

## NOTA TÉCNICA

# Procedimiento de validación de un método para cuantificar mercurio en sangre por espectroscopía de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación



Irene Palazón Bru, Montserrat González-Estecha\* y Manuel Arroyo Fernández

Unidad de Elementos Traza. Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

Recibido el 28 de octubre de 2014; aceptado el 29 de enero de 2015  
Disponible en Internet el 1 de mayo de 2015

### PALABRAS CLAVE

Método;  
Mercurio;  
Absorción atómica;  
Amalgamación

### KEYWORDS

Method;  
Mercury;  
Atomic absorption;  
Amalgamation

**Resumen** El mercurio es un tóxico ambiental que produce numerosos efectos adversos en la salud humana y en los ecosistemas naturales. La ingesta excesiva de metilmercurio procedente del pescado contaminado produce toxicidad neurológica, reproductiva y cardiovascular.

El objetivo de este estudio es validar un método para la medida de mercurio en sangre mediante espectroscopía de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación.

Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,103  $\mu\text{g/L}$  y 0,313  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. La sensibilidad analítica encontrada fue de 12080  $\mu\text{Abs/ng Hg}$ . La curva de calibración es lineal entre 0 y 100  $\mu\text{g/L}$ . La pendiente obtenida con adiciones estándar de mercurio está incluida dentro del intervalo de confianza de la curva de calibración con patrones acuosos, por tanto no hay efecto matriz. Se comprobó la exactitud y precisión empleando material de referencia Seronorm® Trace Elements Whole Blood. La recuperación media obtenida fue de 97,36%.

El método propuesto se considera sensible, robusto, exacto y preciso para biomonitorizar la concentración de mercurio en sangre como indicador de riesgo para la salud.

© 2014 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Validation procedure of a method for measuring mercury in blood by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry

**Abstract** Mercury is an environmental toxicant that causes numerous adverse effects in human health and natural ecosystems. The excessive methyl-mercury intake due to consumption of contaminated fish leads to neurological, reproductive and cardiovascular toxicity.

The aim of this study is to validate a method for measuring mercury in blood samples by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [montse@cmpx.net](mailto:montse@cmpx.net) (M. González-Estecha).

The detection and quantification limits were 0.103 y 0.313  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The analytical sensitivity was 12080  $\mu\text{Abs/ng Hg}$ . The calibration curve is linear between 0 and 100  $\mu\text{g/L}$ . The slope of the standard addition curve is within the confidence interval of the calibration curve using aqueous standards, meaning that there is no matrix effect. The precision and accuracy were tested using Seronorm® Trace Elements Whole Blood reference material. The mean recovery was 97.36%

The proposed method shows to be sensitive, robust, accurate, and precise for biomonitoring the concentration of mercury in blood samples as an indicator of health risk.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El mercurio se puede encontrar en tres estados de oxidación:  $\text{Hg}^0$  (metálico),  $\text{Hg}^+$  (mercurioso) y  $\text{Hg}^{2+}$  (mercúrico). Las formas mercuriosa y mercúrica pueden formar numerosos compuestos inorgánicos y orgánicos<sup>1</sup>.

El mercurio es un tóxico ambiental que provoca gran cantidad de efectos adversos tanto en la salud humana como en los ecosistemas naturales. Este elemento contamina el medioambiente a través de erupciones volcánicas, cementeras, minería, combustión de fósiles entre otras, y a partir de depósitos creados por emisiones naturales y antropogénicas, que nuevamente pasan a la atmósfera introduciéndose en los ciclos biológicos<sup>2</sup>.

La mayor parte de Hg elemental se evapora y permanece en la atmósfera donde reacciona con el ozono y otros oxidantes para formar compuestos iónicos, bastante solubles, que acaban depositándose en la tierra o en el agua con la lluvia o la nieve. El mercurio, una vez depositado, se transforma en metilmercurio por la acción de determinadas bacterias sulfato reductoras y se bioacumula en los organismos acuáticos incorporándose en la cadena trófica de alimentos<sup>3</sup>.

Las fuentes de exposición principales a mercurio en la población general son el consumo de pescado y otros productos marinos, las amalgamas dentales y algunas vacunas<sup>4</sup>.

