3 concentrado. Diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.10**  Disolución concentrada de Plata, 1 mL = 1000 μg Ag. En un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver 1.5748 g AgNO3 (fracción del elemento Ag = 0.6350), agua, agregar 10 mL de HNO3. conc y llevar al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.11** Disolución concentrada de Plomo, 1 mL = 1000 μg Pb. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.5985 g de Pb(NO3)2 (fracción del elemento Pb = 0.6256), en una cantidad mínima de HNO3 (1:1). Adicionar 10 mL más de HNO3 (1:1) y diluir al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.12** Disolución concentrada de Manganeso, 1 mL = 1000 μg Mn. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.00 g de manganeso metálico, en una mezcla ácida (10 mL de HCl concentrado y 1 mL de HNO3concentrado) y llevar al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.13** Disolución concentrada de Níquel, 1 mL = 1000 μg Ni. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.000 g de níquel metálico en 10 mL de HNO3concentrado caliente, y llevar al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.14** Disolución concentrada de Selenio, 1 mL = 1000 μg Se. **No secar**. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 1.6332 g de H2SeO3 (fracción del elemento Se = 0.6123) en agua, y llevar al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.5.15** Disolución concentrada de Itrio, 1 mL = 1000 μg Y. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 4.3081 g de Y(NO3)3.6H20 (fracción del elemento Y = 0.2321), en una cantidad mínima de HNO3 diluido. Adicionar 10 mL de HNO3 concentrado y llevar al volumen con agua.

**A.3.16.2.5.6. Mezcla de disoluciones estándar de calibración.**

**A.3.16.2.5.6.1** Preparar una mezcla de disoluciones estándar de calibración (ver la tabla A.3.16.2.1) mediante la combinación de volúmenes apropiados de las soluciones concentradas. Tener cuidado al preparar la mezcla de estándares para asegurar que los elementos son compatibles y estables juntos. Transferir las disoluciones estándar a envases de fluorocarbono (FEP) o envases de polietileno o polipropileno que no hayan sido utilizados previamente para almacenar. Para todas las disoluciones estándar intermedios y de trabajo, especialmente estándares con una concentración baja (<1 mg/L o ppm), debe demostrarse su estabilidad antes de su uso. Preparar la mezcla de estándares con la periodicidad requerida, tomando en cuenta que la concentración puede cambiar con el tiempo. En la tabla A.3.16.2.1 se muestran algunas combinaciones típicas de mezclas de disoluciones estándar de calibración.

**NOTA:** Si al adicionar la plata, se forma inicialmente un precipitado, añadir 15 ml de agua y calentar el matraz hasta que la disolución se torne clara, la concentración de plata debe limitarse a 2 mg/L. La plata es estable en estas condiciones en una matriz de agua durante 30 días, si está protegida de la luz. Concentraciones más altas de plata requieren HCl adicional.

**Tabla A.3.16.2.1. Mezcla de disoluciones estándar de calibración**

|  |
| --- |
| **Mezcla de disoluciones estándar** |
| Disolución | Elementos |
| I | Cd, Mn, Pb, Se |
| II | Ba, Cu, Fe |
| III | As |
| IV | Al, Cr, Ni,  |
| V | Ag, Sb |

**A.3.16.2.5.6.2** Blanco de calibración. Preparar acidificando el agua a la misma concentración que los ácidos utilizados en los estándares de calibración.

**A.3.16.2.5.6.3** Blanco de reactivos de laboratorio. Debe contener todos los reactivos en los mismos volúmenes que se utilizan para las muestras y ser expuesto al proceso completo de preparación de las muestras incluyendo la digestión cuando es requerida.

**A.3.16.2.5.6.4** Disolución estándar de control de calidad de verificación inicial (CVI). Preparar con las mismas mezclas de ácidos que los estándares de calibración. El CVI debe provenir de una fuente externa y diferente a los estándares de calibración y a una concentración cercana al punto medio de la curva de calibración. El CVI se requiere para la operación inicial y periódica de la verificación de los estándares de calibración y monitorear el desempeño del instrumento y el proceso analítico.

**A.3.16.2.5.6.5** Disolución de verificación de interferencias (CCV). Preparar concentraciones conocidas de elementos que proporcionan interferencia que servirán para obtener los factores de corrección de interferencia, particularmente aquellos con interferencias conocidas en concentraciones de 0.5 a 1 mg/L. En ausencia del analito a medir, la sobrecorrección puede dar un valor negativo que puede ser reportado como cero. Si el instrumento en particular con la sobrecorrección da un valor negativo, no será necesaria la fortificación.

**A.3.16.2.6 Calibración y estandarización**

**A.3.16.2.6.1 Optimización del instrumento**

**A.3.16.2.6.1.1** Cargar el instrumento con los parámetros de funcionamiento adecuados establecidos como se detalla a continuación. Permitir que el instrumento se estabilice térmicamente antes de comenzar con la calibración (generalmente un mínimo de 30 minutos de funcionamiento). Operar el equipo de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

**Nota:** La sensibilidad y los intervalos de trabajo para cada elemento variarán con la longitud de onda, espectrómetro, matriz y condiciones de operación. Consulte las instrucciones del fabricante para las longitudes de onda analíticas recomendadas y los límites de detección de instrumentos estimados (LDI).

**A.3.16.2.6.1.2** Antes de utilizar este procedimiento para el análisis de rutina, se deben realizar las pruebas iniciales de desempeño los cuales deben estar documentados y deben incluir los criterios de selección de los puntos de corrección de fondo; los intervalos de análisis, las ecuaciones aplicables, así como los límites superiores de estos intervalos; los límites de detección del método y del instrumento; y la determinación y verificación de las ecuaciones de corrección interelemento u otras rutinas de corrección de interferencias espectrales. Estos datos deben ser generados utilizando el mismo instrumento, condiciones de operación y la rutina de calibración que se utilizan para el análisis de muestras.

**A.3.16.2.6.1.3** Las condiciones de operación para soluciones acuosas usualmente varían de acuerdo a lo siguiente:

* 1100 - 1200 watts de potencia,
* 14 - 18 mm de altura,
* 15 - 19 L/min de flujo de argón,
* 0.6 - 1.5 L/min flujo de argón en el nebulizador,
* 1 - 1.8 mL/min de velocidad de bombeo de la muestra con un tiempo de pre-limpieza de 1 minuto y el tiempo de medición aproximado de 1 segundo por pico de longitud de onda para instrumentos secuenciales y 10 segundos por muestra con instrumentos simultáneos.

**A.3.16.2.6.1.4** Para un plasma axial, las condiciones usualmente varían de acuerdo a lo siguiente:

* 1100 a 1500 watts de potencia,
* 15 a 19 litros/min de flujo de argón refrigerante,
* 0.6 a 1.5 L/min de caudal de flujo de argón nebulizador,
* 1 a 1.8 mL de velocidad de bombeo de la muestra/min con un tiempo de pre-limpieza de 1 minuto y tiempo de medición cerca de 1 segundo por pico de longitud de onda para instrumentos secuenciales y 10 segundos por muestra para instrumentos simultáneos.

**Nota:** Para alcanzar factores de corrección de interferencia repetibles se recomienda ajustar el flujo de argón aerosol para reproducir la relación de intensidad de Cu/Mn en 324.754 nm y 257.610 nm, respectivamente.

**A.3.16.2.6.1.5** Optimización del plasma

**A.3.16.2.6.1.5.1** Optimizar las condiciones de funcionamiento del plasma antes del uso del instrumento. El objetivo de la optimización de plasma es proporcionar un máximo de la señal de fondo de algunos de los elementos menos sensibles en la matriz de análisis. El uso de un controlador de flujo de masa para regular el flujo de gas nebulizador o una fuente de optimización de software facilita en gran medida el procedimiento. No es necesario llevar a cabo esta rutina diariamente, sólo se requiere cuando se ajusta por primera vez un instrumento nuevo, o después de un cambio en las condiciones de funcionamiento. Para la optimización del instrumento se recomienda realizar lo siguiente, o seguir las recomendaciones del fabricante.

**A.3.16.2.6.1.5.2** Encender el plasma radial y seleccionar una apropiada potencia de RF incidente. Dejar que el instrumento se encuentre térmicamente estable (entre 30 a 60 minutos) antes de comenzar. Mientras se aspira una disolución de 1000 µg/L de itrio, seguir las instrucciones del fabricante del instrumento y ajustar el flujo del gas acarreador de aerosol a través del nebulizador hasta que una región de emisión azul definitiva del plasma se extienda aproximadamente de 5 a 20 mm por encima de la parte superior de la bobina de carga. Registrar el flujo del gas nebulizador y el ajuste de presión para futuras referencias. La solución de itrio también se puede utilizar para la alineación óptica gruesa de la antorcha mediante la observación de la superposición de la luz azul sobre la rendija (slit) de entrada hacia el sistema óptico.

**A.3.16.2.6.1.5.3** Después de establecer el flujo del gas nebulizador, determinar la velocidad de absorción de solución del nebulizador en mL/min mediante la aspiración de un volumen conocido de un blanco de calibración por un período de al menos tres minutos. Dividir el volumen aspirado por el tiempo en minutos y registrar la velocidad de absorción. Colocar la bomba peristáltica para entregar esa velocidad en un flujo constante.

**A.3.16.2.6.1.6** Calibrar el instrumento para alinearlo ópticamente, como será utilizado durante el análisis. El siguiente procedimiento se puede usar tanto para la optimización horizontal y vertical en el modo radial, pero está descrito para el vertical.

