

# Determinación de plomo en orina - Método de quelación-extracción / Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-013/A87

*Palabras clave:* plomo, sangre, espectrofotometría de absorción atómica.

## PRESENTACIÓN

El método "*Determinación de plomo en orina - Método de quelación-extracción/Espectrofotometría de Absorción Atómica*" es un es un **MÉTODO ACEPTADO** por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende: un método utilizado en el INSHT y que ha sido sometido a un protocolo de validación por organizaciones oficiales competentes en el tema, o bien ha sido adoptado como método recomendado por entidades profesionales; así como, aquellos métodos recomendados por la UE o basados en métodos ampliamente conocidos y utilizados por especialistas en este tipo de análisis.

El método que se presenta es una reestructuración, atendiendo a ISO 78/2 de la NORMA HA-215 (Determinación de plomo en orina) del INSHT, basada en el método 8003 de NIOSH (9.1).

## Índice

### 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

### 2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

### 3. REACTIVOS

- 3.1. Octil-Fenoxi-Polietoxietanol
- 3.2. Pirrolidinditiocarbamato de amonio
- 3.3. Isobutilmetilcetona
- 3.4. Nitrato de Plomo (II)
- 3.5. Ácido nítrico
- 3.6. Disolución triton X-100/APDC
- 3.7. Isobutilmetilcetona saturada con agua
- 3.8. Disolución patrón de plomo de 1000 mg/ml
- 3.9. Disoluciones de trabajo

### 4. APARATOS Y MATERIAL

- 4.1. Tubos de polietileno
- 4.2. Tubos de vidrio borosilicatado
- 4.3. Agitador
- 4.4. Centrifuga
- 4.5. Espectrofotómetro de absorción atómica

### 5. TOMA DE MUESTRAS

## 6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- 6.1. Limpieza y acondicionamiento del material
- 6.2. Preparación de la muestra
- 6.3. Preparación de patrones y curva de calibración
- 6.4. Determinación espectrofotométrica

## 7. CÁLCULOS

## 8. PRECISIÓN

## 9. BIBLIOGRAFÍA

## ANEXO A

---

### 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Se describe en este método el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de plomo (Nº CAS 7439-92-1) en orina por espectrofotometría de absorción atómica con llama, en un rango de concentraciones de 50-300 µg de Pb/litro de orina (0,24-1,45 µmol/litro).

El método es útil para realizar el seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas, siendo especialmente adecuado para la detección de sobreexposiciones a compuestos de tetraalquilplomo, para las que el contenido de plomo en sangre no es un índice satisfactorio.

### 2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La muestra de orina se recoge en un frasco de polietileno, utilizando ácido nítrico como conservante. El plomo se compleja con pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) y el complejo se extrae con isobutilmetilcetona (MIBK).

El plomo contenido en la fase orgánica se determina por espectrofotometría de absorción atómica con llama a una longitud de onda de 283,3 nm, utilizando un método directo de cuantificación.

### 3. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados deben tener, como mínimo, la especificación "para análisis" y el agua debe ser bidestilada o equivalente.

**3.1. Octil-fenoxi-polietoxietanol** (Triton X-100).

**3.2. Pirrolidinditiocarbamato de amonio** (APDC).

**3.3. Isobutilmetilcetona** (MIBK) para análisis por extracción con un contenido en plomo < 0.00001 %.

**NOTA:** SUSTANCIA FACILMENTE INFLAMABLE. Frases (R): 11, Frases (S): 9-16-23-33. Real Decreto 2216/1985 (9.2).

**3.4. Nitrato de plomo (II)**

**NOTA:** SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 20/22-23. Frases (S): 13-20/21. Real Decreto 2216/1985 (9.2).

**3.5. Ácido nítrico concentrado**, min. 65%.

**NOTA:** SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA. Frases (R): 35. Frases (S): 2-23-26-27. Real Decreto 2216/1985 (9.2).

**3.6. Disolución Tritón X-100/APDC:** 20 g/l de APDC, y 2,5% (V/V) de Tritón X-100. Disolver 4 g de APDC en 40 ml de agua y añadir 5 ml de Tritón X-100. Completar hasta 200 ml con agua. Si la disolución presenta turbidez se aconseja filtración previa a su utilización. Dada su inestabilidad se aconseja el uso de la disolución recientemente preparada.

**3.7. Isobutilmetilcetona saturada con agua:** Mezclar 900 ml de MIBK con 100 ml de agua, agitando para conseguir la saturación, y dejar reposar durante 1 hora para separar la fase orgánica.

**3.8. Disolución patrón de plomo de 1.000 mg/ml:** Secar nitrato de plomo (3.4) a 120 °C durante 4 horas y dejar enfriar en desecador. Pesar 1,598 g y disolver en ácido nítrico al 1 % (V/V) hasta completar 1 litro de disolución.

