

Validación de un método de espectroscopía de absorción atómica con vapor frío e inyección de flujo para la medición de mercurio total en productos de la pesca

Carbajo-Otero A.¹, Lozano-Benito D.², Velo-Méndez JM.³, Martín-Touset ML.⁴, Zamora-Benito A.⁵

Sanid. mil. 2023; 79 (4): 226-233, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Introducción: el mercurio (Hg) se acumula en las grandes especies predatoras de los ecosistemas marinos, como el atún, el pez espada o los tiburones.

Objetivo: validar, mediante adiciones, un método de espectroscopía de absorción atómica con vapor frío e inyección de flujo para la medición de Hg total en productos de la pesca.

Material y métodos: se analizaron dieciocho muestras de diferentes productos de la pesca, adicionándolas a cuatro rangos: bajo (0,1 mg/kg); intermedio (0,5 y 1,0 mg/kg) y alto (2,0 mg/kg). Estas se digirieron en horno microondas y se analizaron con un espectrómetro de absorción atómica.

Resultados: la variedad de matrices y los buenos resultados de exactitud y de precisión confirmaron la selectividad del método. El rango de trabajo se estableció entre 0,10-0,32 mg/kg de Hg en muestra, fijándose el límite de cuantificación en 0,10 mg/kg. Todas las rectas de calibración cumplieron el modelo de regresión lineal con significación estadística ($p < 0,05$). La veracidad fue del 4,28 %; 3,20 %; 12,28 % y 0,84 % para los rangos de 0,1 mg/kg; 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg, respectivamente. La recuperación promedio fue del 102,54 %. Los valores de reproducibilidad Horrat (Horrat_R) fueron 0,41; 0,30; 0,37 y 0,66 y los valores de repetibilidad Horrat (Horrat_r) 0,48; 0,35; 0,11 y 0,47 para los rangos de adición de 0,1 mg/kg; 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg, respectivamente. Los valores de incertidumbre relativa en cada rango fueron inferiores al 25 %.

Conclusión: nuestro método fue validado al cumplir los requisitos legales y los criterios de aceptación fijados previamente.

PALABRAS CLAVE: validación, espectroscopía, mercurio, productos de la pesca.

Validation of a cold vapor atomic absorption spectroscopy method with flow injection for the measurement of total mercury in fishery products

SUMMARY

Introduction: mercury (Hg) accumulates in large predatory species in marine ecosystems, such as tuna, swordfish, or various sharks species.

Objective: to validate, through additions, a method of atomic absorption spectroscopy with cold vapour and flow injection system for the measurement of total Hg in seafood products.

Material and methods: a total of 18 samples of different seafood products were analysed, spiking them to 4 ranges: low (0.1 mg/kg); intermediate (0.5 and 1.0 mg/kg) and high (2.0 mg/kg). These were digested in a microwave oven and analysed with an atomic absorption spectrometer.

Results: the diversity of the samples and the good accuracy and precision of the results confirmed the selectivity of the method. The working range of the method was established between 0.10-0.32 mg/kg of Hg in the sample and the limit of quantification at 0.10 mg/kg. All calibration lines fitted the linear regression model with statistical significance ($p < 0.05$). The trueness was 4.28%; 3.20 %; 12.28 % and 0.84% respectively for the 0.1 mg/kg; 0.5 mg/kg; 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg ranges, respectively. The average recovery of the method was 102.54 %. Horrat reproducibility (Horrat_R) values were 0.41; 0.30; 0.37 and 0.66 and Horrat repeatability (Horrat_r) values were 0.48; 0.35; 0.11 and 0.47 for the 0.1 mg/kg; 0.5 mg/kg; 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg spiking ranges, respectively in each case. The relative uncertainty values in each range were lower than the fixed limit of 25 %.

Conclusion: our method was validated by fulfilling the regulatory requirements and the previously established acceptance criteria.

KEYWORDS: Validation, Spectroscopy, Mercury, Seafood products.

1. Capitán veterinario Hospital General de la Defensa. Zaragoza.
2. Comandante veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.
3. Subteniente CGET. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.
4. Técnico Superior de Laboratorio. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.
5. Teniente coronel veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Madrid.

