

Determinación de mercurio en orina - Método del vapor frío con cloruro de estaño / Espectrofotometría de absorción atómica

MTA/MB-019/A94

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

PRESENTACIÓN

El mercurio se encuentra en una gran diversidad de estados físicos, 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 cloruro de estaño / 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 tema, o bien ha sido adoptado como método recomendado por entidades profesionales; así como, aquellos métodos recomendados por la UE o basados en métodos ampliamente conocidos y utilizados por especialistas en este tipo de análisis.

Índice

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS

3.1. Agua destilada o desionizada

3.2. Ácido nítrico HNO₃, concentrado

3.3. Ácido clorhídrico HCl, concentrado

3.4. Cloruro de estaño (II) SnCl₂

3.5. Hexaóxoperóxodisulfato (VI) de potasio (peróxodisulfato de potasio) K₂S₂O₈

3.6. Tetraóxomanganato (VII) de potasio (permanganato de potasio) KMnO₄

3.7. Cloruro de mercurio (II) HgCl₂

3.8. Disolución patrón de mercurio de 1000 µg/ml

3.9. Disolución de cloruro de estaño (II) de 200 g/l en ácido clorhídrico 6 N

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Frascos de polietileno

4.2. Tubos de ensayo de vidrio borosilicatado

4.3. Material de vidrio de borosilicato

4.4. Sistema de producción y arrastre de mercurio

4.5. Espectrofotómetro de absorción atómica

5. TOMA DE MUESTRAS

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Limpieza del 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

1. OBJETO Y ÁMBITO 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 sin llama en el intervalo de concentraciones de 10 a 200 µg de mercurio por litro de orina (50 - 1000 nmol/l) aplicable al seguimiento de poblaciones laborales potencialmente expuestas a mercurio metálico y sus compuestos (exceptuando los derivados de alquilo).

Algunos metales como oro, platino y cobre pueden interferir las determinaciones al amalgamarse con el mercurio ya reducido. Ciertos disolventes orgánicos como el benceno, que absorbe a 253,7 nm, interferirán igualmente si están presentes en cantidades significativas.



2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de orina se atacan con ácido nítrico concentrado, se diluyen con agua y se reduce el mercurio presente en la muestra a mercurio elemental por la acción del cloruro de estaño (II). El vapor de mercurio generado se arrastra hasta la celda de medida con la ayuda de una corriente de aire, y allí se determina el contenido en mercurio por espectrofotometría de absorción atómica sin llama (método del vapor frío) a 253,7 nm. La cuantificación se efectúa frente a una curva de adiciones conocidas.



3. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados serán de grado analítico. Siempre que sea posible, se utilizarán reactivos exentos de mercurio, específicos para este tipo de determinaciones.

3.1. Agua destilada o desionizada

El agua será de grado 2 de pureza como mínimo, de acuerdo a ISO 3696 (9.6.).

3.2. Ácido nítrico HNO₃, concentrado

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA COMBURENTE Y CORROSIVA. Frases (R): 35. Frases (S): 2-23-26-27. Real Decreto 2216/1985 (9.5.).

3.3. Ácido clorhídrico HCl, concentrado

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (9.5.).

3.4. Cloruro de estaño (II) SnCl₂

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 22. Frases (S): 24-25. Real Decreto 2216/1985 (9.5.).

3.5. Hexaóxoperoxodisulfato (VI) de potasio (peróxodisulfato de potasio) K₂S₂O₈

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA COMBURENTE. Frases (R): 9. Frases (S): 24/25-27. Real Decreto 2216/1985 (9.5.).

3.6. Tetraóxomanganato (VII) de potasio (permanganato de potasio) KMnO₄

PRECAUCIÓN : SUSTANCIA NOCIVA Y COMBURENTE. Frases (R): 8-22. Frases (S): 2. Real Decreto 2216/1985 (9.5.).