El mercurio y sus compuestos son especialmente tóxicos para el sistema nervioso, riñones y sistema cardiovascular. Otros sistemas que pueden verse afectados son el sistema respiratorio, gastrointestinal, hematológico, y reproductivo<sup>4</sup>.

Todos los seres humanos estamos expuestos a bajos niveles de mercurio. Los factores que determinan la aparición de efectos adversos y su severidad son: forma química del mercurio, dosis, edad, duración de la exposición, ruta de exposición y el hábito dietético de consumo de pescado y marisco.

En la sangre, el mercurio derivado de las sales de mercurio inorgánico se distribuye igualmente entre las proteínas plasmáticas y hematíes, mientras que el mercurio derivado de los organomercuriales se fija especialmente en los hematíes<sup>5</sup>, principalmente en los grupos SH de la hemoglobina. Por tanto, la sangre es un buen marcador biológico para evaluar la exposición al metilmercurio procedente principalmente de la ingesta de pescado contaminado<sup>6</sup>.

El análisis de mercurio se ha realizado principalmente mediante espectroscopía de absorción atómica con vapor frío con inyección de flujo, y más recientemente, por

espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Sin embargo, estos métodos presentan algunas limitaciones como la dilución y la digestión de la muestra. Existe la posibilidad de realizar análisis de Hg directos, tanto de muestras sólidas como líquidas, mediante analizadores de mercurio que se basan en una descomposición térmica, amalgamación y medida por espectroscopía de absorción atómica. En los Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental desarrolló el método 7473 para medir mercurio en líquidos y sólidos mediante descomposición térmica, amalgamación y espectroscopía de absorción atómica, señalando la gran ventaja de evitar el pretratamiento de la muestra y posibles pérdidas de Hg con el consiguiente ahorro de tiempo y costes<sup>7</sup>.

La necesidad de obtener un método para la determinación de este metal se debe al reciente aumento de la demanda de solicitudes en las determinaciones de mercurio en los laboratorios clínicos. Por lo que la disposición de un método simple de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación para su medida es una gran ventaja para este tipo de laboratorios.

El objeto del presente trabajo es describir la metodología a seguir para la validación de un método directo desarrollado por el propio laboratorio para la determinación de mercurio en sangre por espectroscopía de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación aplicable a los laboratorios clínicos.

## Material y métodos

### Instrumentación

Para el análisis de mercurio se utilizó un espectrómetro de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación SMS 100 Perkin Elmer. Se usó una celda de 250 mm y una lámpara de mercurio como fuente de alimentación.

### Reactivos

Para la construcción de la curva de calibrado se emplearon disoluciones estándares de mercurio. La calibración se realizó a partir de una disolución madre de mercurio (Perkin Elmer), cuyo valor de referencia es 1 g/L. Las disoluciones patrón se prepararon por diluciones sucesivas de la disolución madre con agua bidestilada libre de metales de Versylene Fresenius.

Los reactivos químicos utilizados son de alta pureza, específicos para el análisis de elementos traza y con un certificado de pureza en el que figura la concentración que contienen de otros elementos.

Los reactivos utilizados para la determinación de mercurio en sangre fueron los siguientes:

- Ácido nítrico Suprapur de Merck (65%).
- Agua destilada exenta de metales Versylene Fresenius.

Antes de la utilización del material de vidrio, este se limpió por inmersión en ácido nítrico al 10% (v/v) durante 24 horas. Tras dicho lavado se enjuagó el material con agua bidestilada libre de metales.

### Material de referencia

Las muestras de referencia en sangre (dos niveles refs. 210105 y 210305), cuyos valores de referencia son 1,50 y 37,1  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, se facilitaron por Seronorm (Billingstad, Noruega). Este material de referencia se encontraba liofilizado y se reconstituyó mediante la adición de 3 mL de agua bidestilada.

### Material biológico

La extracción sanguínea se realizó en ayunas a primera hora de la mañana con método desechable obteniéndose un tubo de sangre anticoagulada con EDTA- $\text{K}_3$  para la medición de mercurio de Beckton Dickinson (BD Vacutainer® K3E 7.2 mg, ref. 368860; 4,0 mL). La localización de la punción venosa se limpió con clorhexidina, un antiséptico con función bactericida y fungicida.

