

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR METILMERCURIO EN TEJIDO DE PESCADO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Luisa O. Vega Bolaños,¹ José A. Arias Verdés,² Gilberto Beltrán Llerandi,³ Odalys Castro Díaz¹ y Olga L. Moreno Téllez⁴

RESUMEN

Se validó el método para determinar metilmercurio en tejido de pescado, por cromatografía de gases con detector de captura electrónica, descrito en la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) International. El intervalo lineal de la curva se obtuvo entre 0,02 y 1 $\mu\text{g/mL}$, el coeficiente de correlación lineal fue de 0,9979. Una muestra de pescado contaminada con 1 mg/kg analizada 20 veces, permitió determinar la repetibilidad del método. El límite de cuantificación fue 0,16 mg/kg y el límite de detección 0,06 ppm. Las muestras de pescado contaminadas de 0,2 a 10 mg/kg presentaron recobrados entre 108,8 y 94,66 %. Los coeficientes de variación oscilaron desde 1,65 hasta 9,26 %.

Descriptor DeCS: COMPUESTOS METILMERCURIO/análisis; CROMATOGRAFIA DE GASES/métodos; PECES

El metilmercurio es un compuesto tóxico que aparece en el ambiente producto de la contaminación por fuentes naturales o antropogénica.¹⁻³ Este compuesto se produce en medio acuático por vía enzimática y mediante la acción microbiana.

El metilmercurio es rápidamente acumulado por casi toda la biota acuática y se ha demostrado que sus concentraciones más

elevadas se encuentran en el tejido de los peces de mayor edad y tamaño.⁴

En la mayoría de los países el pescado y los productos pesqueros presentan niveles de metilmercurio en su porción comestible que no exceden de 200 a 300 $\mu\text{g/kg}$. Sin embargo, en las especies depredadoras como la tuna, el tiburón y el pez espada (aún en áreas no contaminadas) pueden tener niveles de este contaminante por

¹Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

²Licenciado en Química. Investigador Auxiliar.

³Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar.

⁴Técnica en Química.

encima de 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, así como en determinados peces de agua dulce.^{5,6}

El consumo de pescado contaminado con metilmercurio representa un riesgo mayor para las mujeres embarazadas que para el hombre adulto, ya que este contaminante pasa al feto provocándole daños neurológicos severos, por ser éste un organismo más susceptible.⁷ El sistema nervioso central es el tejido blanco principal de los efectos del metilmercurio en adultos, siendo las funciones más afectadas: la sensorial, la auditiva, y la visual, junto con las áreas del cerebro, y especialmente en el cerebelo las áreas relacionadas con la coordinación.⁸ Los efectos tempranos de la intoxicación son síntomas no específicos como: parestesia, indisposición ligera y visión borrosa.⁹ Existen evidencias de que el metilmercurio afecta el sistema inmunológico del hombre en exposición crónica.¹⁰

Se ha encontrado una asociación entre las anormalidades neurológicas y la exposición a metilmercurio, mediante el consumo de pescado contaminado en hombres y mujeres adultos.^{8,11} La OMS ha establecido una ingesta diaria tolerable para metilmercurio de 0,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal.¹²

Varios países han establecido en sus regulaciones sanitarias límites de mercurio total en especies de peces depredadores de 1 mg/kg y en otros productos pesqueros 0,5 mg/kg, y Noruega ha propuesto 1 mg/kg para metilmercurio en las mismas especies.¹³

Varios métodos analíticos están disponibles para la determinación de mercurio total, inorgánico y orgánico en diferentes sustratos. Todos representan una mejora considerable del método original colorimétrico de la ditizona. El método de activación neutrónica se considera como el más exacto y sensible y usualmente es

utilizado como método de referencia. El método de absorción atómica sin llama es el más ampliamente usado en muestras biológicas y ambientales, aunque no es selectivo, puede determinar tanto el mercurio total como el mercurio inorgánico y por diferencia el mercurio orgánico. El método de cromatografía de gas-líquido con detector de captura electrónica se prefiere cuando se requiere medir selectivamente el metilmercurio en tejidos de pescado en presencia de otros compuestos de mercurio.¹⁴

En el presente trabajo se validó un método por cromatografía de gases con detector de captura electrónica para determinar metilmercurio en tejido de pescado, el cual elimina las interferencias orgánicas con lavados de acetona y tolueno y libera el metilmercurio enlazado a la proteína con ácido clorhídrico. El extracto se redissuelve en tolueno.¹⁵