3.7. Cloruro de mercurio (II) HgCl₂

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TOXICA. Frases (R): 26/27/28-33. Frases (S): 1/2-13-28-45. Real Decreto 2216/1985 (9.5.)

3.8. Disolución patrón de mercurio de 1000 µg/ml

Se disuelven 1,354 g de cloruro de mercurio (II) en 50 ml de ácido nítrico y se añade agua destilada hasta completar 1 litro de disolución.

3.9. Disolución de cloruro de estaño (II) de 200 g/l en ácido clorhídrico 6 N

Se pesan 20 g de cloruro de estaño (II), se disuelven en 50 ml de ácido clorhídrico y se afora a 100 ml con agua destilada. Es conveniente hacer borbotear esta disolución antes de usarla haciendo pasar a su través una corriente de aire, ya que el cloruro de estaño (II) suele contener mercurio como impureza.



4. APARATOS Y MATERIAL

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

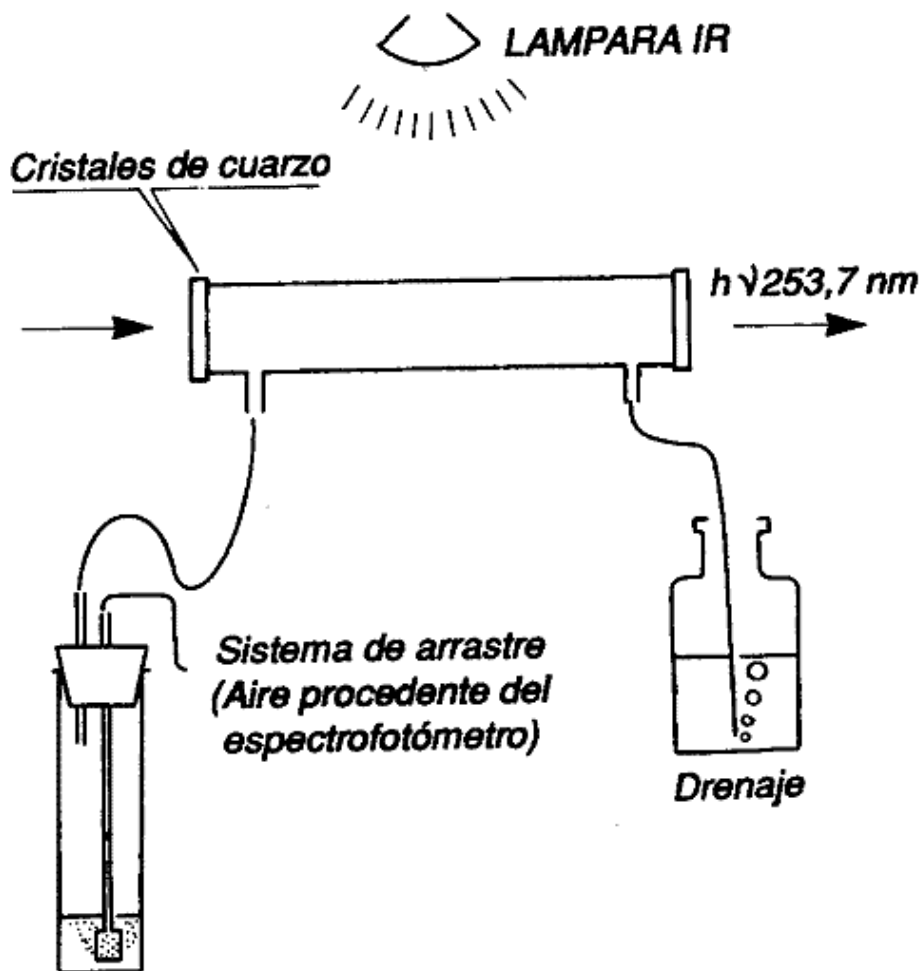
4.2. Tubos de ensayo de vidrio borosilicatado de 10 ml de capacidad.

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

4.4. Sistema de producción y arrastre de mercurio similar al de la figura 1.

4.5. Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con lámpara de mercurio.

