

Determinación de plomo en sangre - Método de cámara de grafito Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-011/R92

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

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 24-2-1986 ⁽¹⁾), en su artículo 11.1 indica que "la determinación de los niveles de plomo en sangre se realizará con una fiabilidad (a un nivel de confianza del 95 por 100), de ± 15 por 100 ó ± 6 $\mu\text{g}/100$ ml para valores inferiores a 40 $\mu\text{g}/100$ ml".

El método "*Determinación de plomo en sangre. Método de cámara de grafito/Espectrofotometría de Absorción Atómica*" es un **MÉTODO RECOMENDADO** por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Como **MÉTODO RECOMENDADO** 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 se ha estudiado siguiendo el protocolo de validación (9.11) establecido por el INSHT que incluye la realización de pruebas interlaboratorio.

Índice

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS

- 3.1. Agua destilada o desionizada
- 3.2. Octil-fenoxi-polietoxietanol (Tritón X-100)
- 3.3. Dihidrógeno fosfato (V) de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$
- 3.4. Pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC)
- 3.5. Triclorometano (Cloroformo).
- 3.6. Nitrato de plomo (II)
- 3.7. Disolución de Pirrolidinditiocarbamato de amonio de 10 g/l
- 3.8. Disolución de Tritón X-100 al 0,1% (V/V)
- 3.9. Disolución patrón de plomo de 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 3.10. Modificador de matriz

4. APARATOS Y MATERIAL

- 4.1. Tubos de polietileno
- 4.2. Cubiletes desechables de poliestireno

4.3. Tubos de grafito pirolizados

4.4. Agitador homogeneizador

4.5. Pipetas automáticas y dosificadores

4.6. Material de vidrio

4.7. Cámara de grafito

4.8. Espectrofotómetro de absorción atómica

5. TOMA DE MUESTRAS

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza de material

6.2. Preparación de la muestra

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.4 Determinación

7. CÁLCULOS

7.1. Determinación de la concentración de plomo en la curva de calibración

7.2. Determinación de la concentración de plomo presente en la muestra

8. PRECISIÓN

8.1. Coeficiente de variación

8.2. Sesgo del método

8.3. Límite de detección

9 BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A



1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de plomo (Nº CAS 7439-92-1) en sangre por espectrofotometría de absorción atómica, en un intervalo de concentración de 5 a 100 µg de Pb/100 ml de sangre (0,24 a 4,82 µmol/litro) aplicable al seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas a plomo metálico y sus compuestos iónicos.

La interferencia espectral provocada por la absorción inespecífica, que tiene lugar a la longitud de onda de trabajo, hace necesario el uso de un sistema corrector de la radiación de fondo.



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de sangre se recogen en tubos de polietileno conteniendo EDTA-K₂ (sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante.

La sangre se diluye con un tensoactivo para facilitar su hemólisis. La cuantificación del plomo presente se efectúa por espectrofotometría de absorción atómica a 283,3 nm, utilizando cámara de grafito con plataforma de L'vov y modificación de matriz (9.1), frente a una curva de patrones acuosos.

3. REACTIVOS

Durante el análisis, se utilizarán únicamente reactivos "para análisis".

3.1. Agua destilada o desionizada

El agua será de grado 2 de pureza como mínimo, de acuerdo con ISO 3696 (9.6). El contenido en plomo será menor de 0,01 µg/ml.

3.2. Octil-fenoxi-polietoxietanol (Tritón X-100)

3.3. Dihidrógeno fosfato (V) de amonio (NH₄)H₂PO₄

3.4. Pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC)

3.5. Triclorometano (Cloroformo).

PRECAUCIÓN. SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 20, Frases (S): 2-24/25. Real Decreto 2216/1985 (9.5).⁽²⁾

3.6. Nitrato de plomo (II)

PRECAUCIÓN. SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R) 20/22-23; Frases (S): 13-20/21. Real Decreto 2216/1985 (9.5).⁽²⁾

3.7. Disolución de Pirrolidinditiocarbamato de amonio de 10 g/l

Se pesa 1 g de APDC (3.4) y se disuelve en agua (3.1) completando hasta 100 ml.

3.8. Disolución de Tritón X-100 al 0,1% (V/V)

Se depositan 0,5 ml de Tritón X-100 (3.2) en un matraz aforado de 500 ml y se completa este volumen con agua (3.1)

3.9. Disolución patrón de plomo de 1 000 µg/ml.

Se seca nitrato de plomo (II) a 120°C durante 4 horas y se deja enfriar en desecador. Se pesan 1,598 g y se disuelven en ácido nítrico a 1% (V/V) hasta completar 1 litro de disolución.