### Curva de calibración

Existe controversia si la calibración debe realizarse con patrones acuosos o con material de referencia. En un trabajo reciente de Herbelo-Hermello et al. se recomienda el uso de distintas cantidades de material de referencia con matrices similares a la muestra. Sin embargo, en el método que se describe se utilizaron patrones acuosos, teniendo en cuenta que, tanto la preparación como la medida de los patrones acuosos, se realizó en el momento del análisis, ya que de lo contrario se producirían pérdidas en la concentración de mercurio al evaporarse con el transcurso del tiempo<sup>8</sup>.

Las concentraciones de la curva de calibración fueron de 25,50 y 100  $\mu\text{g/L}$ . No fue necesaria la realización de un pretratamiento de la muestra.

El blanco de la curva de calibración se realizó empleando agua bidestilada libre de metales.

### Análisis por espectroscopía de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación

Las condiciones instrumentales empleadas en el análisis de mercurio se esquematizan en la [tabla 1](#).

Con el fin de conseguir la mayor sensibilidad analítica posible, se utilizaron unas condiciones analíticas optimizadas ([tabla 2](#)), que comienzan por una etapa de secado a

**Tabla 1** Condiciones instrumentales para el análisis de mercurio en sangre

Parámetro	Hg
Longitud de onda (nm)	253,7
Presión de entrada de oxígeno (kPa)	100
Presión de oxígeno (bares)	2
Volumen ( $\mu\text{L}$ )	200
Lectura	Altura de pico
Tiempo de integración (s)	90
Flujo de oxígeno (mL/min)	300

**Tabla 2** Condiciones analíticas optimizadas para la medición de mercurio

Etapas	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (s)
Secado	400	140
Descomposición	650	100
Catálisis	600	60
Amalgama	600	30
Integración	--	90

400  $^{\circ}\text{C}$  para evaporar el agua de la muestra. Posteriormente se realizó un calentamiento a 650  $^{\circ}\text{C}$  en un horno rico en oxígeno con el fin de liberar todos los productos de descomposición, incluido el mercurio. A continuación dichos productos son transportados por una corriente de oxígeno a la sección catalítica del horno, donde cualquier halógeno u óxido de nitrógeno o azufre queda retenido en el catalizador a una temperatura de 600  $^{\circ}\text{C}$ . Por último, el vapor restante es transportado a la célula de amalgamación, la cual atrapa selectivamente el mercurio. Dicha célula se calentó rápidamente a 600  $^{\circ}\text{C}$  liberando vapor de mercurio, el cual se transporta por una corriente de oxígeno hasta la celda de absorción, donde se realizó la lectura<sup>9</sup>.

### Validación del método analítico

Los parámetros característicos del método analítico se determinaron por medidas de blancos y disoluciones estándar a diferentes concentraciones. Para validar este método se determinaron los siguientes parámetros: límite de detección y cuantificación, rango de linealidad, masa característica, especificidad y exactitud, recuperación y estudio de precisión<sup>10</sup>.

Para la determinación del límite de detección se analizaron 30 blancos acuosos y se tomó como valor del mismo el triple de la relación entre la desviación típica de las absorbancias de los blancos y la pendiente de la calibración acuosa. El límite de cuantificación se calculó como diez veces la relación antes mencionada.

Con objeto de comprobar la linealidad del procedimiento, se realizó una curva de calibración con patrones acuosos de 3 puntos, con concentraciones desde 25 hasta 100  $\mu\text{g/L}$ .

La sensibilidad se define como el cambio en la respuesta de un sistema de medida o instrumento dividido por

el correspondiente cambio en el estímulo (modificado de VIM93)<sup>10</sup>.

Para verificar la ausencia de interferencias provocadas por la matriz se empleó el método de adiciones estándar sobre varias mezclas de muestras reales. En este caso se realizó una curva de calibración por el método de las adiciones estándar, adicionando a un pool de sangre cantidades de mercurio necesarias para alcanzar una concentración final de aproximadamente 12,5; 25; 50 y 100 µg/L.

Para determinar la exactitud del método se determinó la veracidad (expresada en términos de inexactitud), el estudio de recuperación y la precisión.

