

# Determinación de isoflurano en aire exhalado - Método de captación en tubo adsorbente, desorción térmica / Cromatografía de gases.

MTA/MB-021/A92

*Palabras clave:* Isoflurano, aire exhalado, cromatografía de gases.

## PRESENTACIÓN

El isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil-difluorometiléter) es un anestésico inhalatorio muy utilizado en cirugía. Por esta razón resulta de interés disponer de un método ensayado y validado para la determinación de este compuesto en el aire exhalado final, para su utilización en el control biológico de la exposición a éste compuesto.

El método "*Determinación de isoflurano en aire exhalado-método de captación en tubo adsorbente / Desorción térmica / Cromatografía de Gases*" es un método **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 y que ha sido sometido a un protocolo de validación por organizaciones oficiales competentes en el área de la normalización de métodos analíticos, o bien ha sido adoptado como método recomendado por asociaciones profesionales dedicadas al estudio y evaluación de riesgos por agentes químicos, así como, aquellos métodos recomendados por la CE o basados en métodos ampliamente conocidos y evaluados por especialistas en este tipo de análisis.

El método que se presenta se ha estudiado siguiendo el protocolo de validación (10.2) establecido por el INSHT.

## Índice

### 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

### 2. DEFINICIONES

### 3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

### 4. REACTIVOS Y PRODUCTOS

#### 4.1. Gases

#### 4.2. Reactivos

### 5. APARATOS Y MATERIAL

#### 5.1. Material para la toma de muestras

#### 5.2. Aparatos y material para el análisis

### 6. TOMA DE MUESTRA

### 7. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

#### 7.1. Preparación de muestras y blancos

#### 7.2. Calibración

#### 7.3. Análisis cromatográfico

#### 7.4. Determinación de la eficacia de desorción

### 8. CÁLCULOS

#### 8.1. Cálculo de la eficacia de desorción

## 8.2. Determinación de la concentración de analito presente en cada tubo adsorbente

## 8.3. Determinación de la concentración de analito en aire exhalado

## 9. PRECISIÓN

## 10. BIBLIOGRAFÍA

# 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Se describe en este método el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la captación y el análisis de vapores de isoflurano (Nº CAS 26675-46-7) en aire exhalado. La captación se realiza mediante un sistema (5.1.1 y figura 1) que permite la selección de la fracción final del aire exhalado (2.1 y 6), reteniéndose los vapores presentes en un tubo adsorbente relleno de Chromosorb 106 (5.1.2.) para su análisis posterior mediante desorción térmica y cromatografía de gases.

El método se ha ensayado en el siguiente intervalo de concentraciones de isoflurano en aire exhalado (10.1, 10.2):

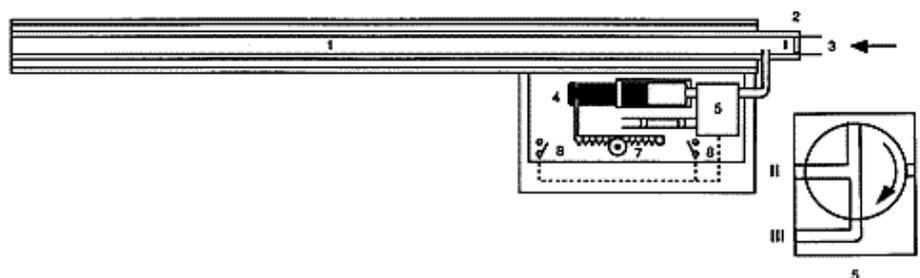
$$5,0 \text{ mg/m}^3 \text{ a } 24,8 \text{ mg/m}^3$$

Los datos de validación para este intervalo se incluyen en el [anexo A](#).

Estos límites se pueden modificar en la práctica, modificando el procedimiento operativo de toma de muestra, puesto que el sistema utilizado descrito en (5.1.1.) permite enriquecer la muestra recogida en el tubo adsorbente (5.1.2.) hasta alcanzar la cantidad adecuada para su análisis cromatográfico.

