

Determinación de mercurio en orina - Método del vapor frío con borohidruro de sodio / Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-024/A96

Palabras clave: mercurio, orina, borohidruro de sodio, espectrofotometría de absorción atómica.

PRESENTACIÓN

El mercurio se encuentra en estado elemental y formando parte de una gran variedad de compuestos, todos ellos con propiedades fisicoquímicas intrínsecas y efectos toxicológicos diferenciados. La mayoría de las aplicaciones industriales están relacionadas con el propio metal y con sus compuestos inorgánicos y, en ambos casos, la eliminación urinaria del mercurio absorbido es un indicador aceptable de exposición.

Este método analítico ha sido desarrollado para poder evaluar el grado de exposición a través del control biológico y para entender la importancia de los efectos biológicos que puedan presentarse tras la exposición.

El método "*Determinación de mercurio en orina - Método del vapor frío con borohidruro de sodio / 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 evaluados por especialistas en este tipo de análisis.

Índice

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS

3.1. Agua destilada o desionizada

3.2. Ácido nítrico HNO_3

3.3. Ácido sulfúrico H_2SO_4

3.4. Borohidruro de sodio NaBH_4

3.5. Hidróxido de sodio NaOH

3.6. Permanganato de potasio KMnO_4

3.7. Disolución conteniendo 1,5% (V/V) de ácido sulfúrico y 1,5% (V/V) de ácido nítrico

3.8. Disolución de borohidruro de sodio de 30 g/l y de hidróxido de sodio de 15 g/l

3.9. Disolución de permanganato de potasio de 50 g/l

3.10. Disolución patrón de mercurio de 1000 $\mu\text{g/ml}$

3.11. Disoluciones patrón de mercurio para la calibración

3.12. 1- Octanol

3.13. Argón N50

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Material de vidrio

4.2. Botellas de polipropileno

4.3. Pipetas automáticas y dosificadores

4.4. Espectrofotómetro de absorción atómica

4.5. Accesorio para generación de vapor de mercurio que permita el uso de borohidruro de sodio como reductor

4.6. Balanza analítica

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 mercurio en la curva de calibración

7.2. Determinación de la concentración de mercurio en la muestra

7.3.

8. PRECISIÓN

9. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A

ANEXO B

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de mercurio (N° CAS 7439-97-6) en orina por espectrofotometría de absorción atómica en un intervalo de concentración de 5 µg a 200 µg de Hg/l de orina (25 nmol a 1.000 nmol de Hg/l de orina). La técnica de análisis seguida es la llamada del "vapor frío" utilizando borohidruro de sodio como reductor y un sistema de generación de vapor, estático o discreto.

El método es aplicable al seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas a mercurio y sus compuestos.



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de orina se oxidan con permanganato de potasio y posteriormente se tratan con una mezcla de ácidos minerales en frío. El mercurio iónico presente en la muestra se reduce a mercurio elemental por la acción del hidrógeno nascente que proviene de la reacción del borohidruro de sodio en un medio ácido.

Las medidas de absorción producidas por la presencia de mercurio en la célula de medida se llevan a cabo a 253,7 nm y la cuantificación se efectúa por interpolación en una curva de calibración construida con patrones de adición conocida.

3. REACTIVOS

Durante el análisis se utilizarán reactivos de grado analítico como mínimo, siendo muy adecuado el uso de reactivos exentos o de bajo contenido en mercurio.

3.1. Agua destilada o desionizada de grado 2 de pureza como mínimo, según ISO 3696 (9.3.).

3.2. Ácido nítrico HNO₃ (trioxonitrato (V) de hidrógeno) concentrado, mínimo 65% (m/m) y densidad aproximada 1,40 g/ml.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA: Frases (R): 35. Frases (S): 2-23-26-27. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.3. Ácido sulfúrico H₂SO₄ (tetraoxosulfonato (VI) de hidrógeno) concentrado, mínimo 95% (m/m) y densidad aproximada 1,84 g/ml.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA: Frase (R): 35. Frases (S): 2-26-30. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.4. Borohidruro de sodio NaBH₄ (tetrahidruroborato (III) de sodio).

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA, INFLAMABLE Y CORROSIVA: Frases (R): 14-15-25-34. Frases (S): 7/826-43-44. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.5. Hidróxido de sodio NaOH

PRECAUCIÓN. SUSTANCIA CORROSIVA: Frases (R): 35. Frases (S): 2-26-27-37/39. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.6. Permanganato de potasio KMnO₄ (Tetraoxomanganato (VII) de potasio).