**3.9. Disoluciones de trabajo:** Preparar una disolución intermedia de 10 µg Pb/ml, tomado 1 ml de la disolución patrón 3.8 y diluyendo a 100 ml.

De la disolución de 10 µg/ml se toman alícuotas de 0,5; 1; 2 y 3 ml y se aforan a 100 ml con agua, obteniéndose, las disoluciones de trabajo de 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3 µg Pb/ml.



## 4. APARATOS Y MATERIAL

**4.1. Frascos de polietileno** de 25 ml y 2 l.

**4.2. Tubos de centrifuga** de 20 ml provistos de cierre hermético.

**4.3. Agitador** mecánico de vórtice.

**4.4. Centrifuga** capaz de alcanzar 2.000 r.p.m.

**4.5. Espectrofotómetro de absorción atómica** provisto de lámpara de plomo y cabeza de mechero para llama de aire-acetileno.



## 5. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de orina, preferentemente de 24 horas, se toman en frascos de polietileno de 2 l que contienen 0,5 ml de ácido nítrico concentrado. Después de homogeneizar la muestra agitando, se transfiere una alícuota de 40 ml a un frasco para enviar al laboratorio.

Hasta el momento de efectuar el análisis, las muestras deben conservarse refrigeradas.



## 6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### 6.1. Limpieza del material

Todo el material de vidrio utilizado en el análisis, después de su lavado, debe mantenerse sumergido durante varios minutos en ácido nítrico 1:1 y ser después cuidadosamente enjuagado con agua bidestilada.



### 6.2. Preparación de la muestra

**6.2.1.** Pipetear 10 ml de orina en un tubo de centrifuga.

**6.2.2.** Añadir 1 ml de disolución de Tritón X-100/APDC y agitar mecánicamente durante 10 segundos.

**6.2.3.** Añadir 2 ml de MIBK saturada de agua, tapan el tubo herméticamente y agitar durante 2 minutos invirtiendo los tubos a intervalos regulares.

El complejo APDC-Pb en MIBK es poco estable, por lo que el análisis debe efectuarse lo antes posible y en cualquier caso antes de las dos horas siguientes a la extracción del complejo.

**6.2.4.** Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, repitiendo la operación si la separación no es aceptable.



### 6.3. Preparación de patrones y curva de calibrado

**6.3.1.** Preparar las disoluciones de 0,05; 0,1; 0,2 y 0,3 µg Pb/ml del modo indicado en 3.9.

**6.3.2.** De cada una de estas disoluciones pipetear 10 ml en sendos tubos de centrifuga.

6.3.3. Con dada uno de los patrones se sigue el mismo proceso que para las muestras indicado en 6.2.2., 6.2.3. y 6.2.4.

6.3.4. Debe someterse al mismo proceso que las muestras y patrones un ensayo en blanco de agua bidestilada.

6.3.5. Con las lecturas obtenidas para los patrones, corregidas con el valor del blanco, se construye la gráfica señal-concentración, ajustando los puntos obtenidos a una recta.

## 6.4. Determinación espectrofotométrica

### NOTA: MEDIDA DE SEGURIDAD.

Dadas las especiales características de la llama en este análisis, se hace necesaria su vigilancia continuada para evitar que se produzca un escape de acetileno en caso de que se apague.

6.4.1. Optimizar las condiciones instrumentales para disolventes orgánicos teniendo en cuenta que para evitar la aparición de coloración amarilla en la llama por exceso de combustible, debido a la presencia de MIBK, debe disminuirse la aportación de acetileno hasta lograr una relación de flujos y coloración de la llama adecuados (azul).

6.4.2. Aspirar el extracto orgánico, procedente de la centrifugación a la llama de aire-acetileno y medir las absorbancias registradas a 283,3 nm de muestras, patrones y blanco.

Entre una determinación y otra debe aspirarse MIBK saturada de agua.

## 7. CÁLCULOS

7.1. La concentración de Pb en orina de cada muestra se determina directamente por interpolación de la lectura obtenida restando el blanco, en la curva de calibrado.

7.2. Los resultados, expresados en micro g de plomo por litro de orina se obtienen mediante la siguiente expresión.

$$C = c \times 1000$$

C = Concentración de plomo en µg/litro de orina.

c = Concentración de plomo en µg/ml leída en la curva de calibración.

7.3. Los resultados pueden referirse a la cantidad de creatinina presente en la muestra mediante la siguiente expresión (9.3).

$$= \frac{\mu\text{g Pb/g creatinina}}{\text{g creatinina/l de orina}} \mu\text{gPb/l de orina}$$

La determinación de creatinina se describe en el [Anexo A](#).