La veracidad se expresó en términos de sesgo o inexactitud (bias) y se calculó hallando la diferencia entre la media aritmética de las concentraciones halladas y el valor de referencia aceptado<sup>11</sup>.

Para evaluar la inexactitud del método se analizaron 2 controles internos (mencionados en el apartado 2.3.) con concentraciones crecientes de mercurio durante 10 días diferentes realizando todos los días una calibración diferente y se aplicó la fórmula:

$$\text{Inexactitud} = [(VR - VL)/VR] \times 100$$

Donde VR y VL son el valor de referencia y el valor de laboratorio, respectivamente.

Para el estudio de recuperación se añadió a una muestra de concentración conocida diferentes cantidades de estándar y se halló la diferencia entre la muestra analizada sin la adición de estándar y las muestras a las que se añadió estándar.

Para estimar el sesgo expresado en términos de recuperación se calculó la media teórica que tendría que dar dependiendo de la cantidad de estándar añadida y se aplicó la fórmula siguiente:

$$\text{recuperación } n(\%) = 100 \cdot \frac{\bar{X}_j}{\mu_j}$$

Las concentraciones empleadas para el cálculo de la recuperación fueron de 12,5; 25; 50 y 100 µg/L.

La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetibilidad se obtuvo analizando dos pools de sangre 10 veces, mientras que la precisión intermedia se halló analizando durante 10 días dos controles de calidad internos (mencionados en el apartado 2.3.).

## Resultados

Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,103 y 0,313 µg/L, respectivamente.

La curva de calibración con patrones acuosos de 3 puntos se observa en la figura 1. El coeficiente de variación de los factores de respuesta, relación entre la absorbancia y la concentración, fue próxima al 5% (5,80%), por lo que la calibración entre 0 y 100 µg/L se puede considerar lineal. Además, se puede considerar que la recta de regresión pasa por el origen al estar incluido este valor dentro del intervalo de confianza al 95% del valor de la ordenada en el origen

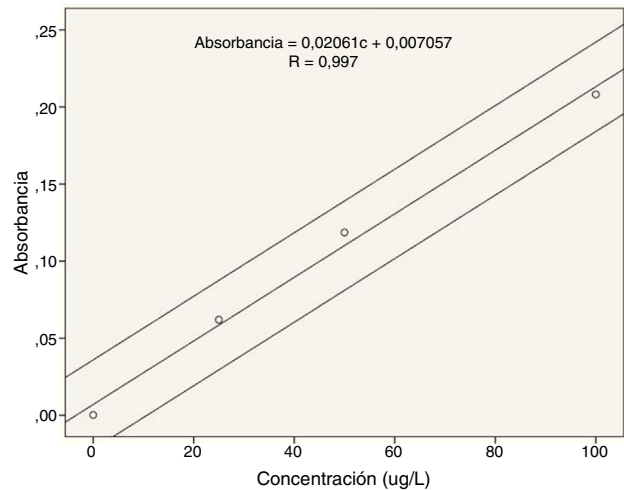


Figura 1 Curva de calibración con los límites de confianza. c: concentración; R: Rho de Spearman.

(b = -0,022- 0,036). El coeficiente de correlación al cuadrado de la recta de regresión fue 0,993.

La sensibilidad obtenida fue de 12080 µAbs/ng Hg, que se encontró dentro del intervalo establecido por el fabricante: 8000 - 20000 µAbs/ng Hg.

La pendiente de la recta de regresión de las adiciones estándar (0,001962 abs·L/µg), cuyo coeficiente de correlación al cuadrado fue 0,999, está incluida dentro del límite de confianza al 95% de la pendiente de la regresión de la curva de calibración realizada con los patrones acuosos (0,001546-0,002577 abs·L/µg), por lo que podemos afirmar que no existe efecto matriz y que se pueden utilizar patrones acuosos para obtener la curva de calibración.

Los resultados obtenidos para evaluar la inexactitud se recogen en la tabla 3.

Se halló una recuperación media de un 97,36%.

Los resultados referentes a la repetibilidad se observan en la tabla 4, mientras que los correspondientes a la precisión intermedia se recogen en la tabla 5.