**A.3.16.2.6.1.6.1** Aspirar una disolución que contenga 10 µg/L de varios elementos seleccionados. As, Se, y Pb son los menos sensibles de los elementos y con mayor necesidad de optimización. Sin embargo, otros elementos pueden ser utilizados (Cr, Cu, Li y Mn también se pueden utilizar con éxito). Recolectar datos de intensidad en el pico de longitud de onda para cada analito a intervalos de 1 mm de 14 a 18 mm por encima de la bobina de carga. (Esta región del plasma es referida como la zona analítica). Repetir el procedimiento utilizando el blanco de calibración. Determinar la señal neta a la intensidad de blanco para cada analito para cada ajuste de altura de observación. Elegir la altura para ver el plasma que ofrece las mejores relaciones de intensidad (ratios) neta de los elementos analizados o la relación de intensidad más alta para el elemento de menor sensibilidad. Para la optimización en el modo axial, seguir las instrucciones del fabricante del instrumento.

**A.3.16.2.6.1.7** Las condiciones de operación óptimas del instrumento deben proporcionar los límites de detección del instrumento (LDI) más bajos.

**A.3.16.2.6.1.8** Si se cambian las condiciones de operación del instrumento, tales como la energía incidente o flujo de gas nebulizador, o si se instala un tubo inyector nuevo de la antorcha con un orificio de diámetro interno diferente, el plasma y la altura de visión deben ser re-optimizados.

**A.3.16.2.6.1.9** Después de completar la optimización inicial de operación de las condiciones de funcionamiento, y antes de analizar las muestras, el laboratorio debe establecer y verificar inicialmente una rutina de corrección de interferencias espectrales interelemento para ser utilizado durante el análisis de la muestra. El criterio para determinar que una interferencia espectral interelemento está presente, es una concentración positiva o negativa aparente para el analito que está más allá de un ± del límite establecido cercano a cero. Una vez establecida, la rutina completa debe ser verificada cada seis meses. Sólo una parte de la rutina de corrección se debe verificar con mayor frecuencia o cada vez que se llevan a cabo los análisis. Se deben mantener los registros de las verificaciones iniciales y periódicas.

**A.3.16.2.6.1.10** Antes de la calibración diaria, y después del período de calentamiento del instrumento, se tiene que optimizar el flujo del gas nebulizador. Si se utiliza un controlador de flujo de masa, se debe ajustar a la velocidad de flujo optimizado registrado. A fin de mantener válidas las rutinas de corrección interelemento espectrales, el flujo de gas nebulizador deberá ser el mismo (el cambio debe ser <2 %) día a día.

**A.3.16.2.6.1.11** Para la operación con disolventes orgánicos, se recomienda el uso de la entrada de argón auxiliar así como tubería resistente a los disolventes, el aumento de flujo de argón, la disminución del flujo del nebulizador, y el aumento de potencia de RF, para obtener un funcionamiento estable y mediciones precisas.

**A.3.16.2.6.2 Optimización del método**

**A.3.16.2.6.2.1** Establecer el intervalo lineal para cada longitud de onda utilizada mediante la determinación de la señal de respuesta a partir de un mínimo de tres, preferentemente cinco, diferentes patrones de concentración en todo el intervalo. Cada vez que haya un cambio significativo en la respuesta del instrumento se debe determinar nuevamente el intervalo. Como mínimo, el intervalo debe ser revisado cada seis meses.

**A.3.16.2.6.2.2** Muchos de los metales alcalinos y alcalinotérreos tienen curvas de respuesta no lineales debido a la ionización y a los efectos de auto-absorción. Estas curvas se pueden utilizar si el instrumento lo permite; sin embargo, el intervalo efectivo debe ser revisado y el ajuste de la curva de segundo orden debe tener un coeficiente de correlación ≥ 0.995. Estas respuestas de curvas no lineales deben ser revalidadas y se deben calcular cada seis meses. Estas curvas son mucho más sensibles a los cambios en las condiciones de operación que las lineales y debe realizarse cada vez que se han producido cambios moderados en el equipo.

**A.3.16.2.6.2.3** Establecer la sensibilidad, el límite de detección instrumental (LDI), la precisión, el intervalo lineal, y los efectos de interferencia para cada analito individual de cada instrumento en particular. Todas las mediciones deben estar dentro del intervalo lineal del instrumento donde las ecuaciones de corrección son válidas.

**A.3.16.2.6.2.4** El laboratorio debe establecer el límite de cuantificación en el nivel bajo del intervalo (LCNB) para cada analito, en la mayoría de los casos es el punto más bajo de la curva de calibración, la verificación inicial se lleva a cabo utilizando 7 replicados de la muestra fortificadas en el nivel bajo y procesadas a través de todas las etapas de preparación y análisis del método. La recuperación media debe ser +/- 35% del valor real y la DER debe ser <20%.

**A.3.16.2.6.2.5** La verificación continua del (LCNB), como mínimo se realiza trimestralmente para validar la capacidad de cuantificación a bajos niveles de concentración del analito.

**A.3.16.2.6.2.6** Para poder utilizar este método el laboratorio debe demostrar que el intervalo de trabajo para cada analito contempla la especificación establecida por las normas oficiales.

**A.3.16.2.6.3 Calibración diaria del instrumento**

**A.3.16.2.6.3.1** Los estándares de calibración deben prepararse utilizando el mismo tipo de ácido o combinación de ácidos y en la misma concentración que las muestras.

**A.3.16.2.6.3.2** Preparar un blanco de calibración y mínimo 3 niveles de concentración para cada uno de los analitos a cuantificar. La concentración más alta no debe ser superior al intervalo lineal del instrumento según lo establecido anteriormente. Calibrar el instrumento diariamente y el coeficiente de correlación debe ser ≥ 0.995.

**A.3.16.2.6.3.3** La calibración inicial puede también realizarse utilizando un blanco de calibración y un solo nivel de concentración (nivel alto); si se realiza de esta manera, la curva resultante debe verificarse con dos disoluciones estándar (niveles bajo y medio del intervalo). El intervalo de aceptación de ambas disoluciones es del 80 a 120%.

**A.3.16.2.6.3.4** Comprobar la estandarización del instrumento mediante el análisis apropiado de muestras de control de calidad (MCC) de la siguiente manera:

**A.3.16.2.6.3.4.1** Preparar los estándares de calibración cada vez que se analiza una serie de muestras. Si la disolución estándar de verificación de la calibración inicial (CVI) se prepara diariamente y los resultados de los análisis del CVI están dentro de los criterios de aceptación, se puede ampliar la vigencia de las disoluciones mientras la disolución CVI cumpla con los criterios establecidos.

**A.3.16.2.6.3.4.2** El valor absoluto de los resultados del blanco de calibración debe ser menor que el valor de la muestra de verificación (LCNB) para cada analito, o debe ser menor que el nivel de contaminación aceptable en el blanco especificado durante la validación del método. Si este no es el caso, debe ser identificada y corregida la razón de la condición fuera de control, y las diez muestras anteriores se deben volver a analizar.

**A.3.16.2.6.3.4.3** Preparar una disolución estándar a una concentración cercana al límite superior. El valor calculado debe estar dentro ± 10 % del valor real.

**A.3.16.2.6.3.4.4** Después de la calibración inicial, verificar analizando el CVI, esta disolución debe ser preparada a partir de un material independiente (segunda fuente) en o cerca del nivel medio de la curva de calibración. El criterio de aceptación para el CVI es de ± 10% de su valor real, Si no se cumple este criterio, se debe determinar la causa y volver a calibrar el instrumento antes del análisis de las muestras. Mantener registros de los resultados obtenidos del CVI junto con las muestras.

**A.3.16.2.6.3.4.5** La curva de calibración debe ser verificada al final de cada lote de análisis y después de cada 10 muestras mediante el uso de una disolución estándar de verificación de la calibración continua (CCV) y un blanco de calibración continua (CCB). El CCV debe prepararse a partir del mismo material que el CVI en o cerca del nivel medio de la curva de calibración. El criterio de aceptación para el estándar CCV deben ser de ± 10% de su valor real, y el CCB no debe contener analitos de interés mayores a 2 a 3 veces el LCNB. Si los resultados obtenidos no se encuentran dentro de los límites especificados, interrumpir el análisis de la muestra, determinar la causa y volver a calibrar el instrumento. Posteriormente, volver a analizar todas las muestras que se corrieron después de la última CCB y CCV aceptables. Mantener registros de los resultados obtenidos junto con las muestras.

**A.3.16.2.6.3.4.6** Si se realiza la curva de calibración inicial con un solo estándar de calibración y un blanco, también se debe verificar antes del análisis de las muestras con una disolución estándar de verificación de la calibración de nivel bajo (LLCCV). La disolución estándar LLCCV debe prepararse a partir del mismo material que el CVI en el límite de cuantificación obtenido durante la validación. El criterio de aceptación para el LLCCV es de ± 20% de su valor real. Si el resultado no se encuentra dentro del límite especificado, el análisis de la muestra no puede comenzar hasta que se determine la causa y el resultado del LLCCV sea satisfactorio. El instrumento puede necesitar ser recalibrado o el límite de cuantificación ajustado. Mantener registros de los resultados obtenidos junto con las muestras.

**A.3.16.2.6.3.4.7** Diluir las muestras cuyo valor esté por encima del nivel alto de la curva de calibración y volver a analizar.

**A.3.16.2.7 Procedimiento**

**A.3.16.2.7.1 Preparación de la muestra.**

**A.3.16.2.7.1.1** Es la responsabilidad del laboratorio cumplir con todos los reglamentos federales, estatales y locales referentes al manejo de residuos, particularmente las reglas de identificación, almacenamiento y disposición de residuos peligrosos.

