

Determinación del ácido delta-aminolevulínico (ALA) en orina - Método de intercambio iónico / Espectrofotometría

MTA/MB-016/A87

Palabras clave: ALA, orina, plomo, espectrofotometría.

PRESENTACIÓN

El Reglamento para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos en el ambiente de trabajo (O.M. 9 de Abril de 1986, BOE 24-4-1986) incluye el nivel del ácido delta-aminolevulínico (ALA) en orina como parámetro bioquímico complementario a la plumbemia tanto en la evaluación y control de la exposición como en las medidas de prevención técnicas y médicas.

El método "*Determinación del ácido delta-aminolevulínico (ALA) en orina - Método de Intercambio Iónico / Espectrofotometría*" es un **MÉTODO ACEPTADO** por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende un método evaluado por el INSHT, según determinados criterios de validación y que ha sido suficientemente probado mediante ensayos de colaboración entre distintos laboratorios del INSHT.

El método que se presenta es un método utilizado en el INSHT, basado en el método de Davis indicado en la [Directiva 82/605/CEE](#) del Consejo sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición al plomo metálico y sus compuestos iónicos en el trabajo, y redactado en base a ISO 78/2.

Índice

0. INTRODUCCIÓN

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

4. APARATOS

5. TOMA DE MUESTRA

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

7. CÁLCULOS

8. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A

0. INTRODUCCIÓN

El método que se describe a continuación para la determinación de ALA en orina se encuentra referenciado en la [Directiva 82/605/CEE](#) (8.1) y está basado en el método de Davis (8.2).

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Se describe en este método el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación del ácido delta-aminolevulínico (ALA) en orina, utilizando un método espectrofotométrico. Es aplicable a la determinación de niveles de ALA fisiológicos y patológicos



de hasta 80 mg/l, equivalente a 66,7 mg/g creatinina, para una creatinuria de 1,2 g/l.

La determinación de ALA en orina es aplicable como parámetro complementario del nivel de plomo en sangre, al seguimiento de poblaciones laboralmente expuestas a plomo o sus compuestos iónicos, especialmente en el caso de niveles de exposición altos (plumbemias superiores a 35 µg/100 ml) (8.3).

Como factores que pueden influenciar el aumento de ALA en orina, aparte de la exposición a plomo o sus compuestos iónicos, hay que tener en cuenta el alcoholismo agudo, enfermedades graves del hígado y algunas formas de porfirias hepáticas (8.5).

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La orina se hace pasar a través de un sistema de dos columnas de intercambio iónico. En la primera, que contiene una resina aniónica, queda retenido el porfobilinógeno junto a otras interferencias. Sobre la segunda, conteniendo una resina catiónica, se retiene el ALA, que es posteriormente eluido con acetato sódico. A continuación se hace reaccionar con acetilacetona a pH 4,6 formándose un compuesto pirrólico que a su vez reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehido del reactivo de Ehrlich, dando un cromógeno de color rosado que se mide espectrofotométricamente a 553 nm.

3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

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

3.1. Resina de intercambio aniónico AG-1X8 de 100 a 200 mallas, en forma de acetato.

3.2. Resina de intercambio catiónico AG-50W-X4 de 100 a 200 mallas, en forma ácida.

3.3. Acetil acetona (2,4-Pentanodiona)

NOTA: SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 10-12. Frases (S): 21-23-24/25. Real Decreto 2216/1985 (8.4).

3.4. Acetato de sodio trihidratado.

3.5. Ácido acético glacial

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 10-35. Frases (S): 2-23-26. Real Decreto 2216/1985 (8.4).

3.6. p-Dimetilaminobenzaldehido (pDMAB).

3.7. Ácido perclórico: 70%

NOTA: SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA. Frases (R): 5-8-35. Frases (S): 23-26-36. Real Decreto 2216/1985 (8.4).

3.8. Clorhidrato del ácido delta-aminolevulínico (ALA-HCl).

3.9. Ácido clorhídrico min. 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (8.4).

3.10. Columnas de intercambio iónico.

Preparación de las columnas: Se realiza una suspensión de la resina, utilizando 3 g de resina (3.1, 3.2) y 7 ml de agua para cada columna. Se depositan 10 ml de dicha suspensión en una columna de vidrio o plástico, convenientemente cerrada con frita de vidrio o algodón, de manera que resulte una columna de 2 cm de altura y 1,5 cm de diámetro.

3.11. Disolución de Acetato de sodio 1 M.

Disolver 13,6 g de acetato de sodio trihidratado en agua y aforar a 100 ml.

3.12. Disolución tampón acético/acetato de pH = 4,6

Disolver 136 g. de acetato de sodio trihidrato en agua. Añadir 57 ml de ácido acético glacial y aforar finalmente a 1000 ml.