Tabla 3 Estimación de la inexactitud en dos niveles de controles

	Control 1	Control 2
VR Hg µg/L	1,5 (0,9-2,1)	37,1 (29,6-44,6)
VL Hg µg/L	1,7	38,1
Inexactitud (%)	11,9	6,4

VL: valor laboratorio; VR: valor de referencia.

Tabla 4 Estimación de la repetibilidad en dos pools de sangre

Media (µg/L)	DE	CV (%)
17,1	0,5	2,7
32,7	0,5	1,4

CV: coeficiente de variación (DE/media)x 100; DE: desviación estándar.

**Tabla 5** Estimación de la precisión intermedia en dos niveles de controles

Media ( $\mu\text{g/L}$ )	DE	CV (%)
1,7	0,1	7,3
38,1	2,0	5,2

CV: coeficiente de variación  $(\text{DE}/\text{media}) \times 100$ ; DE: desviación estándar.

## Discusión

El método evaluado es lineal en las concentraciones estudiadas, que comprenden desde  $0 \mu\text{g/L}$  hasta  $100 \mu\text{g/L}$ .

Debido a la existencia de estudios que indican que los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega 3 de cadena larga presentes en el pescado podían haber conducido a una infraestimación de los efectos adversos potenciales del metilmercurio del pescado, se estableció como límite aceptable una concentración total de mercurio en sangre de  $6,4 \mu\text{g/L}$ <sup>12</sup>. Por ello, los resultados obtenidos en cuanto a sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, nos indican que se trata de un método muy sensible incluso para muestras con concentraciones sanguíneas de mercurio muy bajas.

Es un procedimiento preciso y exacto utilizando material de referencia así como muestras biológicas de sangre.

Es de destacar tanto la rapidez del análisis (tabla 2) como la ausencia de efecto matriz, lo que hace posible el análisis directo de las muestras de sangre evitando cualquier procedimiento de digestión de la muestra y, por tanto, evitando también contaminaciones o pérdidas de mercurio.

Por todo lo anterior, se considera que el método evaluado es eficaz para el análisis de mercurio en sangre, lo que resulta de gran interés para los laboratorios clínicos para biomonitorizar la concentración de metilmercurio en muestras biológicas como indicador de riesgo para la salud humana, ya que dicho compuesto en población general puede producir efectos tóxicos, especialmente para el sistema nervioso, riñones y sistema cardiovascular.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. OMS. *Methylmercury environmental health criteria 101*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1990.
2. Registry A for TS and D. ATSDR - Toxicological Profile: Mercury. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=115&tid=24>. Acceso el 22 de Julio de 2014.
3. United Nations Environment Programme (UNEP). Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals Mercury Programme 2002. [consultado 22 Jul 2014]. Disponible en: <http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/GMA-report-TOC.htm>
4. WHO, UNEP. NoGuidance for identifying populations at risk from mercury exposure. WHO 2008. [consultado 22 Jul 2014]. Disponible en: <http://www.chem.unep.ch/mercury/IdentifyingPopnatRiskExposuretoMe>
5. Clarkson TW. Epidemiological and experimental aspects of lead and mercury contamination of food. *Food Cosmet Toxicol.* 1971;9:229-43.
6. White JF, Rothstein A. The interaction of methyl mercury with erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1973;26:370-84.
7. Environmental Protection Agency (EPA). Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry. Acceso el 22 de Julio de 2014. Disponible en: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7473.pdf>
8. Herbello-Hermelo P, Castro FM, Bermejo-Barrera P. Evaluation of direct determination of mercury in whole human blood using a mercury analyzer. *At Spectrosc.* 2011;32:102-6.
9. The determination of total mercury in whole blood using thermal decomposition and amalgamation coupled with atomic absorption. Perkin Elmer. 2009.
10. Trasobares E, Seijas V. L-CJ. Validación metodológica y cálculo de incertidumbres. Aplicación práctica en el caso de elementos traza. *SEQC.* 2009.
11. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45:82-96.
12. González-Estechea M, Bodas-Pinedo A, Guillén-Pérez JJ, Rubio-Herrera MÁ, Ordóñez-Iriarte JM, Trasobares-Iglesias EM, et al. Methylmercury exposure in the general population; toxicokinetics; differences by gender, nutritional and genetic factors. *Nutr Hosp.* 2014;30:969-88.