FIGURA 1
Sistema de vapor frío modificado



5. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de orina, preferentemente de 24 horas, se toman en frascos de polietileno, exentos de mercurio. Después de homogeneizar la muestra agitando, se toma una alícuota de unos 25 ml.

Debe añadirse peroxodisulfato de potasio como conservante en la proporción de 1 g/l orina. Sin embargo, si el tiempo que va a transcurrir entre la toma de muestra y el análisis no va a sobrepasar 1 ó 2 días no es necesaria la adición de conservante alguno.

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 en ácido nítrico a 50 % (V/V) al menos durante 30 minutos y ser después cuidadosamente enjuagado con agua destilada (3.1.).

6.2. Preparación de la muestra

6.2.1. Se transfieren 0,5 ml de orina a un tubo de digestión (4.2.) procurando no arrastrar con la pipeta el posible sedimento depositado en el fondo.

6.2.2. Se añaden 2,5 ml de ácido nítrico y se agita suavemente, dejando reposar después durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6.2.3. Se añaden 8 ml de agua destilada, se agita suavemente para homogeneizar la mezcla y se deja reposar durante 5 minutos más para eliminar cualquier tipo de vapor o niebla formada en el tubo, que pueda interferir en el análisis.

6.2.4. Las muestras así preparadas están listas para ser transferidas al recipiente de medida del sistema de producción y arrastre de mercurio (fig. 1).

6.3. Preparación de patrones y curva de calibración

6.3.1. A partir de la disolución patrón de mercurio de 1000 µg/ml (3.8.) y mediante las pertinentes diluciones con agua destilada, se preparan disoluciones de 0,05; 0,1 y 0,2 µg Hg/ml. Estas disoluciones deben contener aproximadamente 20 mg/l de permanganato de potasio y 1% (V/V) de ácido nítrico para asegurar la conservación del mercurio en la disolución.

6.3.2. Patrones de adición. Se prepara añadiendo a sendos tubos de digestión que contienen cada uno 0,5 ml de orina de bajo contenido en mercurio, 0,5 ml de cada uno de los patrones acuosos preparados según 6.3.1. Las concentraciones de los patrones de adición así preparados son 0,05; 0,1 y 0,2 µg Hg/ml de orina.

6.3.3. Blanco de orina. Se preparan añadiendo a 0,5 ml de la misma orina que ha servido de base para los patrones de adición (6.3.2.) 0,5 ml de agua destilada (3.1).

6.3.4. Blanco de reactivos. Consiste únicamente en 1 ml de agua destilada en un tubo de digestión. Es necesario para detectar la presencia de mercurio en los reactivos empleados en el método y efectuar las oportunas correcciones (7.2.).

6.3.5. Se añaden 2,5 ml de ácido nítrico a patrones, blanco de orina y blanco de reactivos, y se dejan reposar durante 5 minutos tal como se hizo con las muestras en 6.2.2.

6.3.6. Se añaden 7,5 ml de agua destilada a patrones y blancos para igualar el volumen total con el de las preparaciones de muestras. Tras dejar reposar 5 minutos, patrones y blancos se trasvasan al recipiente de medida y se analizan según 6.4.

6.3.7. La curva de calibración se construye representando los valores de absorbancias o altura de pico obtenidos para los patrones (6.3.2.), restando el valor obtenido para el blanco de orina (6.3.3.), frente a sus respectivas concentraciones: 0,05; 0,1 y 0,2 µg Hg/ml orina.



6.4. Determinación

6.4.1. Se trasvasa el contenido de cada uno de los tubos de digestión correspondientes a blancos, patrones y muestras al recipiente de medida del sistema de producción y arrastre de mercurio (fig. 1) e inmediatamente antes de efectuar la determinación se añade 1 ml de cloruro de estaño (II).