Cualquier compuesto presente en el aire exhalado que pueda captarse en el tubo adsorbente, y que tenga el mismo tiempo de retención que el isoflurano, en las condiciones descritas en el método, debe ser considerado como una interferencia. Estas interferencias pueden minimizarse seleccionando las condiciones y columnas cromatográficas adecuadas.

**Figura 1**  
**Sistema de captación de aire exhalado**



- |                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| (1) tubo de aluminio calorifugado; | (5) válvula de tres vías;           |
| (2) válvula antiretroceso;         | (6) tubo adsorbente;                |
| (3) tubo de cartón desechable;     | (7) motor;                          |
| (4) jeringa;                       | (8) interruptores final de carrera. |

## 2. DEFINICIONES

### 2.1. Aire exhalado final

Es la fracción final del aire exhalado recogida siguiendo un procedimiento predeterminado. Esta fracción es la que mejor se puede identificar con la fracción alveolar (10.3). El procedimiento utilizado en este método (6.2 a 6.5) está basado en el descrito en 10.4.

## 3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El aire exhalado final (2.1) se recoge con un tubo de Haldane-Priestley modificado (véase 5.1.1 y figura 1), siguiendo el procedimiento descrito en 6. El aire exhalado final recogido procedente de cinco exhalaciones sucesivas se hace pasar vía una válvula a través de un lecho adsorbente (Chromosorb 106) con objeto de retener los vapores orgánicos que contenga.

Los vapores retenidos se desorben térmicamente y se analizan directamente en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama.

Mediante el área del pico de isoflurano, se determina la cantidad del mismo presente en la muestra y a partir de este valor se calcula la concentración en aire exhalado, en función del volumen de aire recogido en cada tubo.

## 4. REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 4.1. Gases

#### 4.1.1. Nitrógeno purificado

#### 4.1.2. Hidrógeno purificado

#### 4.1.3. Aire sintético puro

### 4.2. Reactivos

Todos los reactivos serán de calidad analítica como mínimo.

#### 4.2.1. Isoflurano (FORANE 600189 Abbott)

## 5. APARATOS Y MATERIAL

### 5.1. Aparatos y material para la toma de muestra

#### 5.1.1. Sistema de captación

El sistema consta de (figura 1):

- Un tubo de aluminio de 1 m de longitud y 26 mm de diámetro, conectado a una boquilla desechable con una válvula que se abre al entrar el aire exhalado a través del sistema y se cierra al finalizar la exhalación. El tubo está calorifugado y recubierto por una camisa aislante de 15 mm de espesor que permite mantener la temperatura a 40°C - 45°C.
- Una válvula de tres vías que está conectada a:
  - I. extremo del tubo de aluminio de Haldane-Priestley donde está insertada la boquilla (aproximadamente a 5 cm de la misma);
  - II. jeringa de gases de 50 ml instalada en un sistema de cremallera que permite el llenado y vaciado de la misma;
  - III. tubo adsorbente (5.2.1.).

Como se muestra en la figura 1, el sistema de captación está basado en la posibilidad de invertir el giro del motor que acciona la jeringa, con lo que ésta puede realizar alternativamente movimientos de aspiración de aire exhalado recogido en el tubo de aluminio e impulsión hacia el tubo adsorbente, mediante el cambio automático de la posición de la válvula de tres vías.

El mecanismo de control de la válvula, según se detalla en la figura 1 permite abrir las vías I y II durante la etapa en la que el aire exhalado recogido se hace pasar desde el tubo de Haldane-Priestley hasta la jeringa, manteniendo la vía III cerrada. En una segunda etapa se mantienen abiertas las vías II y III para hacer pasar el aire desde la jeringa al tubo adsorbente, manteniendo cerrada la vía I.