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA COMBURENTE Y OXIDANTE.- Frases (R): 8-22. Frases (S): 2. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.7. Disolución conteniendo 1,5% (V/V) de ácido sulfúrico y 1,5% (V/V) de ácido nítrico

Se depositan 1,5 ml de ácido sulfúrico (3.3.) y 1,5 ml de ácido nítrico (3.2.) en un matraz aforado de 100 ml y se completa este volumen con agua (3.1.).

3.8. Disolución de borohidruro de sodio de 30 g/l y de hidróxido de sodio de 15 g/l

Se disuelven 3,75 g de hidróxido de sodio (3.5.) en unos 100 ml de agua (3.1.). Se añaden sobre esta disolución 7,5 g de borohidruro de sodio (3.4.) y se disuelven con agitación. Se filtra la disolución resultante y se enrasa con agua (3.1.) en un matraz de 250 ml. Esta disolución es estable durante 3 ó 4 días.

3.9. Disolución de permanganato de potasio de 50 g/l

Se disuelven 5 g de permanganato de potasio (3.6.) en 25 ml de agua (3.1.) y esta disolución se lleva a un matraz de 100 ml, enrasando con agua (3.1.).

3.10. Disolución patrón de mercurio de 1000 µg/ml

Puede utilizarse una disolución patrón comercial de una concentración de 1 000 µg/ml. Si se utiliza dicha disolución habrá que tener en cuenta la fecha de caducidad indicada por el fabricante. Si no la tuviese, debería desecharse después de un año de su adquisición. Alternativamente puede prepararse la disolución patrón de mercurio a partir de un compuesto apropiado tal como se indica a continuación: se disuelven 1,080 g de óxido de mercurio (II), HgO, en un volumen mínimo de ácido clorhídrico al 50% (V/V) y se diluye a 1 litro con agua (3.1.).

Esta disolución debe almacenarse en botella de polipropileno y puede ser utilizada al menos durante 1 año a partir de la fecha de su adquisición o preparación.

3.11. Disoluciones patrón de mercurio para la calibración

Se obtiene haciendo las diluciones pertinentes a partir de la disolución correspondiente de 1000 µg/ml. En primer lugar se prepara una disolución intermedia de 10 µg/ml en ácido sulfúrico al 1 % (V/V), y a partir de ésta se preparan las disoluciones de trabajo de 0,05; 0,1 y 0,2 µg/ml, que contendrán 0,25 ml de la disolución de KMnO₄ (3.9.) en 100 ml de ácido sulfúrico al 1 % (V/V).

3.12. 1- Octanol

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA IRRITANTE: Frases (R): 36/38. Frases (S): 23.2. [Real Decreto 363/1995 \(9.2.\)](#).

3.13. Argón N50

Botella comercial de argón para uso como gas de purga y arrastre.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Material de vidrio de borosilicato 3.3. según ISO 3585.

4.2. Botellas de polipropileno de capacidad entre 100 ml y 1 l.

4.3. Pipetas automáticas y dosificadores que cumplan los requisitos recogidos en ISO 8655.

4.4. Espectrofotómetro de absorción atómica

Equipado con lámpara de mercurio, preferentemente de descarga sin electrodos y con posibilidad de acopiar el accesorio para la generación del vapor de mercurio que permita el uso de borohidruro de sodio como reductor.

4.5. Accesorio para generación de vapor de mercurio que permita el uso de borohidruro de sodio como reductor

Dotado de una bomba neumática para la conducción de la disolución reductora desde su botella de depósito hasta el recipiente de reacción donde se encuentra la disolución a medir, y de una línea de entrada de gas inerte para el arrastre de los vapores formados en la reacción de reducción hacia la célula que se encuentra dentro del camino óptico del espectrofotómetro.

4.6. Balanza analítica

Con capacidad para discriminar 1 mg como mínimo.

5. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de orina, preferentemente de 24 horas, se toman en frascos de polietileno. Después de homogeneizar la muestra agitando, se toma una alícuota de 25 ml. Las muestras deben conservarse refrigeradas hasta el momento de efectuar el análisis.

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza de material

6.1.1. Todo el material de vidrio utilizado para el análisis, después de su lavado con un detergente, debe mantenerse sumergido varios minutos en ácido nítrico (3.2.) al 50% (V/V) y ser después enjuagado con agua (3.1.).

6.1.2. Las botellas de polipropileno se limpian sumergiéndolas en ácido nítrico diluido al 10% (V/V) durante varias horas y posteriormente enjuagándolas con agua (3.1.).