6.4.2. Se hace pasar una corriente de aire de aproximadamente 1 l/min de caudal por el sistema de producción y arrastre de mercurio (fig. 1). El mercurio elemental, formado por la acción reductora del cloruro de estaño (II) sobre las especies iónicas presentes en la muestra, es liberado de la disolución por el borboteo que produce la corriente de aire en el seno de la muestra y es arrastrado por dicha corriente hasta la celda de medida.

6.4.3. Se mide la absorbancia o la altura del pico correspondientes al vapor de mercurio elemental presente en la muestra a 253,7 nm.

NOTA:

1. La sensibilidad del método dependerá de la geometría del sistema de producción y arrastre de mercurio (fig. 1) y del caudal de la corriente de aire. Este caudal puede ser optimizado experimentalmente (9.4) en cada caso.
2. Resulta necesario emplear algún tipo de desecante o bien una lámpara de infrarrojo o similar (fig. 1) para evitar condensaciones sobre la célula de medida (9.2. y 9.4.).



7. CÁLCULOS

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

La concentración de mercurio en µg Hg/ml de orina se determina 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 mercurio en la muestra.

Los resultados, expresados en microgramos de mercurio por litro de orina (µg Hg/l) se obtienen mediante la siguiente expresión:

$$C = c \times 1000$$

donde:

C es la concentración de mercurio en la muestra en µg Hg/l orina.

c es la concentración de mercurio en µg Hg/ml de orina, leída en la curva de calibración.

7.3. Los resultados pueden referirse a la cantidad de creatinina presente en la muestra (9.13.) 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 A](#)

8. PRECISIÓN

8.1. El coeficiente de variación obtenido para una muestra real con un nivel de concentración de 50 µg Hg/l orina fue de 5,4%, (9.4.).

El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio según 9.11. resultó ser inferior al 2% en el intervalo de concentraciones ensayado.(Véase [Tabla 1](#)).

8.2. 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.

8.3. El intervalo de trabajo va desde 10 a 200 µg Hg/l orina.

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

Material de referencia	Concentrac. certificada (µg Hg/l)	Resultados obtenidos		
		Concentrac. (*) (µg Hg/l)	C.V. (%)	Sesgo (%)
BIORAD I	43 ±8	43,5	1,9	1,1
SRM 2671a	105 ±8	100,6	1,9	4,1
BIORAD II	145 ±29	134,8	1,1	7,0

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) (9.14.). 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.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hatch,W.R., Ott, W.L., **Determination of submicrogram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry**, **Anal. Chem.** 40(14) 2085-2087, 1968.
2. National Institute for Occupational Safety and Health. **Method P&CAM 165 : Mercury in urine**. Manual of analytical methods, 2nd. ed. Vol. 1, 1977.
3. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Análisis de mercurio en orina por absorción atómica**. HA-214, Junio 1977.
4. Mazarrasa, O., Arroyo, M., **Exposición a mercurio en ambientes laborales: mejoras introducidas en su análisis por espectrofotometría de absorción atómica**. Congreso Nacional de Medicina, Higiene y Seguridad en el Trabajo, Zaragoza, Octubre 1972.
5. Real Decreto 2216/1985 ⁽¹⁾ 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"**. Actualizado por Orden de 9-12-92 (M. Relac. Cortes B.O.E. 17-12-92)
6. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio**. Especificaciones.
7. ISO 8655, "Partes 1 a 4. **Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo**.
8. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes**. Propiedades del vidrio borosilicatado.

9. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). **Compendium of analytical nomenclature**. Pergamon Press. 1978.
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).
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.
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).
13. Harvey, B., Elkins, et al., **Concentration adjustments in urinalysis**. Am. Ind. Assoc. J., 1974, (35) 559565.
14. 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. (9.5).

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 (9.5).

A.2.3. Ácido clorhídrico min. 30%

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R): 34-37. Frases (S): 2-26. Real Decreto 2216/1985 (9.5).

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. 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.

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. Diluir la orina con agua 1/100.

A.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.

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 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.

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.

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

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