MÉTODOS

Para verificar la linealidad de la respuesta del detector de captura electrónica con respecto a la concentración de metilmercurio, se construyó una curva de calibración con 8 puntos por triplicado a partir de 2 soluciones de trabajo (2 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en frascos volumétricos de 25 mL con las concentraciones siguientes: 0,02; 0,04; 0,05; 0,08; 0,1; 0,2; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para ensayar este método se empleó 1 kg de un tejido de pescado homogeneizado, el cual se dividió en 7 porciones de 100 g cada una. Una de estas porciones fue contaminada con un patrón de metilmercurio (Sigma Chemical Co.) a un nivel de 1 mg/kg para el estudio de repetibilidad. Otra porción se mantuvo sin contaminar como blanco muestra, para conocer las interferencias de la matriz. Las

restantes porciones se contaminaron con 0,2; 0,5; 1; 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, para los estudios de recuperación. Cada porción contaminada fue subdividida en muestras de ensayo de 5 g cada una. Las muestras de ensayo fueron procesadas por la técnica descrita por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) International, para la purificación y extracción del metilmercurio.

En la identificación y cuantificación del metilmercurio se inyectaron 5 μL del extracto en una columna de 2 m de longitud por 2 mm de diámetro interno empacada con 5 % de DEGS-PS sobre Supelcoport 100-120 mesh, con las condiciones cromatográficas siguientes: temperatura del detector 300 $^{\circ}\text{C}$, temperatura del inyector 200 $^{\circ}\text{C}$, temperatura de la columna 155 $^{\circ}\text{C}$, flujo de gas portador 30 mL/min, purga del detector 100 mL/min y la corriente de polarización en 8. En estas condiciones se comparó la respuesta de la muestra de ensayo contaminada con la de los patrones y se calculó la concentración de metilmercurio por la ecuación siguiente:

$$\text{Concentración en mg/kg} = \frac{V_1 \cdot C_1 \cdot A_2 \cdot V_d}{V_2 \cdot A_1 \cdot P_m}$$

donde:

V_1 = volumen de la solución de referencia inyectada en μL .

C_1 = concentración de la solución de referencia en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A_1 = área del pico de la solución de referencia en mm^2 .

V_2 = volumen de la muestra inyectada en μL .

A_2 = área del pico de la muestra en mm^2 .

V_d = volumen de dilución del extracto en mL.

P_m = peso inicial de la porción de ensayo en g.

RESULTADOS

La figura 1 muestra el gráfico de calibración y la ecuación de regresión obtenida por el método referido que relaciona las áreas promedio de cada pico calculadas por integración manual y la cantidad de metilmercurio en el intervalo de 0,1 a 5 ng, con un coeficiente de correlación lineal de 0,9979. Como la respuesta del detector de captura electrónica varía día a día, una inyección de 25 μL de una solución patrón de cloruro de mercurio debe ser realizada al finalizar cada jornada de trabajo.

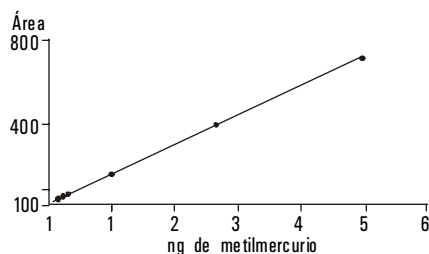


Fig. 1. Curva de calibración.

Bajo las condiciones descritas en este artículo, 400 pg de metilmercurio producen la señal que se observa en la figura 2, con un tiempo de retención de $3,0 \pm 0,1$ min.

El detector de captura electrónica a corriente constante utilizado es menos sensible al metilmercurio que el detector de captura electrónica con voltaje de polarización variable descrito en la AOAC, que informa una sensibilidad mínima de 25 pg.

En la figura 3 se presenta un cromatograma de una muestra de pescado contaminada con 1 mg/kg de metilmercurio. No se observaron picos de inter-

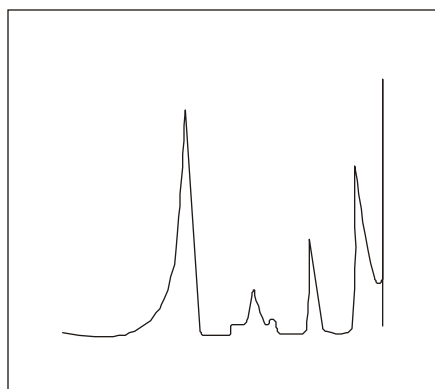


Fig. 2. *Metilmercurio (400 pg).*

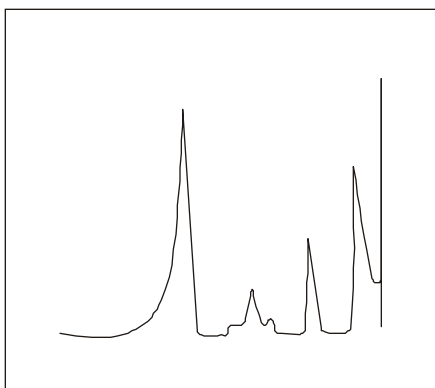


Fig. 3. *Muestra de pescado contaminada con 1mg/kg de metilmercurio.*

ferencias provenientes de la matriz y de los solventes, siendo la repetibilidad de 0,0415 mg/kg con un coeficiente de variación del 2,39 %.