6.2. Preparación de la muestra

6.2.1. Se agita la muestra para conseguir una dispersión homogénea del posible precipitado y se añade con pipeta 1 ml de orina al vaso de reacción.

6.2.2. Se añaden 0,10 ml de la disolución de KMnO_4 (3.9.) y 9 ml de la mezcla de ácidos (3.7.).

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. Patrones de calibración. A partir de la disolución patrón de mercurio de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y con las diluciones pertinentes se preparan las disoluciones de trabajo de 0,05; 0,1 y 0,2 μg de Hg por ml tal como se indica en 3.11.

6.3.1.1. Se deposita 1 ml de cada una de estas disoluciones patrón en sendos vasos de reacción con el fin de construir la curva de

calibración.

6.3.1.2. Se añaden a cada vaso de reacción 1 ml de orina exenta o de bajo contenido en mercurio; 0,10 ml de la disolución de KMnO_4 (3.9.) y 8 ml de la mezcla de ácidos (3.7.).

6.3.2. Blanco de orina. Se añade 1 ml de orina exenta o de bajo contenido en mercurio, en el vaso de reacción. Se añaden 0,10 ml de la disolución de KMnO_4 (3.9.) y 9 ml de la mezcla de ácidos (3.7.).

La lectura de su señal se restará de la obtenida para los patrones antes de construir la curva de calibración (ver 6.3.4.).

6.3.3. Blanco de reactivos. Se pipetea 1 ml de agua (3.1.) en el vaso de reacción. Se añaden 0,10 ml de la disolución de KMnO_4 (3.9.) y 9 ml de la mezcla de ácidos (3.7.).

La lectura de su señal se restará de la obtenida para las muestras antes de construir la curva de calibración.

6.3.4. Curva de calibración. De las lecturas, en altura de pico, obtenidas para los patrones preparados según 6.3.1. y que corresponden finalmente a concentraciones de 0,05; 0,1 y 0,2 μg de Hg/ml de orina, se resta la lectura, en altura de pico también, obtenida para el blanco de orina definido según 6.3.2.

Se representan los valores corregidos de altura de pico frente a sus correspondientes concentraciones, obteniéndose así la curva altura 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

6.4.1. Se añade una gota de 1-octanol (3.12.) en el frasco de reacción conteniendo las muestras, patrones o blancos preparados según 6.2. y 6.3., para minimizar la formación de espuma por parte de las orinas.

6.4.2. Se coloca el frasco de reacción en el soporte del generador de vapor de mercurio elemental y se hace pasar argón a través de la disolución durante unos segundos hasta que la línea base del registrador se ajusta a cero o la lectura en absorbancia indica aproximadamente cero.

6.4.3. Se hace pasar la disolución de NaBH_4 (3.8.), que en contacto con la disolución del frasco de reacción producirá la reducción del Hg iónico existente a Hg elemental. El vapor de este metal así producido será arrastrado por una corriente de argón hasta la célula de medida, donde los átomos de mercurio están en condiciones de absorber la radiación procedente de la lámpara. Tras la obtención del pico se interrumpe el paso de agente reductor.

NOTA: Es conveniente calentar ligeramente la célula de medida con el fin de prevenir condensaciones sobre las paredes de la misma.

6.4.4. Se mide la señal en altura del pico registrado a 253,7 nm. Las determinaciones de muestras y patrones deben efectuarse al menos por duplicado.

NOTA - MEDIDA DE SEGURIDAD: No debe retirarse inmediatamente el frasco de reacción tras obtener las medidas. Es conveniente esperar unos segundos a que la producción de vapores haya cesado.

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



7. CÁLCULOS

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

La concentración de mercurio en cada muestra de orina, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$, se determina directamente por interpolación de la lectura obtenida, restando previamente el blanco de reactivos 6.3.3., en la curva de calibración.



7.2. Determinación de la concentración de mercurio en la muestra

Los resultados, expresados en microgramos de mercurio por litro de orina ($\mu\text{g Hg/l}$) se obtienen mediante la siguiente expresión:

$$C = c \times 1000$$

donde:

C es la concentración de mercurio en la muestra en $\mu\text{g Hg/l}$ de orina.

c es la concentración de mercurio en $\mu\text{g Hg/ml}$ de orina, leída en la curva de calibración.

NOTA: Si el resultado quiere expresarse en nanomoles de mercurio por litro de orina se multiplica el resultado calculado en $\mu\text{g Hg/l}$ de orina por 4,9853.