**A.3.16.2.7.1.2** Asegurarse que todo el material utilizado durante el análisis esté libre de contaminación mediante procedimientos de lavado y descontaminación con ácido. Para descontaminar los vasos de digestión se puede utilizar un programa de digestión con el horno de microondas siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**A.3.16.2.7.1.3** Si la muestra es incolora, transparente y no presenta turbiedad aparente, no se requiere realizar digestión, sólo adicionar un volumen apropiado de ácido nítrico para ajustar la concentración del ácido al 1% (v/v). Las muestras de control de calidad (ejemplo blanco de calibración, blanco de reactivo), deben someterse a los mismos procedimientos que las muestras incluyendo la adición del estándar interno o igualar la matriz con las disoluciones estándar.

**A.3.16.2.7.1.4** En caso de que la muestra presente turbiedad, llevar a cabo la digestión de la muestra. Medir una alícuota de 45 mL de muestra homogénea (AGITAR VIGOROSAMENTE LA MUESTRA), y depositar dentro de los vasos de digestión. Tomar 25 mL ó 10 mL de muestra + 20 mL de agua tipo I en caso de que la muestra presente materia orgánica o sólidos suspendidos.

**A.3.16.2.7.1.4.1** Adicionar 4 mL de HNO3 y 1 mL de HCl a cada vaso, tapar y colocar los vasos en el carrusel del horno de microondas. Proceder con la digestión de las muestras utilizando la potencia, rampas de temperatura y tiempo de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

**A.3.16.2.7.1.4.2** Preparar un blanco de reactivos utilizando agua tipo I en lugar de muestra y proceder de acuerdo a 7.1.4 y 7.1.4.1.

**A.3.16.2.7.1.4.3** Una vez realizada la digestión permitir que los vasos se enfríen aproximadamente 5 minutos antes de sacar el carrusel del horno, posteriormente sacar el carrusel del horno y permitir que los vasos alcancen la temperatura ambiente (de 30 a 40 min) antes de destaparlos.

**A.3.16.2.7.1.4.4** Destapar cuidadosamente cada vaso dentro de la campana de extracción. Llevar la muestra a un volumen final de 50 mL, si la muestra digerida contiene partículas las cuales puedan obstruir el nebulizador, filtrar utilizando papel filtro No. 2, 40 ó 41, posteriormente transferir a un tubo previamente etiquetado.

**A.3.16.2.7.2 Análisis de las muestras en el ICP-OES**

**A.3.16.2.7.2.1** Calibrar el instrumento de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante, utilizando la mezcla de disoluciones estándar de calibración (ver 6.3). Enjuagar el sistema con el blanco de calibración entre cada estándar o como recomienda el fabricante.

**A.3.16.2.7.2.2** Enjuagar el sistema con la disolución blanco de calibración, leer el CVI, el blanco de reactivos y las muestras. Enjuagar el sistema con la disolución blanco de calibración antes del análisis de cada muestra. El tiempo de lavado debe ser un minuto. Una reducción de este tiempo de enjuague deberá demostrarse adecuadamente. Registrar los resultados.

**A.3.16.2.7.2.3** Cuando la calibración inicial se realiza utilizando un solo nivel alto y el blanco de calibración, además del CVI, se debe analizar una disolución estándar LLCCV antes del análisis de las muestras. Analizar después de cada diez muestras y al final del lote de análisis un CCV y un CCB.

**A.3.16.2.8 Cálculos**

**A.3.16.2.8.1**  Reportar los resultados de las muestras en mg/L.

**A.3.16.2.8.2** Reportar directamente los datos generados del instrumento con su factor de dilución en caso de que exista.

**A.3.16.2.8.3** Tomar en cuenta los siguientes criterios para reportar:

**A.3.16.2.8.3.1** Cuando se tenga un %DER mayor del 10 %, pero éste se deba a una lectura errónea de las 3 réplicas realizadas por el equipo, verificar si esa lectura se debió a un error del equipo, en cuyo caso considerar las otras 2 lecturas y evaluar si los resultados son válidos para ser reportados.

**A.3.16.2.8.3.2** Cuando se tenga un %DER menor del 10 % y el valor de la concentración reportada sea mayor que el límite de detección del método (LDM), verificar que el pico de respuesta del equipo corresponde al metal en cuestión, en cuyo caso se debe reportar la concentración obtenida, de lo contrario reportar como “**no detectado**”, pues se estaría reportando un falso positivo. Para esto compare el pico del metal en cuestión sobreponiendo el pico correspondiente del estándar de calibración de concentración más cercana.

**A.3.16.2.9 Anexo**

**Tabla A.3.16.2.2. Interferencias espectrales potenciales en ICP-OES**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | **Interferencias ab** |
| **Analito** | **Longitud de onda****(nm)** | **Al** | **Ca** | **Cr** | **Cu** | **Fe** | **Mg** | **Mn** | **Ni** | **Tl** | **V** |
| Aluminio | 308.215 | - | - | - | - | - | - | 0.21 | - | - | 1.4 |
| Antimonio | 206.833 | 0.47 | - | 2.9 | - | 0.08 | - | - | - | 0.25 | 0.45 |
| Arsénico | 193.696 | 1.3 | - | 0.44 | - | - | - | - | - | - | 1.1 |
| Bario | 455.403 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cadmio | 226.502 | - | - | - | - | 0.03 | - | - | 0.02 | - | - |
| Cromo | 267.716 | - | - | - | - | 0.003 | - | 0.04 | - | - | 0.04 |
| Cobre | 324.754 | - | - | - | - | 0.003 | - | - | - | 0.05 | 0.02 |
| Fierro | 259.940 | - | - | - | - | - | - | 0.12 | - | - | - |
| Plomo | 220.353 | 0.17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manganeso | 257.610 | 0.005 | - | 0.01 | - | 0.002 | 0.002 | - | - | - | - |
| Níquel | 231.604 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Selenio | 196.026 | 0.23 | - | - | - | 0.09 | - | - | - | - | - |

a Los guiones indican que no se observó interferencia incluso cuando se introdujeron interferencias en los siguientes niveles:

Al a 1000 mg/L Cu a 200 mg/L Mn a 200 mg/L

Ca a 1000 mg/L Fe a 1000 mg/L Tl a 200 mg/L

Cr a 200 mg/L Mg a 1000 mg/L V a 200 mg/L

b Las cifras mostradas anteriormente como equivalentes de concentración de analito no son las concentraciones reales observadas. Para obtener esta cifra añada la concentración indicada a la figura de interferencia.

c Las interferencias se verán afectadas por la elección de fondo y otras interferencias que pueden estar presentes.

**A.3.17 Determinación de bromato disuelto por cromatografía líquida de iones**

**A.3.17.1 Generalidades**

**A.3.17.2** **Fundamento**

**A.3.17.2.1** El pretratamiento de la muestra se lleva a cabo con el fin de eliminar el ozono, los sólidos, y para reducir cloruro, sulfato, carbonato, carbonato de hidrógeno y metales presentes mediante el uso de intercambiadores catiónicos.

**A.3.17.2.2** La medición de bromato se realiza en el intervalo de 0.5 µg/L a 1000 µg/L, con o sin preconcentración.

**A.3.17.2.3** La separación cromatográfica líquida de bromato se lleva a cabo ya sea por medio de una columna de separación o después de la elución de bromato mediante una columna concentradora, si es utilizada. Se utiliza una resina de intercambio aniónico como fase estacionaria, y por lo general soluciones acuosas de sales de ácidos mono y difásicos débiles como eluyente.

**A.3.17.2.4** Se utiliza un detector de conductividad (CD) con supresión química. Un detector de UV (λ= 190 nm a 205 nm) es adecuado para confirmar los resultados de CD.

**Nota:** Cuando se utilizan detectores de conductividad, es esencial que los eluyentes tengan una conductividad suficientemente baja. Por esta razón, los detectores de conductividad se combinan con un dispositivo supresor (intercambiador de cationes) que reduce la conductividad del eluyente y transforma las especies de la muestra en sus respectivos ácidos. La detección UV mide la absorbancia directamente.

**A.3.17.2.5** Iones fuertemente retenidos (por ejemplo, nitrato, fosfato, sulfato) se eliminan de la columna, por ejemplo, mediante el lavado de la columna con un eluyente más concentrado.

**A.3.17.2.6** La concentración de bromato se determina después de la calibración del procedimiento general.

**A.3.17.2.7** Un tratamiento previo adecuado de la muestra, por ejemplo para la eliminación de cloruros, sulfatos, metales, preconcentración o dilución, que proporcione un intervalo de aplicación de 0.5 µg/L a 1000 µg/L de bromato disuelto.

**A.3.17.2.8** El intervalo de trabajo está limitado por la capacidad de intercambio iónico de algunas columnas de preconcentración utilizadas y la de la columna de separación. Puede ser necesaria una dilución de la muestra en el intervalo de trabajo.

**A.3.17.3 Interferencias**

**A.3.17.3.1** La presencia de nitrato, cloruro, carbonato y sulfato, puede afectar a la capacidad del concentrador de la columna y dar lugar a un recobro bajo de bromato.

**A.3.17.3.2** La presencia de cloruro, sulfato, carbonato y ácido carbónico puede causar interferencia en la determinación de bromato. Dependiendo de la columna utilizada, otros iones pueden interferir; esto debe ser comprobado.

**A.3.17.3.3** Metales presentes (por ejemplo, iones de bario y plata liberados en los pasos de pretratamiento de la muestra) se unirán al material de la resina de las columnas de concentración y de separación, resultando en un bajo desempeño. Los iones metálicos pueden ser eliminados con la ayuda de una columna de limpieza de metal o intercambiadores especiales (ver figura A.3.17-1).

**A.3.17.3.4** Se comprobó que las interferencias de algunos ácidos orgánicos en la determinación de bromato no son significativas en las concentraciones analizadas.