Dirección para correspondencia: Alberto Carbajo Otero. Hospital General de la Defensa Orad y Gajías. Vía Ibérica 1. 50009, Zaragoza Telf.: 976305000. Correo: acarot1@mde.es

Recibido: 20 de diciembre de 2022

Aceptado: 22 de noviembre de 2023

Doi: 10.4321/S1887-85712023000400004

INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg) muestra un efecto bioacumulativo en las especies predatoras de gran tamaño, sobre todo en ecosistemas marinos¹⁻³, mientras que en las cadenas tróficas terrestres no representa un papel importante⁴. En los seres vivos las formas orgánicas son mayoritarias, sobre todo el metilmercurio (Me-Hg), que es la especie dominante y la que genera los efectos adversos más graves², pudiendo representar entre el 80-100 % del Hg total en los peces^{3,5}.

El Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, así como sus modificaciones posteriores, establecen los contenidos máximos de Hg en productos de la pesca en 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1 mg/kg en función del género y de la especie⁶. Teniendo en cuenta el patrón español de consumo de pescado, la evidencia científica disponible y los límites máximos de Hg fijados en el citado Reglamento, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) actualizó en el año 2019 las recomendaciones de consumo de pescado respecto a su contenido en mercurio⁷.

Para determinar la concentración de Hg en productos de la pesca y comprobar su adecuación con los contenidos máximos señalados anteriormente, es necesario analizar las muestras en laboratorios especializados que cuenten con técnicas validadas o acreditadas. La validación del método analítico es un componente esencial para que un laboratorio consiga resultados analíticos fiables y comparables a los de otros laboratorios especializados, siendo además indispensable como paso previo a la acreditación del método. La validación se define como la confirmación, mediante examen y pruebas efectivas que aporten evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto⁸. Para ello, durante la ejecución de los ensayos se deben estudiar una serie de parámetros o características de desempeño.

El objetivo principal de este estudio ha sido validar, mediante adiciones, un método de espectroscopía de absorción atómica con vapor frío e inyección de flujo (CVAAS), para la medición de Hg total en productos de la pesca en el laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública (SAS) del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa (CEMILVETDEF). Asimismo, como objetivos secundarios se han marcado los siguientes: diseñar el plan de validación y establecer las características de desempeño, realizar los ensayos conforme a la metodología de los procedimientos internos del laboratorio, valorar la selectividad o especificidad del método y el posible efecto matriz, y valorar la validez de los resultados estableciendo la incertidumbre y los parámetros de control de calidad interno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se analizaron dieciocho muestras por duplicado de diferentes productos de la pesca, diecisiete alimentos procedentes de un mercado local y de raciones individuales de combate (RIC), y un material de referencia certificado (MRC) de músculo de pescado liofilizado (ERM-BB422). Los ensayos se realizaron en trece días distintos, por tres analistas diferentes y adicionando las muestras a cuatro rangos organizados en tres niveles: nivel bajo (rango 0,1 mg/kg); nivel intermedio (rangos 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg) y nivel alto (rango 2,0 mg/kg). En la tabla 1 se muestra la distribución de muestras, de analistas y de rangos de adición del plan de validación.

La metodología de trabajo se basó en los procedimientos internos operativos PTA-BR-023 (digestión ácida de las muestras) y PTA-BR 024 (determinación de mercurio en pescados y productos de la pesca por CVAAS), este último basado en la norma UNE-EN 13806:2002. Determinación de mercurio por CVAAS tras digestión bajo presión⁹.

Día	Analista	Muestra	Rangos de validación (mg/kg)			
			0,1	0,5	1,0	2,0
1	1	Conserva de sardinas	X			X
2	2	Dorada	X	X		
3	3	Emperador		X	X	
		Salmón al curry	X			
4	1	Salmón al curry				X
		Calamar	X	X		
5	2	Gamba	X		X	
6	3	Anchoas			X	X
7	2	Atún en conserva			X	
8	3	Atún en conserva				X
		Dorada	X		X	
9	1	Pulpo conserva		X		
		Mojama				X
10	3	Calamar		X		
		Mejillón	X		X	
11	1	Pulpo conserva	X	X	X	X
12	2	Salmón curry		X		X
13	1	<i>ERM-BB422 (Fish muscle)</i>		<i>0,601</i>		
Total de ensayos/rango			8	7 + 1	7	7

En cursiva el MRC liofilizado de músculo de pescado.