7.3. Los resultados pueden referirse a la cantidad de creatinina presente en la muestra (9.10.) mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\mu\text{g Hg/g creatinina}}{= \frac{\mu\text{gHg/l de orina}}{\text{g creatinina/l orina}}}$$

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

8. PRECISIÓN

8.1. El sesgo del método ha sido evaluado mediante la utilización de Materiales de Referencia (9.11.). La [tabla 1](#) muestra los resultados de esta prueba.

8.2. El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio según se especifica en 9.8 resultó ser inferior al 3% en el intervalo de concentraciones ensayado (véase [tabla 1](#)).

8.3. Límite de detección

El límite de detección del método calculado siguiendo el criterio de la IUPAC (9.6. y 9.7.) como la concentración correspondiente a tres veces la desviación típica de una serie de lecturas correspondientes a diferentes muestras en blanco (n=10) resultó ser de 2 $\mu\text{g/ml}$ de orina. El límite de cuantificación definido por la misma IUPAC como la concentración correspondiente a 10 veces dicha desviación típica es de 5 $\mu\text{g/ml}$ de orina.

8.4. El intervalo de trabajo va desde 5 $\mu\text{g Hg/l}$ a 200 $\mu\text{g Hg/l}$ de orina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Perkin-Elmer, Mercury/Hydride System. Operator's manual.
2. [Real Decreto 363/1995](#) ⁽¹⁾ de 10 de marzo (B.O.E. 5.6.95) "Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas". Modificado el Anexo I por la Orden de 13.9.95 (B.O.E. 19.9.95).
3. ISO 3696, Agua para uso en laboratorio. Especificaciones.
4. ISO 8655, "Partes 1 a 4. Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo".
5. ISO 3585, Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes. Propiedades del vidrio borosilicatado.
6. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Compendium of analytical nomenclature. Pergamon Press. 1978.
7. 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).
8. 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. 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).
10. Harvey, B.; Elkins, et al., Concentration adjustments in urinalysis. Am. Ind. Assoc. J., 1974, (35) 559565.
11. Guide ISO 30. Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence. 1981.

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

Material de referencia	Concentración certificada (µg Hg/l)	Resultados obtenidos		
		Concentración (*) (µg Hg/l)	C.V. (%)	Sesgo (%)
Nivel I	43 ± 8	43,9	2,8	+2,1
Nivel II	145 ± 29	149,2	1,3	+2,9

(*) 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) (9.11.). 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.

ANEXO B: DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA

B.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.

B.2. REACTIVOS

Todos los reactivos deben tener como mínimo la especificación "para análisis". El agua utilizada será grado 2 de pureza como mínimo de acuerdo a ISO 3696 (9.3.).

B.2.1. Hidróxido de Sodio

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 35, Frases (S): 2-26-37/39. Real Decreto 363/1995. (9.2).

B.2.2. Ácido pícrico

NOTA: SUSTANCIA TOXICA Y EXPLOSIVA. Frases (R): 2-4-23/24/25. Frases (S): 28-35-37-44. Real Decreto 363/1995 (9.2).

B.2.3. Ácido clorhídrico min. 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 363/1995 (9.2).

B.2.4. Creatinina

B.2.5. Disolución de NaOH 0,4 N

Pesar 16,0 g de NaOH disolviendo y aforando a 1 litro con agua.

B.2.6. Disolución de ácido pícrico

Disolver 2,0000 g de ácido pícrico en agua, aforando a 1 litro.

B.2.7. Patrón de creatinina (1 mg/ml).

Pesar 1,0000 g. de creatinina. Transferido 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.

B.3. APARATOS Y MATERIAL

B.3.1. Espectrofotómetro o colorímetro capaz de leer a 520 nm.

B.3.2. Cronómetro

B.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

B.4.1. Diluir la orina con agua 1/100.

B.4.2. Añadir 0,5 ml de la orina diluida a 1,0 ml de la disolución de hidróxido sódico. Mezclar bien y dejar estabilizar 5 minutos a temperatura ambiente.

B.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.

B.4.4. Proceder análogamente con 0,5 ml de la disolución patrón de creatinina (B.2.7).

La reacción del ALA con el ácido pícrico 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.

B.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 (B.4.3.).

A_{p2} y A_{p1} : Son las absorbancias correspondientes del patrón de creatinina.

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

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 - 944 990 543 Fax 944 990 678
Correo electrónico.- cnvminsht@mtas.es

ADENDA

Revisión normativa

(1) [Real Decreto 363/1995](#) sufre periódicamente modificaciones por lo que es conveniente consultar los listados que en esta Web se trata de mantener actualizados