**A.3.17.3.5** Las partículas sólidas y los compuestos orgánicos, tales como aceites minerales, detergentes y ácidos húmicos acortan el tiempo de vida de la columna del concentrador y el separador.

**A.3.17.4** **Aparatos e Instrumentos**

**A.3.17.4.1 Aparato**

**A.3.17.4.1.1 Sistema de cromatografía iónica (IC)**, cumpliendo con los requisitos de calidad, es decir resolución. En general, estará compuesto por lo siguiente (ver figura A.3.17-1):

**A.3.17.4.1.1.1**  Reservorios de eluyente, y una unidad de desgasificación para dos eluyentes.

**A.3.17.4.1.1.2**  Bomba, adecuada para la técnica de gradiente.

**A.3.17.4.1.1.3**  Dispositivo de entrega de la muestra (por ejemplo, bomba de muestra) que incluye un sistema de inyección de la muestra que incorpora un loop de muestra de volumen adecuado (por ejemplo, 0.05 mL a 2 mL) o un automuestreador.

**A.3.17.4.1.1.4**  Válvulas de conmutación de columnas (por ejemplo 6-Port-válvulas) que incluye un dispositivo para la sincronización y el control de las válvulas y de la bomba.

**A.3.17.4.1.1.5**  Columna concentradora (puede ser necesaria para concentraciones bajas).

**A.3.17.4.1.1.6** Columna de separación con la capacidad de separación especificada.

**A.3.17.4.1.1.7** Detector de conductividad con un supresor de aniones.

**A.3.17.4.1.1.8** Detector UV (por ejemplo espectrofotómetro: 190 nm a 400 nm).

**A.3.17.4.1.1.9** Dispositivo de registro (por ejemplo, registrador, integrador con impresora, PC con el software de adquisición de datos y evaluación).

**A.3.17.4.1.2 Cartuchos.**

**A.3.17.4.1.2.1** Intercambiador de cationes en la forma- Ag (cartucho).

**A.3.17.4.1.2.2** Intercambiador de cationes en la forma-Ba (cartucho).

**A.3.17.4.1.2.3** Intercambiador de cationes en la forma-H (cartucho).

**A.3.17.4.1.2.4** Opcional: columna de limpieza de metal para uso en línea.

**A.3.17.4.1.2.5** Cartuchos con fases no polares que se utilizarán para la preparación de muestras (por ejemplo, polivinilpirrolidona).

**Figura A.3.17-1** Representación esquemática de un sistema de cromatografía iónica, incluyendo un sistema de preconcentración del sistema en línea.



Clave

a Opcional.

b Se recomienda para la inyección directa, cuando no se utiliza una columna concentradora.

**A.3.17.4.1.3 Requisitos de calidad para la columna de separación**

Las condiciones de separación deberán ser tales que los posibles aniones interferentes no interfieran con el bromato. Las figuras A.3.17-2 y A.3.17-3 dan ejemplos para diferentes tipos de matriz de agua verificadas.

En los cromatogramas de muestras y soluciones estándar de bromato, la resolución de los picos R entre el bromato y su pico más cercano, generalmente cloruro, no deberá ser inferior a 1.3.

**Figura A.3.17-2** Ejemplo de cromatograma de una muestra de agua cruda tratada ozonizada.



**Clave**

1. Formiato, lactato, propionato, acetato o butirato

2. Valerato o desconocido

3. Desconocido

4. Clorito

5. Monobromoacetato

6. 0.8 µg/L bromato

7. Cloruro

**Nota:** Identificación verificada de los picos 6 y 7. Identificación incierta de otros picos.

Preparación de la muestra: preconcentración de 2 mL de la muestra después del uso de cartuchos Ag y H.

**Figura A.3.17-3 -** Cromatograma de una muestra de río (Río Meuse, muestra fortificada con 3 µg/L de bromato).



**Clave**

1. Formiato

2. Propionato, acetato, o butirato

3. Valerato

4. Desconocido

5. Desconocido

6. Clorito

7. Desconocido

8. Bromato

9. Cloruro

**Nota:** Identificación verificada de los picos 8 y 9. Identificación incierta de otros picos.

**Nota:** Preparación de la muestra: preconcentración de 2 mL de la muestra después del uso de los cartuchos de Ag y H.

**Nota:** Secuencias de elución y tiempos de retención (tR) pueden variar dependiendo del tipo de columna y la composición del eluyente.

**Figura A.3.17-4 -** Representación gráfica de los parámetros para calcular la resolución de los picos R.

****

**Clave**

1 Pico 1

2 Pico 2

Calcular la resolución de los picos R utilizando la siguiente ecuación:



En donde:

R2,1 es la resolución del par de picos 2,1

tR1 es el tiempo de retención, en segundos del primer pico.

tR2 es el tiempo de retención, en segundos del segundo pico.

w1 es el ancho de pico, en segundos en el eje de tiempo del primer pico.

w2 es el ancho del pico, en segundos en el eje de tiempo del segundo pico.

**Nota:** w1, w2 son los anchos de base de los triángulos isósceles construidos sobre los picos gaussianos.

**A.3.17.5** **Material**

Material habitual de laboratorio

**A.3.17.6** **Reactivos**

**Nota:** Utilizar solamente reactivos de grado analítico reconocido.

**A.3.17.6.1** Agua tipo I

**A.3.17.6.2** Bicarbonato de sodio, NaHCO3.

**A.3.17.6.3** Carbonato de sodio, Na2CO3

**A.3.17.6.4** Tetraborato disódico decahidratado, Na2B4O7. 10 H2O.

**A.3.17.6.5** Ácido bórico, H3BO3

**A.3.17.6.6** Bromato de potasio, KBrO3.

**A.3.17.6.7** Ácido nítrico, c(HNO3) = 0.1mol/L.

**A.3.17.6.8** Ácido sulfúrico,  **(H2SO4) = 1.84 g /mL.**

**A.3.17.6.9** Etilendiamina,C2H8N2

**A.3.17.6.10** Eluyentes

**A.3.17.6.10.1** Desgasificar toda el agua utilizada para la preparación del eluyente. Tomar medidas para evitar cualquier entrada de aire durante el funcionamiento (por ejemplo, mediante burbujeo de helio). Con el fin de minimizar el crecimiento de bacterias o algas, almacenar los eluyentes en la oscuridad y renovar cada 3 días. Se utilizan dos diferentes tipos de eluyente:

**A.3.17.6.10.2** Eluyente tipo 1, de un nivel de concentración más bajo para la separación de bromato.

**A.3.17.6.10.3** Eluyente tipo 2, de un nivel de concentración más alto para eliminar iones fuertemente retenidos (por ejemplo, nitrato, fosfato) del separador y de la columna.

**Nota:** La elección del eluyente depende de la elección de la columna y del detector; solicitar asesoramiento del proveedor de la columna. La combinación de la columna de separación y eluyente elegidos, se deberán ajustar a los requisitos de la resolución.

**A.3.17.6.11 Disolución estándar patrón de bromato, (BrO3) = 1000 mg/L**

**A.3.17.6.11.1** Secar aproximadamente 1.5 g de bromato de potasio durante al menos 1 h a 105 °C ± 5 ° C. Almacenar el bromato de potasio seco en un desecador.

**A.3.17.6.11.2** Disolver 1.306 g ± 0.001 g del bromato de potasio seco en aproximadamente 800 mL de agua en un matraz aforado 1000 mL y llevar a volumen con agua. Almacenar la solución de 2 °C a 6 °C en envases de polietileno o botellas de vidrio y renovarla cada 12 meses.

**Nota:** Como alternativa, utilizar soluciones patrón disponible en el mercado de la concentración requerida.

**A.3.17.6.12** **Disoluciones estándar de bromato**.

**A.3.17.6.12.1** **General**

Dependiendo de las concentraciones esperadas, preparar las siguientes disoluciones estándar de bromato a diferentes concentraciones a partir de la disolución patrón. Tomar en cuenta el posible riesgo de cambios en la concentración, provocada por la interacción con el material del recipiente que contribuye a la disminución de la concentración de bromato. Almacenar la disolución estándar en envases de polietileno o de vidrio.

**A.3.17.6.12.2** Disolución estándar de bromato I (la concentración de esta solución es (BrO3) = 100 mg/L)

**A.3.17.6.12.2.1** Medir 10 mL de la solución estándar patrón en un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con agua.

**A.3.17.6.12.2.2** Almacenar la solución de 2 °C a 6 °C en recipientes de polietileno o de vidrio y renovar cada 6 meses.

**A.3.17.6.12.3** Disoluciones de calibración de bromato II (La concentración de esta solución es (BrO3-) = 1 mg/L)

**A.3.17.6.12.3.1** Medir 1.0 mL de la disolución estándar de bromato I en un matraz aforado de 100 mL, llevar a volumen con agua.

**A.3.17.6.12.3.2** Almacenar la disolución de 2 °C a 6 °C en recipientes de polietileno o de vidrio y renovar cada 3 meses.

**A.3.17.6.13** Disoluciones de calibración de bromato

**A.3.17.6.13.1** Dependiendo de la concentración de bromato esperada en la muestra, utilizar la disolución estándar de bromato I o II para preparar de cinco a diez disoluciones de calibración distribuidos en todo el intervalo de trabajo posible.

Por ejemplo, realizar lo siguiente para el intervalo de 0.5 µg/L a 5.0 µg /L BrO3- :

Medir en una serie de matraces volumétricos de 100 mL, los siguientes volúmenes: 50 µL, 100 µL , 150 µL, 200 µL, 250 µL, 300 µL, 350 µL, 400 µL, 450 µL o 500 µL de disolución estándar de bromato II y diluir a volumen con agua.

