

Determinación de plomo en sangre - Método Delves / Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-010/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 Delves/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 una reestructuración, atendiendo a ISO 78/2, de la NORMA-HA 2113 (Determinación de plomo en sangre por espectrofotometría de Absorción Atómica, Método Delves) del INSHT, revisada en 1984.

Índice

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS

3.1. Peróxido de Hidrógeno

3.2. Ácido nítrico

3.3. Nitrato de Plomo (II)

3.4. Heparina

3.5. Sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA-K₂)

3.6. Disolución patrón de plomo de 1000 mg/ml

3.7. Disoluciones de trabajo

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Tubos de polietileno

4.2. Homogeneizador

4.3. Micropipetas automáticas

4.4. Estufa

4.5. Sistema de micromuestra "Delves Cup"

4.6. 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 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 absorción inespecífica causa, a la longitud de onda de trabajo, la aparición de una pequeña señal que puede ser eliminada utilizando un sistema corrector de la radiación de fondo.



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La sangre, recogida en tubos de polietileno con heparina o EDTA-K₂ (sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante, se hemoliza y posteriormente se seca y trata con peróxido de hidrógeno a 140 ±5 °C.

El plomo contenido en las muestras se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama mediante el Sistema de Micromuestra "Delves Cup", a una longitud de onda de 283,3 nm, siendo recomendable la utilización de corrector de la radiación inespecífica y utilizando para la calibración un método de adición.



3. REACTIVOS

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

3.1. Peróxido de Hidrógeno 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34, Frases (S): 28-29. Real Decreto 2216/ 1985 (9.4).

3.2. Ácido nítrico concentrado, min. 65%

NOTA: SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA. Frases (R): 35. Frases (S): 2-23-26-27. Real Decreto 2216/1985 (9.4).

3.3. Nitrato de Plomo (II)

NOTA: SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 20/22-33. Frases (S): 13-20/21. Real Decreto 2216/1985 (9.4).

3.4. Heparina (sal de sodio)

3.5. Sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA-K₂)

3.6. Disolución patrón de plomo de 1000 µg/ml: Secar Nitrato de Plomo (II) a 120°C durante 4 horas y dejar enfriar en un desecador. Pesar 1,598 g y disolver en ácido nítrico al 1 % (V/V) hasta completar 1 litro de disolución.

3.7. Disoluciones de trabajo: Preparar una disolución intermedia de 10 µg Pb/ml, tomando 1 ml de la disolución patrón 3.6 y diluyendo a 100 ml con ácido nítrico al 0,5% (V/V).

De la disolución de 10 µg/ml se toman alícuotas de 4 y 8 ml, y se aforan a 100 ml con ácido nítrico al 0,5% (V/V), obteniéndose las disoluciones de trabajo de 0,4 y 0,8 µg de Pb/ml.

4. APARATOS Y MATERIAL

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

4.2. Homogeneizador para las muestras de sangre.

4.3. Micropipetas automáticas capaces de dosificar volúmenes de 10 µl y 25 µl .

4.4. Estufa capaz de proporcionar la temperatura de 140 ±5°C.

4.5. Sistema de micromuestra "Delves Cup" que incluye: sistema de introducción de muestra, microcrisoles, bandejas con capacidad para 20 microcrisoles y placas soporte (ver figura 1).

4.6. Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con:

- Lámpara de plomo.
- Mechero de tres ranuras y tubo de cuarzo o alúmina.
- Corrector de fondo (opcional).
- Sistema de registro de la señal con un tiempo de respuesta que permita la adecuada resolución de los picos.

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 500 UI de heparina ó 2,4 mg de EDTA-K₂ por ml de sangre, como anticoagulante.

Las muestras se conservan 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.

TABLA I

Microcrisol 1	Microcrisol 2	Microcrisol 3
N µgPb/100 ml	(N + 40) µgPb/100 ml	(N + 80) µgPb/100 ml
10 µl (sangre normal)	10 µl (sange normal)	10 µl (sangre normal)
10 µl (HNO ₃ 0,5%)	10 µl (0,4 µg Pb/ml)	10 µl (0,8 µg Pb/ml)

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

NOTA: MEDIDA DE SEGURIDAD

La protección ofrecida frente a la radiación de la llama por el Sistema de Micromuestra es insuficiente. El operario deberá proveerse de gafas adecuadas.

6.1. Limpieza y acondicionamiento 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.

Los microcrisoles deben limpiarse introduciéndolos en la llama del espectrofotómetro y esperando hasta que la lectura de absorbancia

baje a cero. Posteriormente se conservarán bajo una cámara de vidrio o similar hasta el momento de realizar el análisis.

Los conos de plástico que se utilizan con las micropipetas 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. Antes del análisis y una vez alcanzada la temperatura ambiente, la sangre se homogeneiza mecánica o manualmente.

6.2.2. Pipetear 10 µl de sangre en un microcrisol de níquel (4.5) y añadir 10 µl de ácido nítrico al 0,5% (V/V). Llevar a sequedad manteniendo 1 minuto en estufa a una temperatura de $140 \pm 5^\circ\text{C}$.