3.10. Modificador de matriz

Se disuelven 5 g de dihidrógeno fosfato (V) de amonio (3.4) en la disolución de Tritón X-100 al 0,1% (V/V) (véase 3.8) hasta completar 500 ml (9.1).

Se vierte esta disolución en un embudo de decantación de 1 litro de capacidad, se añade 1 ml de la disolución de APDC de 10 g/l (3.7) y se agita vigorosamente. Se añaden 20 ml de cloroformo y se agita de nuevo para extraer las trazas metálicas que pueda aportar el dihidrógeno fosfato (V) de amonio. Se deja decantar y se elimina la fase orgánica. Esta operación ha de repetirse las veces que sean necesarias para eliminar las trazas de plomo (generalmente 2 ó 3).

La disolución así preparada se conservará en botella de vidrio o polipropileno para su posterior utilización.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Tubos de polietileno

Tubos de polietileno de 5 ml, exentos de plomo, conteniendo EDTA-K₂ (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante.

4.2. Cubiletes desechables de poliestireno

Cubiletes desechables de poliestireno, de fondo cónico, de 2 ml de capacidad.

4.3. Tubos de grafito pirolizados

Tubos de grafito pirolizados, de 28 mm de longitud y 6 mm de diámetro interno, con plataforma de L'vov (9.1 y 9.2).

4.4. Agitador homogeneizador

Agitador homogeneizador para las muestras de sangre.

4.5. Pipetas automáticas y dosificadores

Pipetas automáticas y dosificadores que cumplan los requisitos recogidos en ISO 8655 (9.7).

4.6. Material de vidrio

Material de vidrio, de borosilicato 3.3 de acuerdo con ISO 3585 (9.8).

4.7. Cámara de grafito

Cámara de grafito capaz de satisfacer el programa de análisis propuesto en 6.4.2.

4.8. Espectrofotómetro de absorción atómica

Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con lámpara de plomo y corrector de absorción inespecífica.

5. TOMA DE MUESTRAS

La muestra de sangre venosa extraída con jeringa de polietileno o poliestireno se recoge en tubos de polietileno de 5 ml conteniendo EDTA-K₂ como anticoagulante, mezclándola cuidadosamente.

Las muestras se conservarán a 4 °C hasta el momento del análisis (véase [Tabla 1 del Anexo A](#)).

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza de material

6.1.1. Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de su lavado con un detergente, debe mantenerse sumergido varios minutos en ácido nítrico al 50% (V/V) y ser después cuidadosamente enjuagado con agua (3.1).

6.1.2. Los tubos de grafito nuevos y los usados, tras un período fuera de uso, deben acondicionarse siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.1.3. Las ventanas de cuarzo de la cámara de grafito deben limpiarse periódicamente para eliminar las salpicaduras que sobre ellas se depositan.

6.1.4 Los conos de plástico para las micropipetas y los cubiletes de poliestireno deben mantenerse en sus bolsas de origen hasta el momento de su uso, para evitar cualquier contaminación.

6.2. Preparación de la muestra

6.2.1. La sangre se homogeneiza perfectamente en un agitador (4.4) una vez alcanzada la temperatura ambiente.

6.2.2. Se pipetea 600 µl del modificador de matriz preparado según 3.10, en un cubilete de fondo cónico (4.2).

6.2.3. Se añaden 50 µl de sangre con pipeta automática y con el mismo cono de plástico utilizado se remueve el contenido del cubilete hasta conseguir una completa homogeneización. La muestra así preparada está lista para su introducción directa en el horno de grafito.

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. Disoluciones de trabajo. A partir de la disolución patrón de plomo de 1.000 µg/ml (3.9) y con las diluciones pertinentes se preparan las disoluciones de trabajo de 0,2; 0,4; y 0,8 µl de Pb por ml de agua (3.1)

6.3.2. Se pipetea 600 µl de modificador de matriz (3.10) en los cubiletes de fondo cónico (4.2) en los cuales se van a preparar los patrones.

6.3.3. Se añaden 50 µl de cada una de las disoluciones de trabajo preparadas según 6.3.1 a los cubiletes que contienen modificador de matriz (6.3.2) y se agita el contenido del cubilete tal como se indicó para las muestras.

6.3.4. Blanco de reactivos. Corresponde a la adición de 50 µl de agua destilada (3.1) a 600 µl de modificador de matriz. Su lectura se restará de la obtenida para patrones y muestras antes de construir la curva de calibración.