3.13. Reactivo cromógeno

Disolver 1,0 de p-dimetilaminobenzaldehído en 30 ml. de ácido acético glacial. Añadir con precaución 8 ml. de ácido perclórico al 70% aforando finalmente a 50 ml. con ácido acético glacial. Preparar extemporáneamente.

3.14. Disolución patrón de ALA (0,2 mg/ml).

Pesar 25,6 mg de ALA-HCl , disolviéndolo y aforándolo a 100 ml, con la disolución tampón pH = 4,6

3.15 Disolución patrón de trabajo de ALA (2 mg/100 ml)

En el momento del análisis, diluir 1.0 ml de la disolución patrón de ALA (3.14) a 10.0 ml con tampón acetato de pH = 4.6

4. APARATOS

Espectrofotómetro o colorímetro capaz de medir la absorbancia a 553 nm.

5. TOMA DE MUESTRAS

Recoger la orina de 24 horas. Añadir 3 ml de ácido clorhídrico concentrado. Mezclar bien y medir el volumen total. Conservarlo refrigerado. En estas condiciones el ALA es estable al menos en 2 semanas.

Para pruebas de selección de exposición al plomo, puede utilizarse cualquier muestra de orina.

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Colocar la columna que contiene la resina aniónica sobre la catiónica de manera que la primera descargue sobre la segunda.

Debajo del sistema de columnas colocar un matraz Erlenmeyer para la recogida de efluentes.

6.2. Pipetear en la columna superior 1,0 ml de la muestra de orina y 20,0 ml de agua bidestilada. Descartar el eluato.

6.3. Retirar y descartar la columna superior y reemplazar el matraz por un tubo de ensayo de 15 x 100 mm.

6.4. Pipetear 10,0 ml de la disolución de acetato sódico 1 M en la columna restante, recogiendo el eluato en su totalidad.

6.5. Añadir a cada tubo 0,2 ml de acetilacetona.

6.6. Preparación de blanco y patrón:

- Blanco: 10,0 ml de acetato de sodio 1 M y 0,2 ml de acetilacetona.
- Patrón: 9,9 ml de acetato de sodio 1 M; 0,1 ml de disolución patrón de trabajo de ALA y 0,2 ml de acetilacetona.

6.7. Agitar enérgicamente los tubos de muestras, blanco y patrón y mantenerlos al baño María hirviendo durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

6.8. En cubetas adecuadas colocar alícuotas de 1,0 ml del blanco patrón y muestras. Añadir a cada una 1,0 ml del reactivo cromógeno. Mezclar y esperar 15 minutos para que se desarrolle el color.

Leer las absorbancias a 553 nm frente al blanco. La coloración obtenida es estable sólo durante 15 minutos por lo que es necesaria su medida antes de que transcurra este periodo.

7. CÁLCULOS

La concentración de ALA en orina se calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{mg ALA/100 ml orina} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times C_p$$

donde C_p es la concentración de ALA en mg/100 ml del patrón (3.15).

$$\text{mg ALA/24 horas} = \text{mg ALA/100 ml orina} \times \frac{\text{volumen orina 24 h (ml)}}{100}$$

$$\text{mg ALA/g creatinina} = \frac{\text{mg ALA/24 horas}}{\text{g creatinina/24 horas}}$$

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

8. BIBLIOGRAFÍA

- 8.1. [Directiva 82/605/CEE](#) del Consejo de 28 de Julio de 1982, D.O. N° L 247, de 23-8-1982.
- 8.2. Davis, J. R., Aldeman, S.L. **Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning. I. A modified method for the rapid determination of urinary delta-aminolevulinic acid using disposable ion-exchange chromatography columns.** Arch. Environ. Health, 15, 53 (1967).
- 8.3. [Directiva 77/312/CEE](#) del Consejo, de 29 de Marzo de 1977, D.O. N° L105, de 28-4-1977.
- 8.4. **Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas.** Real Decreto 2216/1985 ⁽¹⁾ de 23 de Octubre (B.O.E. 27/ 9/85 y 9/5/86).
- 8.5. González Fernández E., M. Díaz González, J.M. Martínez Gil de Arana. **Consideraciones para la evaluación fiable de la intoxicación laboral por plomo inorgánico.** Medicina y Seguridad del Trabajo, XXX (120), 232-247, 1982.

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. (8.4).

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 (8.4).

A.2.3. Ácido clorhídrico min. 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA: Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (8.4).

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. Transferirlo 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. Tomar 0,1 ml de orina, diluyendo a 10,0 ml con agua.

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 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 (A.4.4).

c (mg/100 ml) x volumen orina 24 h (ml)



ADENDA

Revisión normativa

⁽¹⁾El Real Decreto 2216/1985 fue sustituido por el [Real Decreto 363/1995](#), que sufre periódicamente modificaciones por lo que es conveniente consultar los listados que en esta Web se trata de mantener actualizados



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