Las concentraciones de BrO3- en estas disoluciones de calibración son: 0.5 µg/L, 1.0 µg/L, 1.5 µg/L, 2.0 µg/L, 2.5 µg/L, 3.0 µg/L, 3.5 g /L ,4.0 µg/L, 4.5 µg/L y 5,0 µg/L, respectivamente.

Preparar las disoluciones de calibración el día de uso.

**A.3.17.6.14** Disoluciones de regeneración.

**A.3.17.6.14.1** La elección depende del tipo de columnas de limpieza de metal o de los dispositivos supresores. Por lo tanto, seguir las instrucciones del fabricante de la columna para la composición exacta de las disoluciones de regeneración.

**A.3.17.6.15** Disolución blanco. Llenar un matraz aforado de 100 mL con agua.

**A.3.17.7** **Procedimiento**

**A.3.17.7.1 Requisitos mínimos esenciales**

**A.3.17.7.1.1** Preconcentración

Para concentraciones bajas de bromato puede requerirse el uso de una columna concentradora. Se pueden emplear técnicas en línea. Se debe asegurar que la recuperación se encuentre dentro de 80 % a 120 %.

**A.3.17.7.1.2** Poder de resolución de la columna

Es importante que la resolución de los picos R entre el bromato y el pico más cercano, que generalmente es cloruro no sea ser inferior a 1.3 (ver figura A.3.17-4).

**A.3.17.7.1.3 Método de detección**

La medición de la conductividad eléctrica (CD) con un dispositivo de supresión química y un detector UV, si se requiere realizar la confirmación.

**A.3.17.7.1.4** **Aplicabilidad del método**: 0.5 µg/L a 1000 µg/L.

**A.3.17.7.1.5** Garantía de calidad analítica

Es necesario realizar un control para la validez de la función de la calibración. Pueden ser necesarias determinaciones repetidas. El método de adición de estándar puede ser requerido cuando se esperan interferencias de la matriz.

**A.3.17.7.2 Muestreo y pretratamiento de la muestra**

**A.3.17.7.2.1 Requisitos generales**

**A.3.17.7.2.1.1** Tratar las disoluciones de calibración y la disolución blanco igual que la disolución de la muestra (ver la figura A.3.17-5).

**Figura A.3.17-5 -** Etapas de pretratamiento de las muestras, la calibración y la disolución blanco.



**A.3.17.7.2.1.2** Utilizar vasos de polietileno limpios para el muestreo.

**A.3.17.7.2.1.3** Evitar cualquier formación adicional de bromato después del muestreo, eliminando inmediatamente el ozono presente. Por ejemplo, adicionar 50 mg de etilendiamina a 1 L de la muestra inmediatamente después del muestreo.

**A.3.17.7.2.1.4** Almacenar la muestra en un recipiente de polietileno de 2 °C a 6 °C hasta que el análisis se lleve a cabo.

**A.3.17.7.2.2 Eliminación de sulfato disuelto, cloruro, carbonato, ácido carbónico y metales.**

**A.3.17.7.2.2.1** Si se considera necesario, eliminar el cloruro, sulfato, carbonato y ácido carbónico con la ayuda de cartuchos de intercambio iónico, realizando las siguientes etapas de elución con una velocidad de flujo constante de entre 1 mL/min y 1.5 mL/min. Enjuagar con agua los cartuchos de intercambio iónico antes de su uso de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además, purgar la muestra con un gas inerte (por ejemplo N2 o He) para eliminar el dióxido de carbono (formado a partir de carbonato y sales de ácido carbónico).

La presencia de nitrato, cloruro, carbonato y sulfato puede afectar la capacidad de la columna concentradora y pueden ocasionar un bajo recobro de bromato. Este efecto se debe comprobar para cada matriz por adición de estándar, y el recobro de bromato debe estar en un intervalo de 80% a 120%.

**A.3.17.7.2.2.2** Preparar las muestras como se describe en A.3.17.7.2.1.

**A.3.17.7.2.2.3** Pasar aproximadamente 15 mL de la muestra a través de un intercambiador de cationes en la forma-Ba para eliminar los iones de sulfato disueltos de la muestra. Desechar los primeros 2 mL.

**A.3.17.7.2.2.4** Pasar aproximadamente 10 mL de la muestra restante a través de un intercambiador de cationes fuertemente ácido en la forma-Ag para eliminar los haluros disueltos de la muestra. Desechar la primera porción de 2 mL.

**A.3.17.7.2.2.5** Pasar aproximadamente 8 mL de la muestra restante a través de un intercambiador de cationes en la forma-H para eliminar los iones metálicos disueltos, carbonato y ácido carbónico de la muestra (véase la figura A.3.17-5, paso 4). Desechar la primera porción de 2 mL.

**NOTA:** Alternativamente se pueden conectar todas las columnas de limpieza/cartuchos (véase la figura A.3.17-5, los pasos 2 a 4). En este caso, los primeros 3 mL de eluato de la muestra que queda al final del último cartucho deben ser desechados.

**A.3.17.7.2.2.6** Purgar la muestra restante durante aproximadamente 5 minutos con un gas inerte (por ejemplo N2, He) para eliminar el dióxido de carbono de la muestra y analizar el eluato resultante de la muestra usando el sistema de cromatografía iónica.

**A.3.17.7.3 Desarrollo**

**A.3.17.7.3.1 Generalidades**

Montar el sistema de cromatografía iónica según las instrucciones del fabricante del instrumento. Correr el eluyente de inicio; una vez que la línea base esté estable se puede comenzar el análisis.

La columna de limpieza de metal (si se utiliza), columnas concentradoras y dispositivos de supresión utilizados, se deben regenerar de acuerdo con las instrucciones del fabricante del instrumento antes de su uso. Realizar la calibración, posteriormente medir las muestras y la solución blanco.

**A.3.17.7.3.2 Calibración**

Inyectar las disoluciones de calibración de bromato pretratadas. En el cálculo de las concentraciones, utilizar el área (o altura) del pico (señal) proporcional a la concentración del ion bromato.

Evaluar al inicio el sistema analítico y después a intervalos, establecer una función de calibración para la medición como sigue:

**A.3.17.7.3.2.1** Preparar las disoluciones de calibración de bromato.

**A.3.17.7.3.2.2** Analizar las disoluciones de calibración por cromatografía.

**A.3.17.7.3.2.3** Utilizar los datos obtenidos para calcular la regresión lineal

**A.3.17.7.3.2.4** Posteriormente, verificar la validez de la función de calibración establecida.

**A.3.17.7.3.3 Medición de bromato**

**A.3.17.7.3.3.1** Después de establecer la función de calibración, inyectar la muestra preparada en el cromatógrafo y medir los picos como se describió anteriormente.

Identificar el pico de bromato mediante la comparación del tiempo de retención con el de bromato en las disoluciones estándar. Tener en cuenta el hecho de que los tiempos de retención pueden ser dependientes de la concentración y de la matriz.

**A.3.17.7.3.3.2** Si no se utiliza una columna de concentración, se recomienda el uso de una precolumna, especialmente para la inyección de aguas muy contaminadas de compuestos orgánicos. Esto es para proteger al separador analítico de la columna.

**NOTA:** En general se pueden utilizar dos tipos diferentes de precolumnas: las que contienen el mismo material de resina como la columna analítica separadora y las empacadas con un polímero macroporoso. Si la concentración de bromato de la muestra sobrepasa el intervalo de calibración, diluir la muestra y volver a analizarla.

**A.3.17.7.3.3.3** Si la concentración de bromato de la muestra no alcanza el intervalo de calibración, establecer una función de calibración separada para un intervalo de trabajo más bajo, preconcentrar la solución de bromato, si es necesario, y analizarlo.

Existe una serie de sistemas disponibles que se pueden llevar a cabo en la etapa de preconcentración. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para cada sistema.

**A.3.17.7.3.3.4** Si se esperan interferencias de la matriz, utilizar el método de adición de estándar para confirmar los resultados (verificar los picos comparando el tiempo de retención de la muestra fortificada con los de la muestra original).

**A.3.17.7.3.3.5** Medir la disolución blanco de la misma manera.

**A.3.17.7.3.4 Confirmación de los resultados de bromato**

Si es necesario, confirmar las concentraciones de bromato mayores a 2 µg/L por detección UV (λ= 200 nm) como sigue.

**A.3.17.7.3.4.1** Calcular las pendientes del CD de bromato (b1) y del detector de UV (b2) a partir de los experimentos de calibración y calcular el factor B usando la siguiente ecuación.

Donde

b1 es la pendiente de la función de calibración para el detector de CD, por ejemplo, mm · L/mg; µV ·s· L/mg;

b2 es la pendiente de la función de calibración para el detector de UV, por ejemplo, mm · L/mg; µV· s ·L/mg

**A.3.17.7.3.4.2** Analizar una disolución de calibración de bromato, por ejemplo, (BrO3) = 10 µg/L.

**A.3.17.7.3.4.3** Registrar el valor medido CD (Y1) y el valor medido UV (Y2) de bromato.

**A.3.17.7.3.4.4** Calcular la intersección de las ordenadas para CD (a1) y UV (a2).

**A.3.17.7.3.4.5** Calcular la relación de respuesta r:

Dónde:

r es la relación de respuesta;

Y1  es el valor medido (tamaño de la señal) para el detector de CD, en términos de la altura del pico o el área del pico, respectivamente, en milímetros o microvoltios segundos;

Y2 es el valor medido (tamaño de la señal) para el detector de UV, en términos de la altura del pico o el área del pico, respectivamente, en milímetros o microvoltios segundos;

a1 es la intersección de ordenadas de la función de calibración (blanco calculado) para el detector de CD, por ejemplo, mm, µV · s

a2 es la intersección de ordenadas de la función de calibración (blanco calculado) para el detector de UV, por ejemplo, mm, µV · s

r deberá estar en el intervalo de B ± 10 %. Si r excede el intervalo de 10 %:

* Utilizar el método de adición de estándar;
* Calcular de nuevo r; si r sigue siendo superior al intervalo de B±10 %, reportar el resultado como "bromato no confirmado".