#### 5.1.2. Tubos adsorbentes

Se utilizan tubos de acero inoxidable de 89 mm de longitud y 6,4 mm de diámetro, empaquetados con 150 mg de Chromosorb 106 de 20/40 mallas. Antes de su uso, es necesario acondicionarlos en las mismas condiciones que se vayan a utilizar en la desorción (7.3.1.).

### 5.2. Aparatos y material para el análisis

**5.2.1. Sistema de desorción térmica** en dos etapas, equipado con una trampa fría rellena con 20 mg de Tenax TA capaz de alcanzar -30°C, conectado mediante una línea de transferencia calentada a un cromatógrafo de gases.

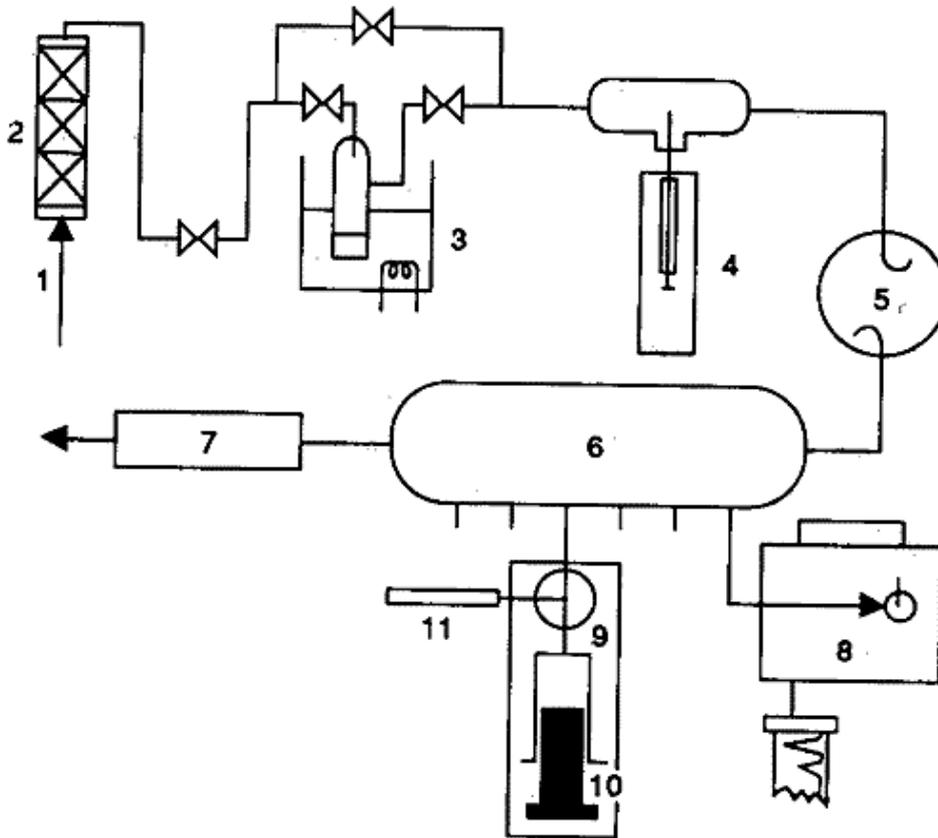
**5.2.2. Cromatógrafo de gases** equipado con detector de ionización de llama capaz de detectar una inyección de 2 ng de isoflurano con una relación señal-ruido de al menos 5 a 1 para una atenuación de 16 x 1.

**5.2.3. Columna cromatográfica** capilar de FFAP unido químicamente, de 25 m x 0,2 mm o cualquier otra capaz de separar los analitos de interés.

**5.2.4. Integrador electrónico** u otro método equivalente para la medida de las áreas de los picos.

**5.2.5. Sistema para la generación de atmósferas** de isoflurano de concentraciones conocidas para la preparación de los tubos patrón para calibración (véase figura 2 y 7.2).