Tabla 1. Relación de muestras ($n = 18$), analistas ($n = 3$), días ($n = 13$) y rangos de adición ($n = 4$) durante el plan de validación.

Preparación de la muestra

Se separaron las partes comestibles de cada producto de la pesca y posteriormente se homogeneizaron en una picadora Moulinex®. Seguidamente, en un tubo de teflón previamente tarado, se pesó con balanza de precisión (AND HR-202i) la cantidad máxima de 3,0 g para muestras húmedas y de 1,0 g para muestras secas (MRC ERM-BB422).

Posteriormente, se añadieron 5,0 ml de ácido nítrico concentrado (ácido nítrico 65 %, Suprapur® para análisis de trazas, Supelco®) y 2,0 ml de peróxido de hidrógeno al 6 % (por dilución del peróxido de hidrógeno 30 % p/v, Panreac AppliChem®), y se realizaron las adiciones por duplicado con los rangos que se muestran en la tabla 1. También se preparó un blanco de reactivos (sin muestra de alimento) con las mismas cantidades de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno citadas anteriormente; y un control de calidad (QC) de una concentración de 10 ppb de una solución estándar comercial (Sigma-Aldrich 75111).

Las muestras se digirieron en horno microondas (Anton Paar Multiwave GO), con una rampa de calentamiento durante diez minutos hasta 180° C y manteniendo esta temperatura otros diez minutos. Posteriormente, se añadió 1,50 ml de HCl concentrado a cada digerido y se diluyó enrasando en matraz aforado a 50 ml con agua ultrapura para obtener la muestra de análisis. Las muestras fortificadas a los rangos intermedio (0,5 y 1,0 mg/kg) y alto (2,0 mg/kg) se diluyeron 1:2, 1:4 y 1:10, respectivamente, con ácido nítrico al 10 %.

Procedimiento analítico

Antes de cada ensayo se realizó una recta de calibrado empleando un blanco patrón y cuatro soluciones patrón (1 ppb, 5 ppb, 10 ppb y 20 ppb) a partir de una solución de Hg trazable de 1.000 ppm (Panreac AppliChem®). Los ensayos se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, AAnalyst 200) con auto muestreador (Perkin Elmer AS-90) y sistema de inyección de flujo (Perkin Elmer FIAS 100).

Características de desempeño incluidas

Selectividad/especificidad

Se seleccionaron diferentes tipos de productos de la pesca representativos de entre los más consumidos en las instalaciones alimentarias militares (IAM). Asimismo, se consideraron matrices que por su composición pudieran presentar interferencias o efecto matriz.

Rango lineal e intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo del instrumento obtenido con el blanco patrón y los cuatro patrones de calibración de 1, 5, 10 y 20 ppb, que se correspondieron con un rango lineal en muestra de 0,016-032 mg/kg, se evaluó con: la inspección visual de la recta (comprobación de los valores de la pendiente y de intersección en el eje de ordenadas); con el coeficiente de determinación ($R^2 \geq 0,995$); a través de la desviación estándar relativa (RSD) calculada por el *software* a partir de las tres lecturas de cada patrón de calibración ($RSD \leq 15$ % para 1 ppb y ≤ 10 % para los otros tres puntos de la recta); el coeficiente de linealidad de la pendiente (C_m) y el valor de la F de

Fisher obtenidos del análisis de regresión del programa Microsoft Excel mediante las siguientes ecuaciones:

$$C_m = \left(1 - \frac{S_m}{m}\right) \cdot 100 \quad S_m = \frac{S_{res}}{\sqrt{S_{xx}}} \quad S_{res} = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 \cdot S_{xx}}{N - 2}} \quad F = \frac{SS_{regr} / gl}{SS_{res} / gl}$$

Donde,

C_m = coeficiente de linealidad de la pendiente. S_{res} = desviación estándar alrededor de la regresión. S_m = desviación estándar de la pendiente, m = valor de la pendiente. S_{xx} = desviación estándar de los residuales de x . S_{yy} = desviación estándar de los residuales de y . N = número de puntos de la recta de calibración. F = valor F de Fisher. SS_{regr} = suma de cuadrados de la regresión. SS_{res} = suma de cuadrados de los residuales. gl = grados de libertad.