**A.3.17.7.3.5 Comprobación de la validez de la función de la calibración**

Con el fin de verificar la validez de la continuidad de la función de calibración, medir disoluciones estándar de diferentes concentraciones de bromato en el nivel inferior y en el tercer nivel superior del intervalo de trabajo. Llevar a cabo esto después de poner en marcha el análisis y después de al menos cada serie de muestras, pero en cualquier caso después de 20 mediciones. Recalibrar, si es necesario.

**A.3.17.8** **Análisis de Resultados y Cálculos**

Calcular la concentración de masa , en miligramos por litro de bromato en la solución usando las áreas de los picos o las alturas de los picos. Tener en cuenta todas las etapas de dilución.

**A.3.17.8.1** **Expresión de los resultados**

Los resultados deberán ser reportados con máximo cuatro cifras significativas.

Ejemplos

Bromato (BrO3 -) 0.005 mg/L

Bromato (BrO3 -) 0.015 mg/L

**A.3.17.8.2** **Reporte de resultados**

El informe de ensayo debe contener la siguiente información:

**A.3.17.8.2.1** Identidad de la muestra de agua;

**A.3.17.8.2.2** Expresión de los resultados;

**A.3.17.8.2.3** Descripción de pretratamiento de la muestra, si es el caso;

**A.3.17.8.2.4** Cualquier desviación de este método.

**A.3.17.9 Información adicional (sección A)**

**A.3.17.9.1 Eluyentes**

**A.3.17.9.1.1 General**

Se pueden utilizar disoluciones de hidróxido de sodio y disoluciones de sal de ácidos débilmente disociados, tales como carbonato de sodio/bicarbonato de sodio y bicarbonato de sodio/tetraborato de sodio.

**A.3.17.9.1.2** Bicarbonato de sodio concentrado **I**

La adición del siguiente eluyente concentrado es apropiado para la preparación de eluyente:

Colocar 58,8 g de bicarbonato de sodio en un matraz aforado de 1000 mL, disolver en agua y llevar a volumen con agua.

La disolución contiene 0.7 mol/L de bicarbonato de sodio. Esta solución es estable durante varios meses si se almacena de 2 °C a 6 °C.

**A.3.17.9.1.3 Bicarbonato de sodio eluyente I**

El siguiente eluyente es aplicable para la determinación de bromato:

Adicionar 5 mL de bicarbonato de sodio concentrado en un matraz aforado de 5000 mL y llevar a volumen con agua.

La disolución contiene 0.0007 mol/L de bicarbonato de sodio. La disolución debe ser renovada cada 3 días.

**A.3.17.9.1.4 Eluyente borato I**

El siguiente eluyente es aplicable para la determinación de bromato:

Colocar 76.3 g de tetraborato disodico decahidrato en un matraz aforado de 5000 mL, disolver en aproximadamente 4000 mL de agua y llevar a volumen con agua.

La solución contiene 0.04 mol/L de tetraborato disodico. La solución debe ser renovada cada 3 días.

**A.3.17.9.2 Ejemplos de eluyentes tipo 2 que deben utilizarse para eliminar los iones fuertemente retenidos**

**A.3.17.9.2.1 General**

Se pueden utilizar disoluciones de hidróxido de sodio y disoluciones de sal de ácidos débilmente disociados, tales como carbonato de sodio/bicarbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tetraborato de sodio.

**A.3.17.9.2.2 Carbonato de sodio/bicarbonato de sodio concentrado II**

La adición del siguiente eluyente concentrado es apropiada para la preparación del eluyente.

Colocar 10.6 g de carbonato de sodio y 8.4 g de bicarbonato de sodio en un matraz aforado de 1000 mL, disolver en agua y llevar a volumen con agua.

La disolución contiene 0.1 mol/L de carbonato de sodio y 0.1 mol/L de bicarbonato de sodio. La disolución es estable durante varios meses si se conserva de 2 °C a 6 °C.

**A.3.17.9.2.3 Carbonato de sodio/bicarbonato de sodio eluyente II**

El siguiente eluyente se utiliza para la eliminación de iones fuertemente retenidos en la columna del separador.

Colocar 50 mL del concentrado en un matraz aforado de 500 mL y llevar a volumen con agua.

La disolución contiene 0.01 mol/L de carbonato sódico y 0.01 mol/L de bicarbonato de sodio. La solución debe ser renovada cada 3 días.

**A.3.17.9.2.4 Eluyente borato II**

El siguiente eluyente se utiliza para la eliminación de iones fuertemente retenidos en la columna del separador.

Colocar 477 g de tetraborato disódico decahidrato en un matraz aforado de 5000 mL, disolver en aproximadamente 4000 mL de agua y llevar a volumen con agua.

La disolución contiene 0.25 mol/L de tetraborato disódico. La disolución debe ser renovada cada 3 días.

**A.3.17.10 Información adicional (Sección B)**

(Informativo)

**Soluciones Regeneradoras**

**A.3.17.10.1 General**

Si se utilizan columnas de limpieza de metal y/o dispositivos supresores, estas se deben regenerar en una base regular. El momento de la regeneración se determinará para cada sistema, y las siguientes disoluciones regeneradoras pueden ser utilizadas.

**A.3.17.10.2 Ejemplo de una disolución regeneradora para columnas de limpieza de metal**

El uso de ácido nítrico es aplicable para la regeneración de columnas de limpieza de metal.

**A.3.17.10.3 Ejemplo de una disolución regeneradora para dispositivos supresores**

El uso de ácido sulfúrico es aplicable para la regeneración de los dispositivos supresores.

Adicionar 3.5 mL de ácido sulfúrico en aproximadamente 4000 mL de agua en un matraz aforado de 5000 mL y diluir a volumen con agua.

La disolución contiene 0.0126 mol/L de H2SO4 y es estable durante varios meses si se almacena a ≤ 30 °C.

**A.3.17.11 Información adicional (sección C)**

**Ejemplo de la técnica de conmutación (switching) de la columna**

**A.3.17.11.1 Generalidades**

Establecer el sistema de cromatografía iónica.

Se deben seguir siempre las instrucciones del fabricante. El tiempo requerido para el lavado y el equilibrio del sistema dependen, por ejemplo, de las propiedades tanto de la columna de intercambio iónico como del eluyente utilizado. Verificar este tiempo experimentalmente. Todas las operaciones de válvulas y bombas pueden ser controladas externamente por un dispositivo de secuencia de tiempo (por ejemplo, una estación de bases de datos cromatográficos en la PC). Regenerar la columna de limpieza de metal de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**A.3.17.11.2 Preparación del sistema y carga de la muestra en el loop**

Encender la válvula 1 (ver figura A.3.17-6) para permitir el paso de agua a través de la columna de limpieza de metal en la columna concentradora. Enjuagar el sistema con agua. Llenar el loop de inyección con la muestra pretratada.

**A.3.17.11.3 Inyección de la muestra y preconcentración**

Inyectar 2 mL de la muestra pretratada por la válvula 1 a través de la columna de limpieza de metal en la columna concentradora.

**A.3.17.11.4 Elución y separación de bromato**

Encender la válvula 2 en posición de manera que el eluyente tipo 1 sea bombeado a través del concentrador y la columna del separador.

**A.3.17.11.5 Registros**

Registrar la señal de salida del detector de conductividad (por ejemplo, el área del pico o la altura).

**A.3.17.11.6 Reacondicionamiento de columnas**

Pasar el eluyente tipo 2 utilizando la bomba de análisis (ver Figura A.3.17-6) a través del concentrador y la columna de separación. Enjuagar ambas columnas durante 5 minutos con eluyente tipo 2.

**A.3.17.11.7 Equilibrio del sistema de IC**

Utilizando la bomba del cromatógrafo (ver figura A.3.17-6) pasar el eluyente tipo 1 a través del concentrador y la columna de separación. Enjuagar ambas columnas durante 5 minutos con eluyente tipo 1. Equilibrar el cromatógrafo de iones siguiendo las instrucciones del fabricante del instrumento (por ejemplo, el instrumento está listo para su funcionamiento tan pronto como la línea base esté estable).

**A.3.17.11.8 Preparación de la muestra siguiente**

Concentrar y medir la siguiente muestra de acuerdo con los numerales A.3.17.11.1 a A.3.17.11.6.