**Figura 2**  
**Sistema para preparar los patrones para la calibración**



- |                          |                              |
|--------------------------|------------------------------|
| (1) entrada de aire;     | (7) sensor de humedad;       |
| (2) filtro;              | (8) cromatógrafo de gases;   |
| (3) humidificador;       | (9) válvula de tres vías;    |
| (4) inyector automático; | (10) jeringa con servomotor; |
| (5) cámara de mezcla;    | (11) tubo adsorbente.        |
| (6) cámara de muestreo;  |                              |

## 6. TOMA DE MUESTRA

### 6.1.

Insertar el tubo adsorbente (5.1.2.) en el sistema de captación (5.1.1.), asegurando su hermeticidad.

### 6.2.

Después que el individuo al que se tomará la muestra realice dos o tres respiraciones profundas y seguidas, deberá mantener el aire de la última inhalación durante 10-15 segundos antes de realizar una exhalación prolongada y total a través del tubo de aluminio del sistema de captación (5.1.1. y figura 1). El ritmo de esta exhalación debe ser lento y continuado, en cualquier caso la realización de dos o tres experiencias previas, sirve para adecuar la velocidad de esta exhalación.

### 6.3.

Una vez finalizada la exhalación se hacen pasar por el tubo adsorbente y por medio de la jeringa (véase [figura 1](#)), 4 alícuotas de 50 ml cada una.

#### 6.4.

El procedimiento descrito en [6.2](#) y [6.3](#) puede repetirse 5 veces sin cambiar el tubo adsorbente, con lo cual se muestrearán un volumen total de aire exhalado de 1 litro, que es el volumen de muestra recomendado en condiciones normales. Si se conoce que las concentraciones son muy bajas, se pueden muestrear volúmenes de aire exhalado mayores, repitiendo el procedimiento descrito las veces necesarias.

#### 6.5.

Para calcular el volumen total de aire exhalado que se ha hecho circular por cada tubo adsorbente, se tomará nota del volumen de la jeringa, del número de alícuotas tomadas en cada exhalación y en su caso, del número de veces que se repite el procedimiento completo sin cambiar el tubo adsorbente.

#### 6.6.

Una vez terminado el muestreo se tapan ambos extremos del tubo asegurando la hermeticidad del mismo.

#### 6.7.

Durante el transporte, las muestras no deben someterse a temperaturas elevadas, y debe impedirse el contacto con productos que puedan contener componentes orgánicos volátiles.

#### 6.8.

En las condiciones de validación del [anexo A](#), el almacenamiento durante dos semanas a temperatura ambiente no produce pérdidas significativas. El almacenamiento durante períodos mayores deberá comprobarse previamente y, en cualquier caso, es recomendable realizarlo en refrigerador.