6.3.5. Curva de calibración. De las lecturas, en área de pico, obtenidas para los patrones preparados según 6.3.2 y que corresponderán finalmente a concentraciones de 0,2; 0,4; y 0,8 µl Pb/ml de sangre, se resta la lectura, en área de pico también, obtenida para el blanco de reactivos definido según 6.3.4.

Se representan los valores corregidos de área de pico frente a sus correspondientes concentraciones, obteniéndose así la curva área de pico-concentración.

Las concentraciones propuestas para los patrones son orientativas. Los patrones deben cubrir el intervalo de concentración de las muestras a analizar y a su vez encontrarse dentro de la región lineal de la gráfica de calibración.

6.4 Determinación

NOTA - MEDIDA DE SEGURIDAD

No debe mirarse directamente al tubo de grafito durante el proceso de atomización para evitar posibles lesiones oculares debidas a radiación.

6.4.1 Se introducen 10 µl de patrones y muestras, preparados como se indicó en 6.2 y 6.3, en el horno de grafito con una pipeta automática o bien con un inductor automático si se dispone de él.

6.4.2 El análisis se efectuará con un programa de temperaturas y tiempos (9.4) lo más similar posible al siguiente

ETAPA	TEMP(°C)	RAMPA(s)	ISOTERMA(s)	ESPECIFICACIONES
1	110	10	10	secado

2	200	10	10	secado
3	800	10	10	mineralización
4	850	5	5	mineralización
5	1700	0	3	(int. flujo) atomización
6	2600	1	3	limpieza
7	20	1	4	recuperación

6.4.3. Se mide el área del pico registrado, durante la etapa de atomización, a 283,3 nm. Es imprescindible utilizar corrección de la absorción no específica. Las determinaciones de muestras y patrones deben efectuarse al menos por duplicado.

6.4.4. El elevado número de variables que intervienen en la determinación y la dificultad en controlarlas todas ellas de forma precisa y continua, hace necesaria la introducción de muestras de sangre de concentración conocida entre las muestras reales.

6.4.5. Es importante en orden a obtener unos resultados reproducibles, asegurarse del buen estado de conservación de los contactores de grafito (cilindros), limpiándolos periódicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante y cambiándolos cuando su grado de deterioro así lo aconseje.

7. CÁLCULOS

7.1. Determinación de la concentración de plomo en la curva de calibración.

La concentración de plomo en sangre de cada muestra, expresada en microgramos por mililitro, se determina directamente por interpolación de la lectura obtenida, restado el blanco [6.3.4](#), en la curva de calibración.

7.2. Determinación de la concentración de plomo presente en la muestra.

Los resultados, expresados en microgramos de plomo por cien mililitros de sangre, se obtienen mediante la siguiente expresión:

$$C = c \times 100$$

donde

C es la concentración de Pb en $\mu\text{g}/100$ ml de sangre.

c es la concentración de Pb en $\mu\text{l}/\text{ml}$ leída en la curva de calibración.

NOTA. - Si el resultado quiere expresarse en micromoles por litro de sangre $\mu\text{mol}/\text{l}$ se divide el resultado calculado en $\mu\text{g Pb}/100$ ml entre 20,72.

8. PRECISIÓN

8.1. Coeficiente de variación

El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio resultó ser inferior al 3% en el intervalo de concentraciones ensayado (véase [Tabla 2 del Anexo A](#)).