SUMMARY

We validated a method to determine methylmercury in fish tissues using gas chromatography with an electron capture detector as described by the Association of Official Analytical Chemist (AOAC) International. The linear curve range was 0.02 to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and linear correlation coefficient was 0.9979. A 1 mg/kg methylmercury-contaminated fish sample was analyzed 20 times to determine repeatability of the method. The quantification limit was 0.16 mg/kg and detection limit was 0.06 ppm. Fish samples contaminated with 0.2 to 10 mg/kg methylmercury showed recovery indexes from 94.66 to 108.8%

Subject headings: METHYLMERCURY COMPOUNDS/analysis; CHROMATOGRAPHY; GAS/methods; FISH

En la tabla aparecen los recobrados de las muestras de pescado contaminadas con metilmercurio en el intervalo de 0,2 a 10 mg/kg. Los valores de recuperación se encontraron entre 94 y 108,8 %, con un coeficiente de variación máximo de 9,26 %.

El límite de detección se estableció en 0,06 mg/kg inyectando 5 μL del extracto de pescado, equivalente a una masa de 1 mg. Este límite se considera modesto si se compara con el método de absorción atómica sin llama, que determina mercurio total e inorgánico, pero tiene el inconveniente de que requiere una limpieza rigurosa de la cristalería, para evitar las interferencias, y además no es selectivo a este compuesto.

El presente método es rápido y simple para el análisis de metilmercurio en tejido de pescado. Alrededor de 10 muestras pueden ser fácilmente procesadas en 8 h para su determinación por cromatografía de gases.

TABLA. *Recobrados de metilmercurio en tejido de pescado*

Nivel de contaminación	Media (mg/kg)	Recobrado (%)	DE	CV (%)
0,2	0,197	98,62	0,01826	9,26
0,5	0,5440	108,80	0,04320	8,60
1,0	1,0178	101,80	0,02440	2,39
5,0	4,7650	95,30	0,11880	2,44
10,0	9,4660	94,66	0,15619	1,65

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malm O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res* 1998;77(2):73-8.
2. Lindqvist O, Jernelov A, Johansson K, Rodhe R. Mercury in the Swedish environment global and local sources, Solna, National Swedish Environment Protection Board 1984;105: (report No. 1816).
3. Lindberg S, Stokes P, Goldberg E, Wren C. Group report: Mercury. En: Hutchinson TW, Meema LM, eds. *Led, mercury, cadmium and arsenic in the environment*, New York: John Wiley;1987:15-34.
4. Porvari P. Development of fish mercury concentrations in Finnish reservoirs from 1979 to 1994. *Sci Total Environ* 1998;213(1-3):279-90.
5. WHO. Metilmercurio. *Environ Health Criteria* 1990;101:100.
6. Dorea J, Moreira MB, East G, Barbosa AC. Selenium and mercury concentrations in some fish species of the Madeira River Amazon Basin, Brazil. *Biol Trace Elem Res* 1998;65(3):211-20.
7. Akagi H, Grandjean P, Takizawa Y, Weihe P. Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. *Environ Res* 1998;77(2):98-103.
8. Harada M, Nakanishi J, Konuma S, Ohno K, Kimura T, Yamaguchi H, et al. The present mercury contents of scalp hair and clinical symptoms in inhabitants of the Minamata area. *Environ Res* 1998;77(2):160-4.
9. WHO. *Environmental Health Criteria I: Mercury*. Geneva: World Health Organization; 1976;:132.
10. Shenker BJ, Gu TL, Shapiro IM. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ Res* 1998;77(2):149-59.
11. Mckeo, Eyssen GE, Ruedy J, Neims A. Methylmercury exposure in Northern Quebec. II Neurological findings in children. *Am J Epidemiol* 1983;118:470-9.
12. WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva: World Health Organization;1986b;Series 776.
13. OMS, FAO. Identificación de otras especies de peces depredadores en relación con los niveles de referencia del CODEX para el metilmercurio en el pescado. 24 Reunión. Comité del CODEX sobre Aditivos Alimentarios 1992 Marzo 23-28;parte I.
14. WHO. Metilmercurio. *Environ Health Criteria* 1990;19-23.
15. Methylmercury in fish and shellfish rapid gas chromatographic method. *AOAC* 1987;70:24.

Recibido: 9 de diciembre de 1999. Aprobado: 6 de enero del 2000.

Lic. *Luisa O. Vega Bolaños*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta No. 1158, Municipio Centro Habana, CP 10300, Ciudad de La Habana, Cuba.