## 7. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### 7.1. Preparación de muestras y blancos

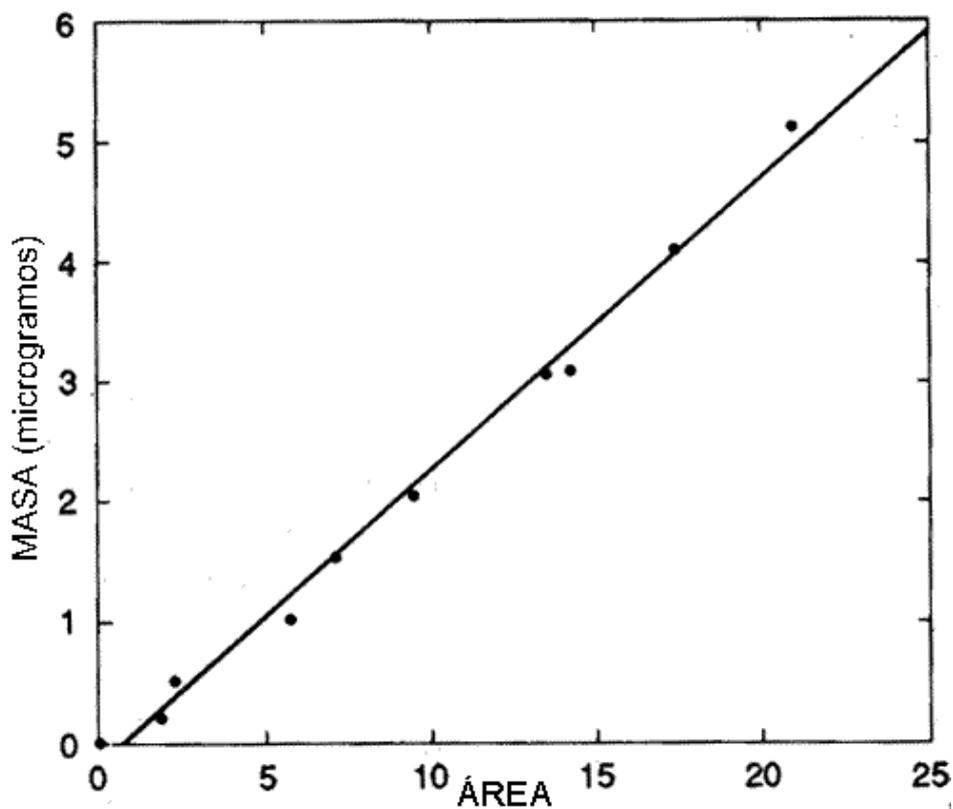
Sustituir los tapones de transporte de los tubos por los cabezales de desorción estándar, teniendo la precaución de colocarlos de tal forma que, siguiendo las instrucciones específicas del sistema de desorción, ésta se realice en sentido contrario a como se realizó la adsorción.

### 7.2. Calibración

La calibración se realiza mediante la preparación de tubos patrón por triplicado, utilizando el sistema descrito en la [figura 2](#), que permite pasar volúmenes conocidos de una atmósfera de isoflurano de concentración conocida a través del tubo adsorbente, obteniendo así tubos para la calibración en el intervalo de interés. Se construye una curva de calibración representando en una gráfica las cantidades de isoflurano adicionadas a los tubos patrón frente a los correspondientes valores medios de las áreas de los picos cromatográficos. En la [figura 3](#) se expone la curva de calibración obtenida con el procedimiento descrito

**Figura 3**  
**Recta de calibración**

**CALIBRACIÓN DE ISOFLURANO**



$$y = -0,1807 + 0,2436 x$$

$$r = 0,997$$

### 7.3. Análisis cromatográfico

#### 7.3.1. Condiciones de desorción térmica.

Se realiza una desorción en dos etapas. En la primera los vapores de isoflurano son conducidos desde el tubo situado en el horno de desorción hasta la trampa fría. En la segunda etapa se produce un calentamiento de dicha trampa para conducir los vapores directamente hasta el cromatógrafo de gases, sin división de flujo. Las condiciones de desorción son las siguientes:

1ª Etapa Gas portador, nitrógeno:	68,90 kPa (10 psi)
Temperatura del horno:	240 °C
Tiempo de desorción:	6 min
Temperatura de la trampa fría:	-30 °C
2ª Etapa Temperatura de la trampa fría:	300 °C

#### 7.3.2. Condiciones cromatográficas

Las condiciones típicas de trabajo para el cromatógrafo de gases equipado según 5.2.1. y 5.2.2. son las siguientes:

Gas portador, nitrógeno:	68,90 kPa (10 psi)
Hidrógeno:	35 ml/min
Aire sintético:	220 ml/min
Temperatura línea de transferencia:	120 °C (isoterma)
Temperatura del horno:	70 °C
Temperatura del detector:	200 °C

#### 7.3.3. Inyección

El sistema de desorción utilizado (5.2.1.) coloca automáticamente el tubo en el horno de desorción, secuenciando las distintas etapas del proceso para iniciar el análisis cromatográfico en el mismo instante de iniciar la segunda etapa de desorción. El área del pico cromatográfico correspondiente al analito se mide, tanto en las muestras como en los tubos patrón, con un integrador electrónico.