Para métodos de espectrofotometría se espera un $C_m \geq 98$ %. Los valores de F de Fisher observados (F_{ob}) deben ser superiores a los valores F tabulados (F_{tab}) que figuran en las tablas de distribución F para que la estimación de la regresión sea estadísticamente significativa^{10,11}.

Recuperación y veracidad

La exactitud del método se evaluó en cada ensayo mediante la recuperación de un QC con una concentración conocida (10 ppb). Adicionalmente, se evaluó la recuperación de un MRC (ERM-BB422: 0,601 0,030 mg/kg). En ambos casos se calculó el cociente entre el valor obtenido y el valor esperado, multiplicado por cien. La veracidad del método se evaluó con el resultado medio obtenido de cada par de duplicados en las muestras adicionadas para cada rango de validación, con respecto al valor de referencia, de la siguiente manera.

$$Veracidad = \left(\frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}}\right) \cdot 100$$

Donde,

x = Valor obtenido. x_{ref} = Valor esperado.

Para verificar los resultados de exactitud de las muestras adicionadas, se calculó el índice de compatibilidad (IC) para cada rango de adición, siguiendo la ecuación que se representa en el apartado de incertidumbre. Un valor ≥ 2 es indicativo de la presencia de diferencias significativas entre el valor medio de los resultados y el valor de referencia, por lo que se deberá introducir un valor de incertidumbre debida la corrección en el cálculo de esta.

El criterio interno de aceptación fue el de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC), cuyos valores de recuperación oscilan entre ± 20 %¹¹.

Precisión

Todas las muestras adicionadas se estudiaron en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad intralaboratorial (precisión intermedia).

Condiciones de repetibilidad (r), se calculó la concentración media, la desviación estándar (S_r), la RSD_r y el valor Horrat_r (Horwitz ratio). La RSD_r se obtuvo al dividir la S_r entre el valor medio de los resultados y multiplicar por cien. Para calcular Horrat_r se dividió la RSD_r entre la $RSD_{Horwitz}$, cuyo resultado se extrajo al aplicar la ecuación Horwitz modificada utilizando la hipótesis $r = 0,66R$ ($2C^{-0,15}$, donde C es la fracción de masa expresada

Validación de un método de espectroscopía de absorción atómica con vapor frío e inyección de flujo...

como potencia de base 10)¹²⁻¹⁴. Para el rango de adición de 0,10 mg/kg se empleó una RSD_{Horwitz} de referencia igual al 22 % (14,52 % siguiendo la hipótesis 0,66R), según lo dispuesto en el Reglamento (CE) N.º 333/2007¹⁴ y sus modificaciones.

Condiciones de reproducibilidad intralaboratorial (R), se procedió de la misma forma bajo condiciones de reproducibilidad, calculando la concentración media, la S_R, la RSD_R y el valor Horrat_R.

Límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD)

El Reglamento (UE) 2016/582¹⁵, que modifica el Reglamento (CE) N.º 333/2007¹⁴, establece un LOQ ≤1/5 del nivel máximo y un LOD de 1/3 del LOQ, cuando el nivel máximo de mercurio sea ≥0,100 mg/kg. En nuestra validación se fijó un LOQ de 0,10 mg/kg, como el método es cuantitativo no fue necesario fijar el LOD, aunque sus valores se emplearon para establecer la incertidumbre estándar máxima (U_p).