## 8. PRECISIÓN

No se dispone de datos para el cálculo de la repetibilidad r y de la reproducibilidad R. El coeficiente de variación obtenido por NIOSH para el procedimiento analítico en el rango de 50-1500 µgPb/litro de orina es del 5% (9.1).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. National Institute for Occupational Safety and Health. **Manual of Analytical Methods, 3rd. ed. Vol. 1, Method 8003** DHHS (NIOSH) Publication 84-100, 1984.

2. **Reglamento sobre Declaración de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas**. Real Decreto 2216/1985 <sup>(1)</sup>, de 23 de Octubre (B.O.E. 27/9/85 y 9/5/86).
3. Harvey B. Elkins et al. **Concentration Adjustments in Urinalysis**. Am. Ind. Assoc. J. 35, 559-565, 1974.

## ANEXO A: DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA

### A.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método se basa en la medida de la velocidad con la cual la creatinina reacciona en medio alcalino con el ácido pícrico (Reacción de Jaffé), formando un compuesto coloreado, que se determina espectrofotométricamente a 520 nm.

### A.2. REACTIVOS

todos los reactivos deben tener como mínimo la especificación "para análisis". El agua utilizada ha de ser bidestilada o de calidad equivalente.

#### A.2.1. Hidróxido de Sodio

**NOTA:** SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 35, Frases (S): 2-26-37/39. Real Decreto 2216/1985. (9.2).

#### A.2.2. Ácido pícrico

**NOTA:** SUSTANCIA TOXICA Y EXPLOSIVA. Frases (R): 2-4-23/24/25. Frases (S): 28-35-37-44. Real Decreto 2216/1985 (9.2).

#### A.2.3. Ácido clorhídrico min. 30%

**NOTA:** SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (9.2).

#### A.2.4. Creatinina

#### A.2.5. Disolución de NaOH 0,4 N

Pesar 16,0 g de NaOH disolviendo y aforando a 1 litro con agua.

#### A.2.6. Disolución de ácido pícrico 0,0087 M

Disolver 2,0000 g de ácido pícrico en agua, aforando a 1 litro.

#### A.2.7. Patrón de creatinina (1 mg/ml).

Pesar 1,0000 g. de creatinina. Transferido a un matraz aforado de 1 litro con ayuda de un pequeño volumen de agua. Añadir 8,5 ml de ácido clorhídrico concentrado. Agitar hasta la disolución completando finalmente con agua. Estable al menos 1 mes.

### A.3. APARATOS Y MATERIAL

**A.3.1. Espectrofotómetro** o colorímetro capaz de leer a 520 nm.

#### A.3.2. Cronómetro

### A.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

**A.4.1.** Diluir la orina con agua 1/100.

**A.4.2.** Añadir 0,5 ml de la orina diluida a 1,0 ml de la disolución de hidróxido sódico. Mezclar bien y dejar estabilizar 5 minutos a temperatura ambiente.

**A.4.3.** Añadir 1,0 ml de la disolución de ácido pícrico. Mezclar bien y trasvasar inmediatamente a la cubeta del espectrofotómetro y después de exactamente 1 minuto medir la absorbancia ( $A_1$ ) a 520 nm. Exactamente 5 minutos después de la primera medida, volver a medir la absorbancia ( $A_2$ ) a 520 nm.

**A.4.4.** Proceder análogamente con 0,5 ml de la disolución patrón de creatinina (A.2.7).

La reacción del ALA con el ácido pícrico es muy sensible a la temperatura, por lo que todas las muestras y los patrones deben estar a la misma temperatura. Cuando dicha temperatura sea superior a 30 °C, la primera absorbancia debe ser leída a los 30 segundos.

## A.5. CÁLCULOS

La creatinuria se calcula según las siguientes ecuaciones:

$$c \text{ (mg creatinina/100 ml orina)} = \frac{A_2 - A_1}{A_{p2} - A_{p1}} \times 100$$

donde:

$A_2$  y  $A_1$ : Son las absorbancias de la muestra después de 5 minutos y 1 minuto respectivamente de comenzar la reacción (A.4.3.).

$A_{p2}$  y  $A_{p1}$ : Son las absorbancias correspondientes del patrón de creatinina.

$$C \text{ (g creatinina/l)} = \frac{c \text{ (mg creatinina/100 ml)}}{100}$$

Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al  
**Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo**  
[Centro Nacional de Verificación de Maquinaria](#)  
Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)  
Tfn. 944 990 211 - 9 44 990 543 Fax 944 990 678  
Correo electrónico.- [cnvminsht@mtas.es](mailto:cnvminsht@mtas.es)

## ADENDA

### Revisión normativa

Las disposiciones siguientes han sufrido modificaciones después de la edición de este método en formato papel:

<sup>(1)</sup> Real Decreto 2216/1985: Derogado por el [Real Decreto 363/1995](#)