#### 7.4. Determinación de la eficacia de desorción

La eficacia de desorción de este procedimiento ha de ser prácticamente del 100%, ya que al ser tubos reutilizables han de quedar activados para una nueva toma de muestra tras cada análisis. No obstante, es necesario calcular dicha eficacia periódicamente y para cada nuevo lote de adsorbente empaquetado para lo cual se toman un mínimo de 3 muestras con el sistema descrito en la [figura 2](#) de forma similar a los tubos patrones para calibración ([7.2.](#)) y se guardan refrigeradas durante 24 horas antes de realizar su desorción y análisis tal y como se hace con las muestras. Paralelamente se debe preparar un tubo en blanco, que se manipula de la misma manera pero sin que se recoja muestra. En todos los casos se realizará una segunda desorción a cada tubo para comprobar que la primera ha sido total.

### 8. CÁLCULOS

#### 8.1. Cálculo de la eficacia de desorción

La eficacia de desorción (ED) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$ED = \frac{m_i - m_b}{m}$$

donde:

$m_i$  es la cantidad promedio (mg) de analito recuperada en cada tubo muestreado

$m$  es la cantidad (mg) teóricamente añadida en función de la concentración de la atmósfera controlada.

$m_b$  es la cantidad de analito (mg) encontrada en el blanco

La eficacia de desorción calculada para el isoflurano es de 0,99 en base a los datos de validación del [anexo A](#).

#### 8.2. Determinación de la concentración de analito presente en cada tubo adsorbente

En función del área del pico cromatográfico y utilizando la recta de calibración se cuantifica la cantidad de analito, presente en cada tubo obtenido [según 6](#), de acuerdo con la expresión:

$$m_s = \frac{m_a}{ED}$$

donde:

$m_s$  es la cantidad de analito presente en el tubo adsorbente en mg.

$m_a$  es la cantidad de analito obtenida en el análisis cromatográfico en mg.

ED es la eficacia de desorción.

#### 8.3. Determinación de la concentración de analito en aire exhalado

Se calcula la concentración de analito en el aire exhalado, en miligramos por metro cúbico por medio de la siguiente ecuación:

$$C_{ae} = \frac{m_s \times 1.000}{V}$$

donde:

$C_{ae}$  es la concentración de analito en el aire exhalado en  $\text{mg}/\text{m}^3$ .

$m_s$  es la cantidad total de analito presente en el tubo adsorbente en  $\text{mg}$  obtenido en 8.2.

$V$  es el volumen de aire muestreado en litros (6.5).

La concentración de analito en aire exhalado expresada en ppm, se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$C_{\text{ppm}} = C_{\text{ae}} \times \frac{24,0}{M} \times \frac{101,30}{P} \times \frac{t + 273,15}{293,15}$$

donde:

$P$  es la presión del aire muestreado en  $\text{kPa}$  ( $10^3 \text{ N}/\text{m}^2$ ).

$t$  es la temperatura del aire muestreado en  $^{\circ}\text{C}$ .

$M$  es el peso molecular del analito en  $\text{g}/\text{mol}$ .

## 9. PRECISIÓN

El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio de muestras captadas en atmósferas de isoflurano de concentraciones conocidas, es inferior al 5% en todo el intervalo de aplicación del método (tabla 1 del anexo A).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