6.2.3. Sacar los microcrisoles de la estufa y añadir 25 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, llevando de nuevo a sequedad, a la misma temperatura durante 5 minutos.

El tratamiento de muestras y patrones debe realizarse simultáneamente. Al contener cada bandeja 20 microcrisoles y ser recomendable la preparación tanto de muestras como de patrones por cuadruplicado, cada bandeja permitirá la preparación de dos muestras diferentes.

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. Pipetear 10 µl de sangre "normal" (debajo contenido en plomo) N, en tres microcrisoles.

6.3.2. Añadir 10 µl de la disolución de HNO_3 al 0,5% (V/V) al microcrisol 1; 10 µl de la disolución de trabajo de 0,4 µg Pb/ml al microcrisol 2 y 10 µl de la disolución de 0,8 µg Pb/ml al microcrisol 3 (ver [Tabla I](#)).

A los patrones así preparados en los microcrisoles les corresponden las siguientes concentraciones: N, N + 40 y N + 80 µg de Pb/100 ml de sangre.

6.3.3. Los patrones así preparados se llevan a sequedad, se tratan con 25 µl de hidrógeno peróxido y se secan de nuevo, tal como se indica para las muestras en [6.2.2](#) y [6.2.3](#).

6.3.4. Analizar los patrones junto con las muestras en las mismas condiciones.

6.3.5. Representar las medias de las alturas de los picos obtenidos para cada patrón frente a sus correspondientes concentraciones, para obtener la curva de calibración de adiciones (ver [anexo A](#)).

6.4. Determinación espectrofotométrica

Los microcrisoles con las muestras y patrones tratados se introducen en la llama aire-acetileno del espectrofotómetro de Absorción Atómica, utilizando el Sistema de Micromuestra y registrándose la señal obtenida a 283,3 nm.

La llama debe encenderse unos 10 ó 15 minutos antes de empezar a medir. Durante el calentamiento y el tiempo de medida debe aspirarse agua bidestilada por el capilar.

Al introducir los microcrisoles en la llama se obtienen dos señales. La primera está generada por los productos de combustión de la muestra parcialmente oxidada, y la segunda corresponde al plomo. Utilizando una velocidad de registro de 60 mm/min se resuelven perfectamente las señales. El corrector de fondo elimina casi totalmente el primer pico y una pequeña señal inespecífica que se suma al pico del plomo.

Los microcrisoles introducidos en la llama deben estar centrados directamente debajo del orificio existente en el tubo de cuarzo. La distancia vertical microcrisol-tubo de cuarzo es crítica para conseguir una buena resolución de las dos señales antes citadas, y una adecuada sensibilidad.

El envejecimiento de los microcrisoles provoca una pérdida progresiva de precisión y sensibilidad, por lo que, deben sustituirse por otros nuevos después de un cierto número de determinaciones (sobre 40 ó 50). Es importante efectuar la sustitución simultánea de los microcrisoles, de tal forma, que todos sufran el mismo número de medidas.

El tubo de cuarzo y el arco soporte de los microcrisoles deben también sustituirse al deteriorarse su estado.

7. CÁLCULOS

La concentración de plomo en sangre de cada muestra se determina por interpolación de la lectura obtenida en la curva de calibración. Los resultados se expresan en μg de plomo por 100 ml de sangre.

8. PRECISIÓN

No se dispone de suficientes datos para los cálculos de la repetibilidad r y de la reproducibilidad R .

Los valores de coeficientes de variación obtenidos por Delves (9.1) para determinaciones repetidas sobre muestras de sangre adicionadas con plomo se encuentran entre 4 y 6% para concentraciones de plomo en sangre superiores a 30 $\mu\text{g}/100$ ml. De forma similar, Fernández (9.3) obtuvo coeficientes de variación del orden del 5-6% para un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g}/100$ ml de sangre, siempre que se tenga gran cuidado en mantener inalterado el montaje del sistema Delves.

Respecto de la reproducibilidad del método, el coeficiente de variación esperable es inferior a 15% entre laboratorios con experiencia, pudiendo llegar a 8% entre grupos de laboratorios seleccionados (9.5).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Delves, H.T. **A micro-sampling method for the rapid determination of lead in blood by Atomic Absorption Spectrophotometry**. Analyst, 95, 431-435 (1970).
2. Fernández, F.J., H.L., Kahn. **The determination of lead in whole blood by Atomic Absorption Spectrometry with the "Delves Sampling Cup technique"**. Atomic Adsorption Newsletter, 10,1,1-5 (1971).
3. Fernández, F.J. **Some observations on the determination of lead in blood with the Delves-Cup method**. Atomic Absorption Newsletter, 12, 3, 72-75 (1973).
4. **Reglamento sobre Declaración de Sustancias Nueva y Clasificación, Envasado, Etiquetado de Sustancias Peligrosas**. Real Decreto 2216/1985 ⁽²⁾, de 23 de Octubre de 1985 (B.O.E. 27/9/85 y 9/5/86).
5. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Programa Interlaboratorios de Control de Calidad-Plomo en sangre (PICC-Pbs). Informe (años 1985-86)**. INSHT, 1987.

