

# Determinación de cromo en orina - Método de cámara de grafito / Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-018/A94

**Palabras clave:** *Cromo, orina, espectrofotometría de absorción atómica.*

## PRESENTACIÓN

El cromo y sus compuestos son ampliamente utilizados en diversos sectores industriales: metalurgia, curtidos, baños electrolíticos, etc.

Los variados efectos toxicológicos que puede producir van desde la aparición de dermatitis alérgicas de contacto y ulceración del tabique nasal hasta su reconocido potencial cancerígeno, dependiendo siempre del estado de oxidación y de la solubilidad del compuesto en cuestión.

La capacidad del cromo para penetrar en el organismo por vía dérmica pone de manifiesto la importancia del control biológico de la exposición para evaluar la cantidad total de cromo que penetra en el organismo y entender la importancia de los efectos biológicos que puedan aparecer tras la exposición.

El método "*Determinación de cromo en orina - Método de cámara de grafito/ 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 evaluado por el INSHT, según determinados criterios de validación y que ha sido suficientemente probado mediante ensayos de colaboración entre distintos laboratorios del INSHT.

## Índice

### 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

### 2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

### 3. REACTIVOS

### 4. APARATOS Y MATERIAL

### 5. TOMA DE MUESTRA

### 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 cromo en la curva de calibración

#### 7.2. Determinación de la concentración de cromo en la muestra

### 8. PRECISIÓN

### 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 cromo (Nº CAS 7440-47-3) en orina por espectroscopía de absorción atómica en el intervalo de concentraciones de 1 a 20 g/l de orina (19,2 a 384 nmol/l), aplicable al seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas a cromo y compuestos de cromo.

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 de corrección de dicha absorción.

## 2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de orina se acidifican y se diluyen con agua destilada. La cuantificación del cromo presente se efectúa por espectrofotometría de absorción atómica a 357,9 nm, utilizando cámara de grafito y corrección de la radiación inespecífica, frente a una curva de adiciones conocidas.

## 3. REACTIVOS

Durante el análisis, se utilizarán reactivos de calidad "para análisis" o superior.

### 3.1. Agua destilada o desionizada

El agua será de grado 2 de pureza como mínimo de acuerdo con ISO 3696 (9.8.).

### 3.2. Ácido nítrico HNO<sub>3</sub>, concentrado.

**PRECAUCIÓN:** SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA: Frases (R): 35 Frases (S): 2-23-26-27. Real Decreto 2216/1985 (9.7.).

### 3.3. Heptaoxo dicromato (VI) de potasio K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Dicromato de potasio).

**PRECAUCIÓN:** SUSTANCIA IRRITANTE. Frases (R) 36/37/38-43. Frases (S): 22-28. Real Decreto 2216/1985 (9.7.).

### 3.4. Disolución patrón de cromo de 1000 µg/ml

Puede utilizarse una disolución patrón comercial de una concentración de 1000 µg/ml. Si se utiliza dicha disolución habrá que tener en cuenta la fecha de caducidad indicada por el fabricante. Si no la tuviese, se desechará después de un año de su adquisición.

Alternativamente puede prepararse la disolución patrón del metal a partir de una sal apropiada del mismo, como se indica a continuación: se seca dicromato de potasio (3.3.) a 120°C durante 4 horas y se deja enfriar en desecador. Se pesan 3,735 g y se disuelven en agua (3.1.) hasta completar un litro de disolución.

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

## 4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Frascos de polietileno de 25 ml de capacidad, exentos de cromo.

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

4.3. Tubos de grafito pirolizados, de 28 mm de longitud y 6 mm de diámetro interno.

4.4. Pipetas automáticas y dosificadores que cumplan los requisitos recogidos en ISO 8655 (9.9.).

4.5. Material de vidrio de borosilicato 3.3 de acuerdo con ISO 3585 (9.10.).

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

4.7. Espectrofotómetro de Absorción Atómica equipado con lámpara de cromo y corrector de absorción inespecífica.

## 5. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de orina se toman en frascos de polietileno exentos de cromo. Después de homogeneizar la muestra agitando, se toma una alícuota de 25 ml. Hasta el momento de efectuar el análisis, las muestras deben conservarse refrigeradas.

## 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 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.** Se depositan 10 µl de ácido nítrico concentrado en un cubilete de fondo cónico (4.2.).