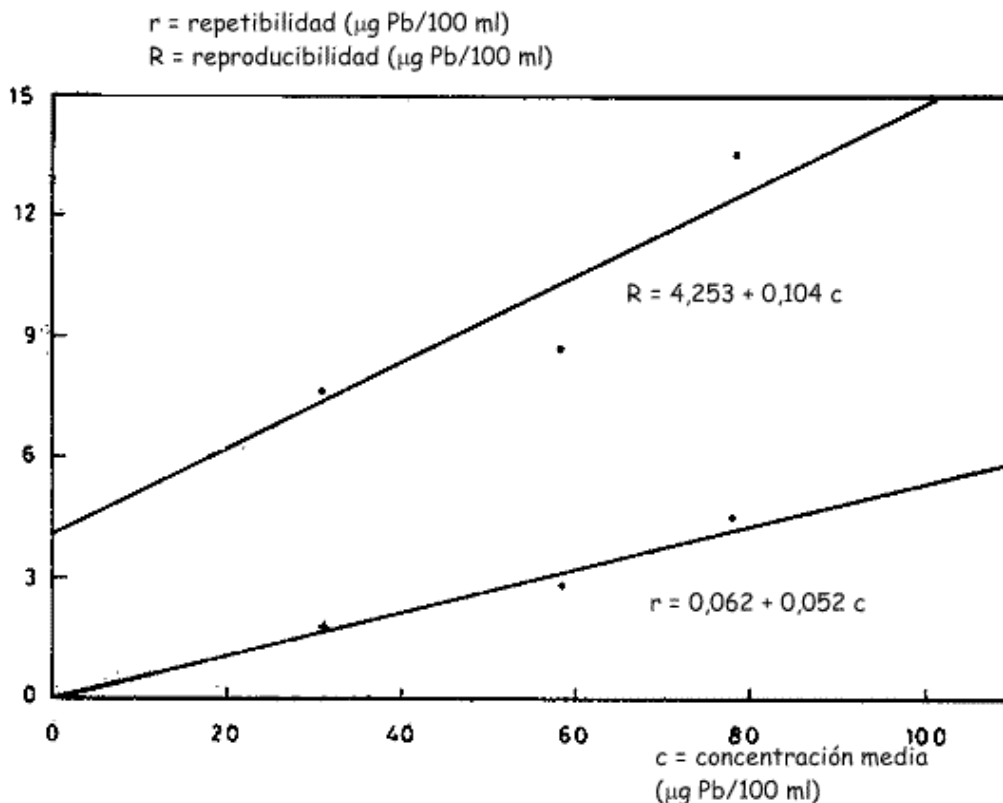
La repetibilidad (r) y la reproducibilidad (R) han sido evaluadas según la Norma ISO 5725 por medio de una prueba interlaboratorios cuyos resultados se recogen en la [Tabla 3 del Anexo A](#). Los valores de r y R obtenidos en el intervalo de concentraciones ensayado son los siguientes:

Concentración $\mu\text{g Pb}/100\text{ml}$	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	absoluta	relativa	absoluta	relativa
32,32	1,77	5,49	7,93	24,54
58,12	2,92	5,02	8,98	15,45
77,86	4,30	5,53	13,40	17,21

La relación funcional encontrada entre r y R con la concentración c se ajusta al modelo $r(R) = a + bx$. La [Figura 1](#) muestra la representación gráfica de las relaciones funcionales encontradas.

La diferencia entre dos resultados analíticos obtenidos en condiciones de repetibilidad (ó reproducibilidad) no deberá exceder, con una probabilidad del 95%, los valores de r y R obtenidos en las relaciones funcionales establecidas, para cada concentración.

FIGURA 1



8.2. Sesgo del método

El sesgo del método, evaluado mediante la utilización de Materiales de Referencia Certificados del B.C.R. (Oficina de Referencia de la Comunidad Europea) resultó ser no significativo ($p < 0,05$) en todo el intervalo de concentraciones ensayado. La [Tabla 2 del Anexo A](#) muestra los resultados de esta prueba.

8.3. Límite de detección

El límite de detección calculado para el método, utilizando una muestra real de concentración próxima al blanco, de acuerdo con la definición de la I.U.P.A.C. es de $1,5 \mu\text{g Pb}/100 \text{ ml}$ de sangre ($n=8$; $K=3$) ([9.9](#) y [9.10](#)).

El intervalo de aplicación del método está comprendido entre $5 (K=10)$ y $100 \mu\text{g Pb}/100 \text{ ml}$ de sangre.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Voelkopf, V.; Grobnski, Z; Schlemmer, G.; and Weiz, B. **Determination of trace elements in biological samples using stabilized temperature platform furnace.** Atomic Spectroscopy. Application study 683. Perkin Elmer.
2. Cooksey, M.; Bamett, W. and Grobnski, Z., **Techniques for analyzing difficult samples with the HGA graphite furnace,** Atomic Spectroscopy, Application study 660. Perkin Elmer.
3. Fernández, F.J.; **Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption with use of the graphite furnace.** Clinical Chemistry 21, 4, 588-561 (1975).

- 9.4. **Determinación de plomo en sangre, método de espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito/STPF.** Documento de trabajo AA/CB/21. Laboratorios Contox, S.A.
- 9.5. Real Decreto 2216/1985 de 23.10 (Presid., BB.OO.E. 27.11.1985, rect. 9.5.1986) "**Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas**". Modificado por Real Decreto 725/1988 (M.Relac. Cortes BB.OO.E. 9.7 rect. 4.8.1988) y Orden de 7.9.1988 (M.Relac. Cortes, B.O.E. 13.9.1988).⁽²⁾
- 9.6. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio - Especificaciones.**
- 9.7. ISO 8655. **partes 1 a 4, aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo (POVA).**
- 9.8. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes. Propiedades del vidrio borosilicatado 3.3**
- 9.9. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). **Compendium of analytical nomenclature.** Pergamon Press. 1978.
- 9.10. Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry of London. **Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit.** Analyst, 112,199-204 (1987).
- 9.11. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en Higiene Industrial. MTA/PV-III/90.**
- 9.12. International Standard Organization. "**Precision of test methods, Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests**". International standard ISO 5725 (1986).