ANEXO A: MÉTODO DE ADICIÓN

El método de adición se utiliza cuando la matriz que contiene el metal a analizar es compleja o difícil de reproducir para preparar unos patrones adecuados. En este caso se añaden, sobre la muestra a analizar, cantidades conocidas del metal de interés.

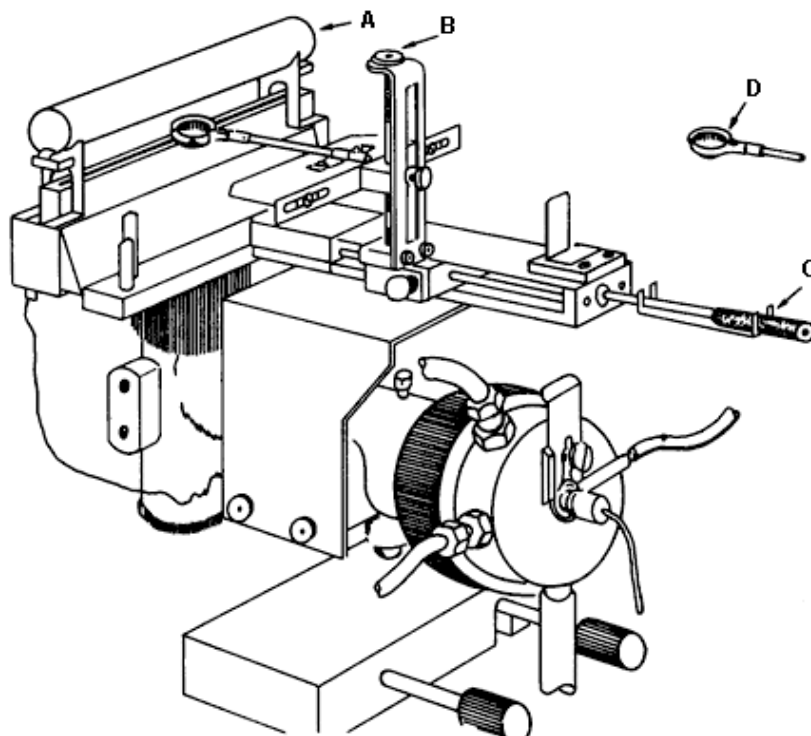
Para la determinación de plomo en sangre, es conveniente utilizar para efectuar las adiciones, una muestra de sangre "normal" (de bajo contenido en plomo).

La gráfica de calibración se construye representando las concentraciones de metal añadidas (en $\mu\text{g Pb}/100$ ml de sangre) frente a las alturas de pico obtenidas en los respectivos análisis. La altura de pico correspondiente a la sangre "normal" se representa sobre el eje de ordenadas y corresponderá a la ordenada en el origen OP_0 (figura 2).

AO en la figura 2, representa la concentración de metal en la muestra (sangre "normal") sobre la que se han efectuado las adiciones.

La concentración de plomo en una muestra cualquiera M, cuya altura de pico sea MP_M vendrá dada por el valor correspondiente al segmento AM sobre el eje de concentraciones.

FIGURA 1 SISTEMA DE MICROMUESTRA-DELVES



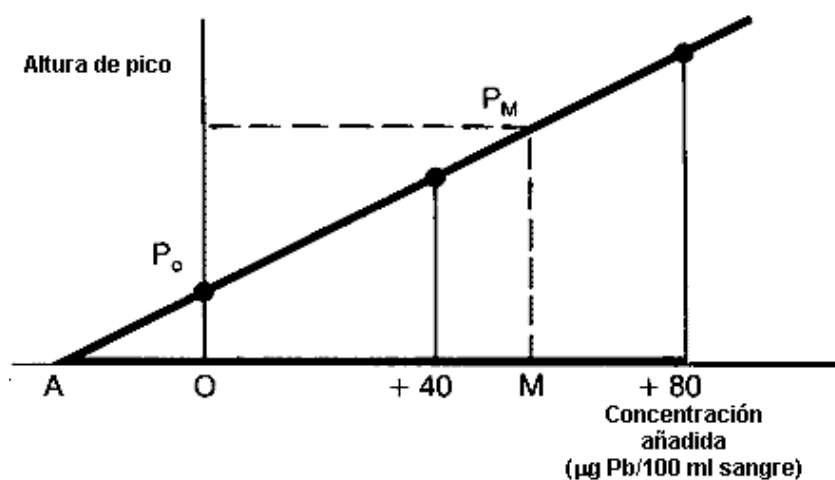
A. TUBO DE ABSORCIÓN DE CUARZO

C. MANDO DE AJUSTE HORIZONTAL

B. TORNILLO DE AJUSTE VERTICAL

D. MICROCRISOL Y ARO SOPORTE

FIGURA 2



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.