**6.2.2.** Se añaden 400 µl de agua destilada (3.1.).

**6.2.3.** Se pipetea 200 µl de orina con pipeta automática, procurando no arrastrar el posible sedimento depositado en el fondo. 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 de cromo de 1000 µg/ml (3.4.) y con las diluciones pertinentes con agua destilada (3.1.), se preparan las disoluciones de trabajo de 0,005; 0,01 y 0,02 µg de cromo por ml de agua.

#### 6.3.2. Patrones de adición.

Se preparan añadiendo a sendos cubiletes, que contienen cada uno 10 µl de ácido nítrico concentrado, 200 µl de agua destilada (3.1.), 200 µl de orina de bajo contenido en cromo y 200 µl de las disoluciones de trabajo preparados en 6.3.1. Las concentraciones de los patrones de adición así obtenidos son de 0,005; 0,01 y 0,02 µg de Cr por ml de orina.

#### 6.3.3. Blanco de orina.

Se obtiene añadiendo sucesivamente a un cubilete de fondo cónico, 10 µl de ácido nítrico concentrado, 400 µl de agua destilada (3.1.) y 200 µl de la orina utilizada para preparar los patrones de adición.

#### 6.3.4. Blanco de reactivos.

Se prepara depositando en un cubilete, 10 µl de ácido nítrico concentrado y 600 µl de agua (3.1.). Es necesario para detectar la presencia de cromo en los reactivos y material empleados, y efectuar las oportunas correcciones.

#### 6.3.5. Curva de calibración.

De las lecturas, en absorbancia o altura de pico, obtenidas para los patrones preparados según 6.3.2. y analizados según 6.4., que corresponden a concentraciones de 0,005; 0,01 y 0,02 µg Cr/ml orina, se resta la lectura obtenida para el blanco de orina definido según 6.3.3.

Se representan a continuación los valores corregidos en altura de pico o absorbancia frente a sus correspondientes concentraciones, obteniéndose así la curva de calibración.

Las concentraciones propuestas para los patrones son orientativas. Los patrones deben cubrir, al menos, el intervalo de concentraciones de las muestras a analizar y a su vez encontrarse dentro de la región lineal de la curva 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 la radiación.

**6.4.1.** Se introducen 20 µl de blancos, patrones y muestras, preparados como se indicó en 6.2. y 6.3., en el tubo de grafito con una pipeta automática o bien con un inductor automático de muestras si se dispone de él.

**6.4.2.** El análisis se efectuará con un programa de temperaturas y tiempos (9.1., 9.2., 9.3.) lo más similar posible a los datos del cuadro .

ETAPA	TEMP (°C)	RAMPA (s)	ISOTERMA (s)	ESPECIFICACIONES
1	110	15	10	secado
2	200	10	10	secado
3	1400	15	15	mineralizado
4	2400	0	3 (Int.flujo) (*)	atomización
5	2650	1	4	limpieza
6	20	1	5	recuperación

(\*) Interrupción del flujo de gas interno durante la etapa de atomización

**6.4.3.** Se mide la altura del pico registrado, durante la etapa de atomización, a 357,9 nm. Es necesaria la utilización de un sistema adecuado para la corrección de la absorción no específica.

**6.4.4.** Las determinaciones de muestras y patrones deben efectuarse al menos por duplicado. El elevado número de variables que intervienen en la determinación y la dificultad en controlarlas todas de forma precisa y continua, hace aconsejable la introducción de muestras de orina de concentración conocida entre las muestras reales.

**6.4.5.** Es importante en orden a establecer 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 cromo en la curva de calibración.

La concentración de cromo en µg de Cr/ml de orina se obtiene por interpolación del valor obtenido para la muestra, previa sustracción del valor del blanco de reactivos (6.3.4.), en la curva de calibración.

### 7.2. Determinación de la concentración de cromo en la muestra.

Los resultados, expresados en microgramos de cromo por litro de orina (µg Cr/l) se obtienen mediante la siguiente expresión.

$$C = c \times 1000$$

donde:

C es la concentración de cromo en la muestra en µg Cr/l de orina.

c es la concentración de cromo en µg Cr/ml de orina, leída en la curva de calibración.

**NOTA** - Si el resultado quiere expresarse en nanomoles de cromo por litro de orina se multiplica el resultado calculado en  $\mu\text{g Cr/l}$  orina por 19,232.