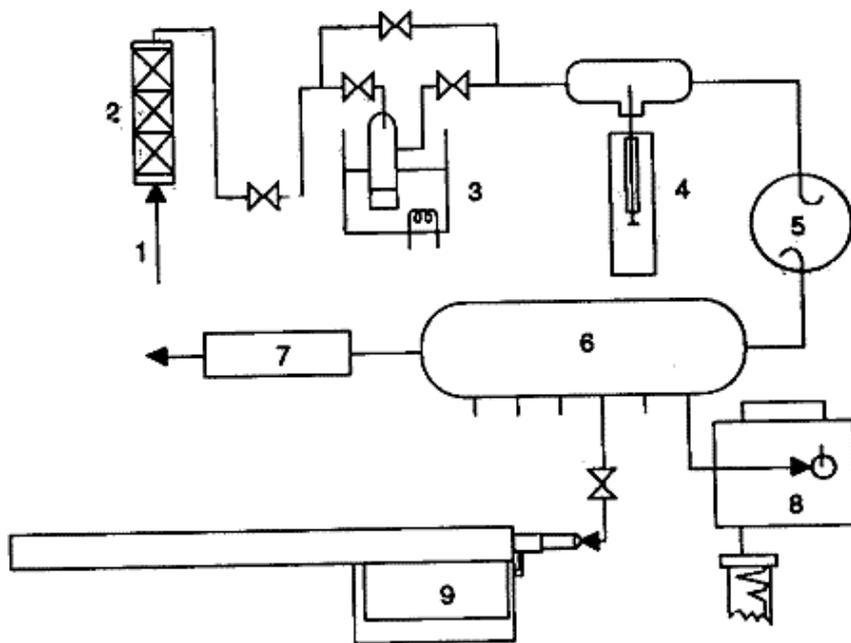
- 10.1. F. Periago, A. Luna, A. Morente, A. Zambudio. **Design and evaluation of an exhaled breath sampler for biological monitoring of organic solvents**. J. Appl. Toxicol. 12 (2),91-96,1992
- 10.2. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Protocolo de validación para la determinación de vapores orgánicos en aire exhalado**. MTA/PV-IV/92
- 10.3. Wilson H.K. **Exhaled air: Physiological basis and sampling techniques**. Scand. J. work. Environ. Health 12, 174-192, 1986
- 10.4. F. Periago. **Control Biológico de disolventes mediante aire exhalado**. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, serie Documentos Técnicos, 63:91, 1991

## ANEXO A RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MÉTODO

### A.1. ESTUDIO EN ATMÓSFERA CONTROLADA

**A.1.1. Atmósfera controlada.** Se ha utilizado el sistema descrito en la figura 4, equipado con un sistema de inyección dinámica con jeringa. Se utilizó isoflurano de calidad analítica. El sistema de captación se conectó a la salida de la cámara de captación de la instalación de atmósferas controladas.

Figura 4  
Sistema para generar la atmósfera controlada



- (1) entrada de aire; (6) cámara de muestreo;  
 (2) filtro; (7) sensor de humedad;  
 (3) humidificador; (8) cromatógrafo de gases;  
 (4) inyector automático; (9) sistema de captación de aire exhalado;  
 (5) cámara de mezcla;

### A.1.2. Condiciones estudiadas

Humedad Relativa:

40 %

100 %

Concentración de isoflurano en aire:

5,0 mg/m<sup>3</sup>

24,8 mg/m<sup>3</sup>

### A.1.3. Eficacia de desorción

Se determinó mediante el coeficiente de recuperación obtenido en 6 tubos adicionados obteniéndose el siguiente valor:

$$ED = 0,99$$

### A.1.4. Velocidad del aire en la cámara de captación:

$$0,7 - 1 \text{ m/s}$$

### A.1.5. Estudio muestreo-análisis

La influencia que puede tener en la captación la humedad, la concentración y el almacenamiento, se estudió mediante el análisis de varianza de las recuperaciones obtenidas en cada caso, calculadas según la expresión:

$$r = \frac{C_t}{C_A}$$

donde:

$C_t$  es la concentración obtenida mediante el análisis de las muestras.

$C_A$  es la concentración teórica de la atmósfera.

En la [tabla 1](#) se exponen los resultados y condiciones experimentales utilizadas en el estudio de muestreo y análisis, y en la [tabla 2](#), los resultados del análisis de varianza de dos vías, de las recuperaciones obtenidas en estas experiencias.