**Figura A.3.17-6 -** Ejemplo de un sistema cromatográfico de iones utilizando la técnica conmutación (switching) de columnas



**Clave**

1 Válvula 1: 6- Válvula puerto de inyección

2 Válvula 2:8-Válvula porta columna

3 Columna de limpieza de metal

4 Agua

5 Bomba de muestreo

6 Muestra pretratrada

7 Columna concentradora

8 Precolumna

9 Eluyente

10 Loop de inyección de 2 mL

11 Desechos

12 Columna separadora

13 Detector de supresión CD

**A.3.17.12 Información adicional (sección D)**

 (Informativo)

**A.3.17.12.1 Tabla de interferencias verificadas**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentración de bromato controlada** |  | **Compuesto orgánico verificado y concentración adicionada a la solución estándar de bromato** | **Recobro de Bromato comprobado %** |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido ftálico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido oxálico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido malonico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido succínico  | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido glutámico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido glioxílico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido ketomálico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido pirúvico | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 100 µg/L ácido monocloroacético | No determinado |
| 10 µg/L bromato | + | 100 µg/L ácido monobromoacético | No determinado |
| 5 µg/L bromato | + | 10000 µg/L fenol | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L sacarosa y D-galactosa (mezcla) | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L D-glucosamina | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L glicina | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L urea | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L L-leucina and L-glutamina (mezcla) | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L L-fenilamina | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L albúmina | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 2000 µg/L acetato,4000 µg/L formiato, y4000 µg/L oxalato (mezcla) | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido butírico, ácido pirúvico y ácido glicólico, (mezcla) | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 1000 µg/L ácido tricloroacético | 95 a 105 |
| 5 µg/L bromato | + | 4000 µg/L ácido fúlvico | 92 a 93 |
| 5 µg/L bromato | + | 2000 µg/L ácido húmico | 100 |

**A.3.18** **Compuestos orgánicos no halogenados extraíbles por cromatografía de gases con detector de ionización de flama CG/FID.**

**A.3.18**.**1** **Fundamento**

Este método contiene los procedimientos de extracción, condiciones cromatográficas, ventanas de tiempo, requerimientos de control de calidad y cálculos para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos no halogenados.

Los compuestos orgánicos no halogenados en matriz agua, son extraídos con cloruro de metileno por extracción líquido-líquido, el extracto es analizado por cromatografía de gases inyectando 3 μL.

**A.3.18**.**2 Interferencias**

**A.3.18**.**2.1** Cuando se tienen muestras con hidrocarburos pesados es muy posible que estos se arrastren y contaminen inyecciones subsecuentes, provocando la aparición de picos o elevaciones de la línea base que no corresponden a las muestras que se analizan posteriormente. Para evitar este tipo de interferencias se recomienda purgar el equipo a 300°C durante 15 min, después del análisis de una muestra muy concentrada, o hacer corridas de cloruro de metileno antes de inyectar otras muestras.

**A.3.18.3 Materiales**

**A.3.18.3.1** Matraces de separación con llave de teflón de 2 litros

**A.3.18.3.2** Equipos concentradores kuderna danish (tubo concentrador, matraz de 500 mL y columna snyder de tres bolas)

**A.3.18.3.3** Matraces Erlenmeyer de 250 mL

**A.3.18.3.4** Matraces volumétricos de 1, 5 y 10 mL

**A.3.18.3.5** Vasos de precipitados de 100, 250 mL y 500 mL

**A.3.18.3.6** Embudos de filtración de tallo corto o largo

**A.3.18.3.7** Probetas graduadas de 10 y 100 mL y de 1 litro

**A.3.18.3.8** Pipetas Pasteur de 230 mm

**A.3.18.3.9** Viales de 2 mL aforados a 1.0 mL, transparentes

**A.3.18.3.10** Gradilla para viales de 2 mL

**A.3.18.3.11** Caja de papel filtro Whatman no. 41

**A.3.18.3.12** Perlas de ebullición

**A.3.18.3.13** Microjeringas de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 μL

**A.3.18.4 Equipo**

**A.3.18.4.1** Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (CG/FID), equipado con puerto de inyección capilar y automuestreador, así como columna capilar de 30 m, 25 mm de diámetro y película de metil silicón de 1.0 µm de espesor.

**A.3.18.4.2** Baño María con control de temperatura

**A.3.18.4.3** Vortex

**A.3.18.4.4** Parrilla de agitación magnética

**A.3.18.4.5** Termoblock

**A.3.18.4.56** Parrilla de calentamiento

**A.3.18.5 Reactivos y Materiales de Referencia**

**A.3.18.5.1** Cloruro de metileno grado plaguicida.

**A.3.18.5.2 Disoluciones de Calibración**

**A.3.18.5.2.1 Estándar de Compuestos Orgánicos No Halogenados (CONH).**

Mezcla de hidrocarburos lineales que contenga los siguientes hidrocarburos C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26 y C28 con una concentración de 2000 mg/L de cada compuesto (20000 mg/L de concentración total).

**A.3.18.5.2.2 Estándar de CONH de 1000 mg/L.**

Tomar 250 µL de la solución de CONH de 20,000 mg/L del punto A.3.18.5.2.1 en un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con cloruro de metileno.

**A.3.18.5.2.3 Estándar de CONH de 100 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.2, tomar 100 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno.

**A.3.18.5.2.4 Estándar de CONH de 10 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.3, tomar 100 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno.

**A.3.18.5.2.5 Estándar de CONH de 1.0 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.4, tomar 100 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno.

**A.3.18.5.2.6 Estándar de CONH de 0.1 mg/L**.

Del punto A.3.18.5.2.5, tomar 100 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno (QUINTO PUNTO DE CURVA).

**A.3.18.5.2.7 Estándar de CONH de 0.01 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.6, tomar 100 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno (SEGUNDO PUNTO DE CURVA).

**A.3.18.5.2.8 Estándar de CONH de 0.005 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.7, tomar 500 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno (PRIMER PUNTO DE CURVA).

**A.3.18.5.2.9 Estándar de CONH de 0.02 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.6, tomar 200 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno (TERCER PUNTO DE CURVA).

**A.3.18.5.2.10 Estándar de CONH de 0.05 mg/L.**

Del punto A.3.18.5.2.5, tomar 50 µL de la solución en un matraz volumétrico de 1 mL y aforar con cloruro de metileno (CUARTO PUNTO DE CURVA).

**A.3.18.6 Preservación y Almacenamiento de Muestras**

**A.3.18.6.1** Conservar la muestra a una temperatura menor a 6 °C hasta su análisis.

**A.3.18.6.2** Tiempo máximo previo al Análisis. El tiempo máximo previo a la extracción es de 7 días para aguas no embotelladas, para aguas embotelladas se debe analizar inmediatamente después de destapar la botella.

**A.3.18.7 Control de Calidad y Especificaciones de Aceptación y Rechazo**

**A.3.18.7.1 Verificación del equipo**

**A.3.18.7.1.1** Antes del análisis de cada lote analítico verificar que el instrumento esté libre de interferencias ocasionadas por inyecciones previas de muestras muy concentradas y sangrado de columna, contaminación por gases o por jeringa sucia, para tal efecto se realiza un blanco electrónico que consiste en hacer una corrida del método a utilizar, pero sin inyectar nada.

**A.3.18.7.1.2** El blanco electrónico no deberá presentar ningún pico ni elevación o bajas de línea base y en caso contrario se procederá a purgar el sistema con temperatura del horno a 300 °C durante 15 min.

**A.3.18.7.2 Verificación de la calibración inicial**

**A.3.18.7.2.1** La curva de calibración inicial deberá realizarse inyectando los estándares de calibración preparados en el punto A.3.18.5.2 y se considera lineal, si el por ciento de la desviación estándar relativa (%DER) de los factores de calibración (FC) es menor o igual al 15%, el cálculo de FC se realiza con la siguiente ecuación:

**FC = Total de área / Masa inyectada en nanogramos**

**A.3.18.7.2.2** La verificación de la calibración inicial puede también efectuarse mediante la regresión de mínimos cuadrados, en la cual el criterio de aceptación es que el coeficiente de correlación (r) sea mayor o igual a 0.99.

**A.3.18.7.2.3** Si los criterios para % de RSD y r no se cumplen se procede a la revisión del sistema cromatográfico o a la preparación de las disoluciones de calibración.

**A.3.18.7.2.4** Posteriormente la curva de calibración inicial, será aceptada si el análisis de un punto intermedio de la curva no presenta una variación de la concentración mayor del 15% y que será calculada de la siguiente manera:

**Diferencia de concentraciones (%) = [CC – CT / CT] \* 100**

Dónde:

**CC** es la Concentración calculada

**CT** es la concentración teórica

**Diferencia porcentual (%) = [FCv – FC / FC] \* 100**

Dónde:

**FCv** es el factor de calibración respuesta (cualquiera que aplique) de los compuestos del estándar de verificación.

**FC** es la media del factor de calibración o la media del factor de respuesta de la calibración inicial.

Si el criterio de aceptación para la diferencia de la concentración es mayor a 15% proceder a la revisión del sistema cromatográfico o a la preparación de la solución estándar utilizada (concentración media de la curva de calibración).

**A.3.18.7.3 Verificación de contaminación de reactivos**

**A.3.18.7.3.1** Para cada lote de análisis preparar un blanco de reactivos, procesando agua tipo I de la misma forma en que se procesan las muestras reales, utilizando los mismos solventes y reactivos.

**A.3.18.7.3.2** El blanco de reactivos no deberá presentar ningún pico a excepción del pico del solvente, en caso de que se presenten picos en el cromatograma proceder a la localización de la fuente de contaminación (solventes, reactivos o material).

**A.3.18.7.4 Verificación del proceso analítico**

**A.3.18.7.4.1** Verificar que la recuperación promedio de la muestra de control de calidad esté entre el 70% y el 130%, en caso de no cumplir con el criterio, proceder a la revisión del sistema cromatográfico, a la preparación de la muestra control, etc. Determinar el error, corregir y continuar con el análisis.

**A.3.18.7.5 Verificación de interferencia de matriz**

**A.3.18.7.5.1** Analizar muestras adicionadas. Verificar que la recuperación promedio de las muestras adicionadas estén entre 70 – 130 %, de no ser así, revisar el sistema cromatográfico, etc. Determinar la variación, corregir y continuar con el análisis.