7.3. Los resultados pueden referirse a la cantidad de creatinina presente en la muestra (9.5) mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g Cr/g creatinina} = \frac{\mu\text{g Cr/l orina}}{\text{g creatinina/l orina}}$$

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

## 8. PRECISIÓN

8.1. El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio según 9.13 resultó ser inferior al 4% en el intervalo de concentraciones ensayado. (Véase [Tabla 1](#)).

**TABLA 1**  
**Prueba Intralaboratorio. Cálculo del sesgo y de la precisión**

Material de de referencia	Concentrac. certificada ( $\mu\text{g Cr/l}$ )	Resultados obtenidos		
		Concentrac. ( $\mu\text{g Cr/l}$ ) (**)	C.V. (%)	Sesgo (%)
SRM nº	13 (*)	12,0	2,8	7,8
BIORAD I	6,0 $\pm$ 1,2	6,2	2,3	3,3
BIORAD II	20,7 $\pm$ 4,1	24,6	3,6	18,8

(\*) Valor informativo no certificado

(\*\*) Cada resultado es la media de seis muestras analizadas.

**NOTA** - Para el cálculo del sesgo de un método analítico deben ser utilizados Materiales de Referencia Certificados (MRC) (9.15). Cuando no se disponga de ellos y se utilicen otros Materiales de Referencia (MR) como los patrones comerciales de concentración garantizada, el valor del sesgo calculado a partir de ellos se considerará únicamente como indicativo.

8.2. El sesgo del método ha sido evaluado mediante la utilización de Materiales de Referencia (9.13). La [Tabla 1](#) muestra los resultados de esta prueba.

8.3. 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. (9.11 y 9.12) es de 0,5  $\mu\text{g Cr/l}$  de orina (n=8; K=3). El intervalo de aplicación del método está comprendido entre 1 y 20  $\mu\text{g Cr/l}$  de orina.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Marks, J.N.; White, M.A. **Direct determination of chromium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry**. Atomic Spectroscopy 9 (3), 73-75 (1.988)
2. Cooksey, M.; Barnett, W. and Grobnski, Z. **Techniques for analyzing difficult samples with the HGA graphite furnace**. Atomic Spectroscopy. Application study 660. Perkin Elmer.
3. Voelkopf, V. Grobnski, Z.; Schlemmer, G.; and Welz, B. **Determination of trace elements in biological samples using stabilized temperature platform furnace**. Atomic Spectroscopy. Application study 683. Perkin Elmer.
4. Veillon, C.; Patterson, K.Y; N.A.; Kayne, F.J. Vanderlinde, R.E.; Routh, M.W;McKenzie, IN.; Femandez, F.J. and Kock, T.R. **Chromium in urine as mesured by atomic absorption spectrometry**. Clin. Chem. 28, 2309-2311, (1982).
5. Harvey, B.; Elkins. **Concentration adjustments in urinalysis**. Am. Ind. Assoc. J. 35, 559-565, (1974).
6. Morris, B.W.; Griffiths, H.; Hardisty, C.A. and Kemp, G.J. **Increased concentrations of chromium in plasma, urine, and red blood celis in a group of stainless steel welders**. Atomic Spectroscopy, 10, (1), 1-3, (1989).

- 9.7. 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"** <sup>(1)</sup>. Actualizado por Orden de 9-12-92 (M. Relac. Cortes B.O.E. 17-12-92)
- 9.8. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio**. Especificaciones.
- 9.9. ISO 8655, Partes 1 a 4. **"Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo"**.
- 9.10. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes**. Propiedades del vidrio borosilicatado.
- 9.11. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). **Compendium of analytical nomenclature**. Pergamon Press. 1978.
- 9.12. 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).
- 9.13. 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.
- 9.14. 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).
- 9.15. Guide ISO 30. **Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence**. 1981

## 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. (9.7.).

##### 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 (9.7.).

##### A.2.3. Ácido clorhídrico min. 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA: Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (9.7.).

##### 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.** Se diluye la orina con agua 1→100.

**A.4.2.** Añadir 0,5 ml de la orina diluida a 1,0 ml mide 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).

La concentración de creatinina en gramos por litro de orina se obtiene según la siguiente expresión:

$$C \text{ (g creatinina/l)} = \frac{c \text{ (mg creatinina/100 ml)}}{100}$$

---

## ADENDA

### Revisión normativa

<sup>(1)</sup>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](mailto:cnvminsht@mtas.es)

---

[Advertencia](#)

© INSHT