### A.1.6. Almacenamiento

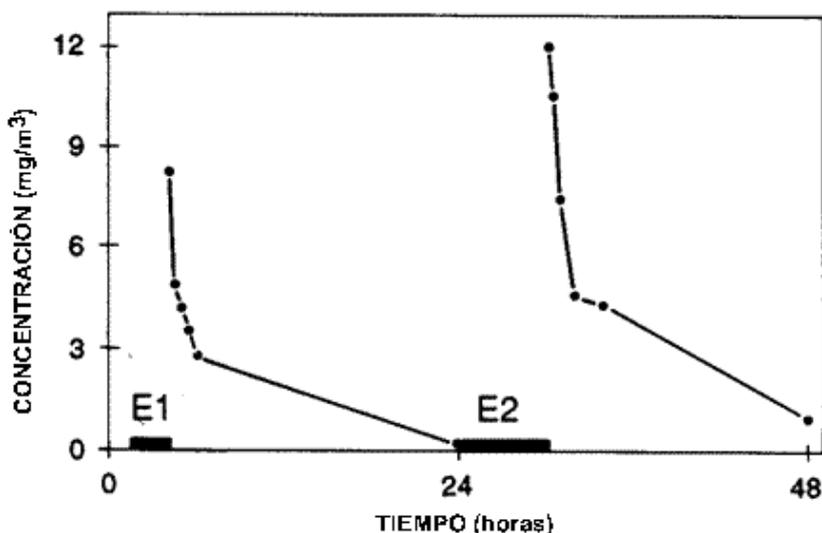
Los resultados obtenidos en los ensayos de almacenamiento durante 15 días se exponen en la [tabla 1](#), cuando se mantuvieron durante este periodo de tiempo tubos muestreados en las condiciones máximas de humedad y concentración.

## A.2. ESTUDIOS DE PERSONAS EXPUESTAS

**A.2.1.** Se realizaron determinaciones de isoflurano en aire exhalado, en dos días sucesivos, a una persona expuesta laboralmente a isoflurano en las condiciones descritas en la [figura 5](#), en la que también se exponen los resultados obtenidos.

**Figura 5**  
Perfiles de isoflurano en aire exhalado

### ISOFLURANO EN AIRE EXHALADO (EXPOSICIONES SUCESIVAS)



E<sub>1</sub>: Concentración ambiental = 58 mg/m<sup>3</sup>;  
tiempo de exposición: 2,8 horas  
E<sub>2</sub>: Concentración ambiental = 70 mg/m<sup>3</sup>;  
tiempo de exposición: 6 horas

**Tabla 1**  
Condiciones experimentales y resultados del estudio muestreo y análisis en atmósferas controladas de isoflurano.

Volumen captación (litros)	Humedad relativa %	Concentración (mg/m <sup>3</sup> )	Recuperación C <sub>t</sub> /C <sub>A</sub> <sup>(a)</sup>
1 (5 x 0,2)	40	5,0	0,986 ±0,033(6)
1 (5 x 0,2)	40	24,8	1,023 ±0,013(6)
1 (5 x 0,2)	100	5,0	1,007 ±0,022(6)
1 (5 x 0,2)	100	24,8	1,009 ±0,029(6)
1 (5 x 0,2)	50	15,2	0,998 (n=2) <sup>(b)</sup>

C<sub>t</sub>: Concentración obtenida en el tubo adsorbente.

C<sub>A</sub>: Concentración de la atmósfera controlada.

(a): Media ±desviación típica (número de muestras).

(b): Muestras analizadas 15 días después de ser tomadas.

**Tabla 2****Resultados del análisis de varianza de las recuperaciones obtenidas en las experiencias realizadas en atmósferas controladas.**

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Prueba F
Humedad relativa	1	7,7042E-05	7,7042E-05	0,107	NS
Concentración	1	2,3404E-03	2,3404E-03	3,257	NS
Interacción	1	1,9260E-03	1,9260E-03	2,680	NS
Error	20	0,014	7,1858E-04		

NS = No significativo al 5%

g.l. = Grados de libertad



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)

Advertencia

© INSHT