**A.3.18.7.6 Verificación de la precisión del proceso analítico**

**A.3.18.7.6.1** La precisión del lote analítico se realiza mediante el análisis de una muestra por duplicado.

**A.3.18.7.6.2** Calcular la diferencia porcentual relativa entre la muestra y la muestra duplicada, el valor deberá ser menor al 20%:

**Diferencia porcentual Rel. = [ (X1-X2)(2)/(X1+X2)] \* 100**

Dónde:

**X1** es el valor de concentración del compuesto en la muestra.

**X2** es el valor de concentración del compuesto en la muestra duplicada.

**A.3.18.7.7 Verificación de la estabilidad de la curva de calibración**

**A.3.18.7.7.1** Analizar un estándar de concentración media de la curva y un blanco de reactivos, cada 20 muestras o 12 horas de análisis, y verificar el porcentaje de la variación de la concentración y proceder como en el punto A.3.18.7.2.

**A.3.18.7.8 Criterios de aceptación y rechazo.**

**A.3.18.7.8.1 Verificación del equipo.**

Equipo libre de interferencias (blanco electrónico). No debe presentar ningún pico o perfil de picos en ningún tiempo de retención.

**A.3.18.7.8.2 Verificación de la calibración inicial.**

Evaluación del estándar de verificación (punto intermedio de la curva de calibración; % de diferencia de la concentración. Menor al 15%.

**A.3.18.7.8.3 Verificación del proceso analítico.**

Blanco de Reactivos. No debe presentar ningún pico o perfil de picos al tiempo de retención del analito a identificar.

Evaluación de muestra de control de calidad (MCC). La recuperación de la concentración de la muestra control se deberá encontrar dentro del criterio de aceptación de 70-130 %.

**A.3.18.7.8.4 Verificación de interferencia de matriz**

Evaluación de muestras adicionadas. % de recuperación del 70 – 130%.

**A.3.18.7.8.5 Verificación de la precisión del método.**

Evaluación de muestras duplicadas. La recuperación de la muestra duplicada deberá cumplir con el criterio de aceptación ≤ 20%

**A.3.18.7.8.6 Estabilidad de la curva de calibración.**

Evaluación del estándar de verificación (punto intermedio de la curva de calibración; % de diferencia de la concentración, menor al 15%.

**A.3.18.8 Calibración**

**A.3.18.8.1** Calibración Inicial. El procedimiento utilizado para la calibración de este método es el de estándar externo y se inyectaran 3 µL por triplicado de cada uno de los niveles requeridos, al final realizar el promedio de las tres curvas y agregarlo de forma manual a la tabla de calibración del método.

**A.3.18.8.2 Preparar la curva de calibración como se indica a continuación.**

**A.3.18.8.3** Cálculo para determinar el volumen a usar de las disoluciones a partir de la cual se preparan los puntos de la curva:

**V1 = C2\*V2 / C1**

Dónde:

**V1** es el volumen en mL a partir de la disolución patrón.

**C1** es la concentración total requerida para cada punto de la curva de calibración en mg/L.

**C2** es la concentración de la disolución de referencia que es la suma de las concentraciones de todos los compuestos de la disolución (C10 a C28) en mg/L.

**V2** es el volumen final (aforo) en mL de cada punto de la curva de calibración.

**A.3.18.8.4** A partir de la disolución patrón, calcular la masa que será utilizada para preparar los diferentes niveles de la curva de calibración en una masa total de 1g, de acuerdo a la siguiente ecuación.

**P1 = C2\*P2\*D1 / C1\*D2:**

Dónde:

**P1** es el peso de la disolución de referencia (g).

**C1** es la concentración de la solución de referencia que es la suma de las concentraciones de todos los compuestos de la disolución (C10 a C28) en mg/L.

**C2** es la concentración total del nivel requerido, que es la suma de las concentraciones de todos los compuestos de la disolución (C10 a C28) en mg/L.

**P2** es el peso de aforo del nivel requerido (g). Es la suma de la masa de la disolución patrón y la masa del disolvente (g)

**D1** es la densidad de la disolución de patrón (g/mL).

**D2** es la densidad del disolvente de aforo (g/mL).

**A.3.18.8.5** Calcular la concentración real de cada uno de los niveles de concentración utilizando la siguiente ecuación:

**C3= C1\*P1\*D3 / P3\*D1**

Dónde:

**C3** es la concentración real de cada nivel (mg/L)

**C1** es la concentración de la solución de referencia que es la suma de las concentraciones de todos los compuestos de la disolución (C10 a C28) en mg/L.

**P1** es el peso de la mezcla de referencia utilizada (g).

**P3** es el peso de aforo (estándares + disolvente) en g.

**D1** es la densidad de la mezcla de referencia (g/mL).

**D3** es la densidad del disolvente de aforo (g/mL).

**A.3.18.8.6** Linealidad de la calibración. La calibración será lineal, si el porcentaje de la desviación estándar (%DER) de los factores de calibración es menor que el 20% sobre el rango de trabajo, la linealidad a través del origen puede asumirse y el promedio del factor de calibración puede usarse en lugar de una curva de calibración.

**A.3.18.8.7** Calcular el factor de correlación (r), si se utilizó una regresión de mínimos cuadrados, el cual deberá de tener un valor > 0.99.

**A.3.18.8.8** Si el valor de %DER es mayor al 20 % o el valor de r es menor a 0.99, la linealidad no puede asumirse y se procederá a encontrar las causas, corregirlas y reanalizar para cada nivel de calibración.

**A.3.18.9 Procedimiento**

**A.3.18.9.1 Preparación y extracción de la muestra:**

**A.3.18.9.2** Enjuagar el material de vidrio con Cloruro de Metileno, sonicar los magnetos con cloruro de metileno durante dos minutos, repetir el proceso tres veces.

**A.3.18.9.3** Tomar un litro de cada muestra en matraz de separación de dos litros, incluyendo blanco de reactivos, muestras control, muestra adicionada y muestras reales.

**A.3.18.9.4** Medir el pH de cada muestra y ajustar si es necesario con ácido sulfúrico 1:1 o con hidróxido de sodio 10 N de modo que el pH quede en el intervalo de 5 a 9.

**A.3.18.9.5** Agregar 50 mL de cloruro de metileno, agitar durante tres minutos, después de la agitación dejar reposar para la separación de las fases, recuperar el cloruro metileno en un matraz erlenmeyer de 250 mL, pasándolo previamente por un embudo de filtración con fibra de vidrio o papel filtro No. 41 y sulfato de sodio anhidro calcinado. Si la muestra presentara problemas de emulsión durante la extracción se deberán utilizar procedimientos mecánicos de separación, como centrifugación, filtración, etc.

**A.3.18.9.6** Extraer dos veces más con 25 mL de cloruro de metileno como en el inciso anterior y los extractos se recuperan en el mismo matraz erlenmeyer.

**A.3.18.9.7** Concentrar los extractos en Kuderna Danish en baño María a una temperatura entre 60 y 65°C y hasta que el volumen aparente del extracto sea menor de 1 mL (no dejar secar el extracto ya que se pierden los compuestos orgánicos semivolátiles ligeros), posteriormente retirar la columna Snyder y con una pipeta pasteur recuperar el extracto en vial aforado de 2 mL, aforar a la marca de 1 mL con evaporación con nitrógeno a temperatura ambiente y proceder al análisis cromatográfico.

**A.3.18.10 Análisis cromatográfico**

**A.3.18.10.1 Condiciones cromatográficas:**

|  |
| --- |
| **Flujos de gases para detector de FID** |
| Aire | 400 mL/min |
| Hidrógeno | 40 mL/min |
| Nitrógeno | 40 mL/min |
| **Flujos de gases en el cromatógrafo** |
| Split | 10 mL/min |
| Septum purge | 3 – 4 mL/min |
| Presión en columna | 20 psi (H2) |
| Flujo de gas acarreador (H2) | 1 – 3 mL/min |
| **Temperaturas y rampas de análisis** |
| Temperatura del detector | 310 °C |
| Temperatura de inyector | 280 ° C |
| Temperatura inicial del horno | 60 °C |
| Tiempo inicial | 1 min |
| Primera rampa | 75 °C/min |
| Temperatura final de la rampa | 310 °C |
| Tiempo final | 5 min |

**NOTA:** Las condiciones cromatográficas dependen de la columna y el equipo utilizado, por lo que pueden variar para optimizar la resolución y tiempo de análisis.

**A.3.18.11 Cálculos**

**A.3.18.11.1** La concentración para muestras de aguas se determinará en mg/L con la siguiente ecuación:

C = (AT – b)/m

Dónde:

**C** es la concentración de la muestra en mg/L

**AT** es el área total en la ventana cuantitativa

**b** es la ordenada al origen de la regresión lineal de la curva de calibración

**m** es la pendiente de la regresión lineal de la curva de calibración

**A.3.18.11.2** La concentración de la muestra (C) se obtiene de extrapolar el área total de los picos en la ventana cuantitativa utilizando la siguiente ecuación:

Conc. en mg/L = (C)(A)(D)/ M

Dónde:

**C** es la concentración de la muestra en mg/L

**A** es el volumen de aforo o volumen de concentración final del extracto en L.

**D** es el factor de dilución del extracto

**M** es el volumen de la muestra extraída en L.

**A.3.18.12 Informe de Resultados**

**A.3.18.12.1** Reportar los compuestos orgánicos no halogenados (CONH) en mg/L, el cual es la suma de los compuestos hidrocarburos C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26 y C28.

**TRANSITORIOS**

**PRIMERO.-** La presente modificación entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

**SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.**

**MÉXICO, D. F., A \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ DE 2017.**

**EL COMISIONADO FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS**

 **SANITARIOS Y PRESIDENTE DEL COMITÉ CONSULTIVO NACIONAL DE**

 **NORMALIZACIÓN DE REGULACIÓN Y FOMENTO SANITARIO**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**JULIO SANCHEZ Y TEPOZ**