

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

MTA/MB-012/A87

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 (OM de 9 Abril de 1986, BOE 24-4-1986 ⁽¹⁾), en su artículo 11º, punto 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 ciento 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 quelación-extracción/Espectrofotometría de Absorción Atómica*" 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 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 UE o basados en métodos ampliamente conocidos y utilizados por especialistas en este tipo de análisis.

El método que se presenta es un método utilizado en el INSHT, basado en el método 8003 de NIOSH para la determinación de plomo en sangre y redactado según ISO 78/2.

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. Heparina
- 3.7. Disolución triton X-100/APDC
- 3.8. Isobutilmetilcetona saturada con agua
- 3.9. Disolución patrón de plomo de 1000 mg/ml
- 3.10. 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 sangre por Espectrofotometría de Absorción Atómica, en un rango de concentración de 10-120 µg de Pb/100 ml de sangre (0,48-5,80 µmol/litro) aplicable a la realización de pruebas de impregnación saturnina en poblaciones laborales potencialmente expuestas a plomo metálico o sus compuestos iónicos.

La presencia de fosfatos y/o EDTA-K₂ (sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulantes o conservantes en la sangre puede reducir la recuperación del plomo presente. Este problema puede minimizarse mediante la adición de citrato y/o calcio en exceso respectivamente.



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La sangre recogida en tubos de polietileno (4.1) con heparina como anticoagulante se hemoliza. El plomo se compleja con pirrolidinditiocarbamato amónico (APDC) y el complejo formado, se extrae con metilisobutilcetona (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 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. Heparina (sal de sodio).

3.7. Disolución triton X-100/APDC: 20g/l de APDC, y 2,5% (V/V) de Triton X-100. Disolver 4 g de APDC en 40 ml de agua y añadir 5 ml de Triton 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.

3.8. 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.

3.9. Disolución patrón de plomo de 1000 µg/ml: Secar Nitrato de Plomo (II) 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.

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

De la disolución de 10 µg Pb/ml se toman alícuotas de 4,8; 10 y 12 ml, y se aforan a 100 ml con agua, obteniéndose las disoluciones de trabajo de 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 µg Pb/ml.



4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Tubos de polietileno de 5 ml, exentos de plomo.

4.2. Tubos de vidrio borosilicatado con tapón de rosca (13 x 100mm).

4.3. Agitador mecánico de vórtice.

4.4. Centrifuga capaz de alcanzar 3.000 r.p.m.

4.5. Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con lámpara de plomo y mechero para llama de aire-acetileno.



5. TOMA DEMUESTRAS

La muestra de sangre venosa extraída con jeringa de polietileno o poliestireno se recoge en tubos de polietileno de 5 ml, conteniendo Heparina (500 UI) como anticoagulante. El análisis requiere aproximadamente 5 ml de sangre.

Las muestras se conservarán refrigeradas hasta el momento del análisis. Si éste no se efectúa dentro de las 24 horas siguientes a la extracción de la sangre es conveniente su congelación.



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. Antes del análisis y una vez alcanzada la temperatura ambiente, la sangre se homogeneiza mecánica o manualmente.

6.2.2. Pipetear 3 ml de sangre en tubos de ensayo de tapón roscado.

6.2.3. Añadir 0,8 ml de disolución de Triton X-100/ APDC y agitar mecánicamente durante 10 segundos.

6.2.4. Añadir 2 ml de MIBK y agitar manualmente 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.

6.2.5. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Repetir la operación si la separación de las fases orgánica y acuosa no es completa.

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. Preparar las disoluciones de trabajo de 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 µg Pb/ml del modo indicado en 3.10.

6.3.2. Pipetar 3 ml de cada una de estas disoluciones en sendos tubos de ensayo con tapón roscado.

6.3.3. Seguir las operaciones indicadas para el tratamiento de las muestras a partir del punto 6.2.3.

6.3.4. Preparar un blanco de agua bidestilada, que será sometido al mismo tratamiento que las muestras y patrones. La lectura obtenida para el blanco debe ser sustraída de las obtenidas para muestras y patrones.

6.3.5. Con las lecturas obtenidas para los patrones según 6.4, corregidas con el valor del blanco, se construye el gráfico señal-concentración.

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 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 con agua.

7. CÁLCULOS

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

7.2. Los resultados, expresados en µg de Plomo por 100 ml de sangre, se obtienen mediante la siguiente expresión:

$$C = c \times 100$$

C = concentración de Pb en µg/100 ml de sangre.

c = concentración de Pb en µg/ml, leída en la curva de calibración.

8. PRECISIÓN

No se dispone de datos para los cálculos de la repetibilidad r y de la reproducibilidad R. El coeficiente de variación obtenido por NIOSH para el procedimiento analítico en el rango de 5-150 µg Pb/100 g de sangre es del 5% (9.1).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. National Institute for Occupational Safety and Health. **Method 8003. Manual of Analytical Methods**, Third Edition. Vol. 1. DHHS (NIOSH) Publications 84-100 (1984).
2. **Reglamento sobre Declaración de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas**. Real Decreto 2216/1985 ⁽²⁾, de 23 de Octubre (B.O.E. 27/9/85 y 9/5/86).

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](#)