ANEXO A

En este anexo se presentan las tablas de los resultados obtenidos en el desarrollo de las pruebas descritas en el Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en Higiene Industrial (9.11) para la validación de un método analítico.

TABLA 1
Pruebas intralaboratorio. Estudio de la estabilidad y conservación de las muestras.
Concentración 1

Fecha análisis	Temperatura	*Concentración µg Pb/100 ml	C.V. (%)	Diferenc. (%)
Inmediato	ambiente	46,6	1,4	
3 días	ambiente	46,9	3,6	+0,5
	4°C	47,3	1,4	+1,4
15 días	ambiente	51,1	2,9	+9,5
	4°C	46,6	3,1	0

*Cada resultado es el promedio de seis muestras analizadas.

Concentración 2

Fecha análisis	Temperatura	*Concentración µg Pb/100 ml	C.V. (%)	Diferenc. (%)
Inmediato	ambiente	60,0	1,4	
3 días	ambiente	61,5	5,2	+2,4
	4°C	60,9	3,9	+1,4
15 días	ambiente	65,4	2,4	+9,0

	4°C	61,3	2,4	+2,0
--	-----	------	-----	------

* Cada resultado es el promedio de seis muestras analizadas.

TABLA 2
Prueba Intralaboratorio. Cálculo del sesgo y de la presión intralaboratorio.

Material de de referencia	Concentrac. certificada ($\mu\text{g}/\text{Pb}/100\text{ ml}$)	Resultados obtenidos		
		* Concentrac. ($\mu\text{g}/\text{Pb}/100\text{ml}$)	C.V. (%)	**Sesgo.
CRM nº 194	12,6 \pm 0,4	13,1	2,5	N.S.
CRM nº 195	41,6 \pm 0,9	41,8	1,3	N.S.
CRM nº 196	77,2 \pm 1,1	77,9	0,9	N.S.

* Cada resultado es el promedio de seis muestras analizadas.

** Los valores obtenidos para el sesgo resultan ser no significativos (N. S.) ($p < 0, 05$).

TABLA 3
Prueba Interlaboratorios. Resultados obtenidos por todos los participantes en $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ de sangre.

Laboratorio	Concentración		
	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
1	30,00	57,00	73,00
	30,00	56,00	77,00
	29,00	57,00	75,00
	30,00	54,00	76,00
2	28,90	54,50	68,60
	30,20	53,90	68,40
	29,80	54,50	69,60
	28,40	52,80	66,10
3	36,40	40,40	51,30
	35,80	54,80	57,50
	35,20	48,80	38,50
	29,80	46,80	35,90
4	32,40	61,20	81,70
	31,30	58,80	80,60
	32,60	59,20	81,30
	32,70	58,30	84,10
5	37,70	59,30	79,80
	37,50	60,70	79,20
	37,40	60,60	81,90
	36,60	61,00	77,60
6	34,20	62,80	84,80
	33,90	62,70	81,00
	34,20	63,20	78,70
	33,80	63,50	81,30
7	31,80	55,80	76,50
	31,30	56,90	76,70
	30,00	58,00	76,90

	30,20	56,70	75,50
8	66,00	86,40	102,60
	57,10	82,70	101,00
	52,40	83,80	90,00
	51,90	74,40	101,00
9	34,00	59,20	80,30
	34,40	58,30	80,90
	34,80	60,30	79,40
	34,60	61,70	80,30
10	29,70	54,50	79,70
	31,40	56,30	79,50
	31,20	55,70	80,20
	30,20	55,40	80,40
11	32,00	54,50	69,00
	29,50	55,50	68,00
	22,50	49,00	63,00
	30,00	56,00	59,00

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

ADENDA

Revisión normativa

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

⁽¹⁾O.M. 9 de Abril de 1986, BOE 24-2-1986: Derogada por el [Real Decreto 374/2001](#), BOE núm. 104 de 1 de mayo de 2001.

⁽²⁾Real Decreto 2216/1985: Derogado por el [Real Decreto 363/1995](#)