Incertidumbre

Los resultados analíticos se deben expresar como X ± U, donde X es el resultado analítico y U la incertidumbre ampliada o expandida de medida, aplicando un factor de cobertura (k) sobre la incertidumbre típica combinada (u_c), con un nivel de confianza de, al menos, el 95 %¹⁴. Para estimar la incertidumbre se ha empleado el modelo de caja negra con el cálculo previo del IC, de la siguiente forma:

$$U_{\text{método}} = \sqrt{U_p^2 + U_{VM}^2 + U_M^2 + U_{\text{corrección}}^2}$$

$$IC = \frac{|V_c - V_M|}{\sqrt{U_p^2 + \left(\frac{S_R}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

Donde,

U_{método} = Incertidumbre típica combinada del método, requiere multiplicar por k para obtener la incertidumbre expandida. U_p = Incertidumbre del patrón. U_{VM} = Incertidumbre del valor medio. U_M = Incertidumbre de la reproducibilidad de cada muestra. U_{Correc.} = Incertidumbre debida a la corrección. V_c = Valor del MRC o del rango de adición. V_M = Valor medio de los ensayos en condiciones de reproducibilidad. S_R = Desviación estándar de la media de los resultados. n = número de repeticiones.

Los distintos componentes de la U_{método} se obtuvieron de la siguiente manera:

La U_p se calculó como u_{adición}:

$$u_{\text{adición}} = \frac{C_{pc} \cdot P_o}{P_f} \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{pc}}{C_{pc}}\right)^2 + \left(\frac{u_{po}}{C_{po}}\right)^2 + \left(\frac{u_{pf}}{P_f}\right)^2}$$

Donde,

C_{pc} = concentración del patrón utilizado para realizar las adiciones (en nuestro caso la solución intermedia de 10 ppm). P_o = peso o volumen de la alícuota del patrón añadido. P_f = Peso o volumen de la muestra diluida (50 ml). U_{pc} = incertidumbre de la concentración del patrón utilizado para realizar las adiciones (proviene del certificado del MRC). U_{po} = incertidumbre del peso o del volumen de la alícuota (lo aporta el certificado de calibración de la micropipeta

empleada). U_{pf} = incertidumbre del peso o del volumen final de la muestra (lo aporta el valor de la incertidumbre de los matraces).

La U_{VM} se calculó al dividir S_R entre la raíz cuadrada del número de repeticiones en reproducibilidad del rango de adición (siete u ocho).

La U_M se calculó al dividir S_R entre la raíz cuadrada del número de repeticiones en reproducibilidad de cada muestra (uno).

La U_{corrección} se calculó al dividir el sesgo (diferencia entre el valor de referencia y el valor medio de los resultados) entre la razón cuadrada de tres (ya que el error sigue una distribución rectangular).

Se han calculado 4 valores de incertidumbre expandida (U), una para cada nivel de fortificación. Para ello se calculó la U_{método} en cada rango y, posteriormente, se multiplicó cada una por su respectivo factor de cobertura (con un nivel de confianza aproximado del 97,5 %). Para obtener el valor de k (factor de cobertura) se calcularon los grados efectivos de libertad (gl) en cada rango de adición y, posteriormente, se consultó la tabla de t de Student. Los gl del patrón y de la corrección son infinitos, por lo que ambos componentes equivalen a 0.

$$GL = \frac{U_{\text{método}}^4}{\frac{U_p^4}{gl} + \frac{U_{VM}^4}{gl} + \frac{U_M^4}{gl} + \frac{U_{\text{corrección}}^4}{gl}}$$

También se comprobó la adecuación al uso previsto mediante el cálculo de la U_p en cumplimiento del Reglamento (CE) N.º 333/2007¹⁴ y sus sucesivas modificaciones. Finalmente, se calculó la incertidumbre expandida relativa (denominada I) con relación a los valores promedios de los ensayos en cada nivel de adición (U expandida/valor medio x cien).

RESULTADOS

Selectividad/especificidad

Entre las matrices analizadas se seleccionaron pescados blancos y azules por su diferencia en contenido graso, así como anchoas del cantábrico y mojama por su alto contenido en sales. También se tuvo en cuenta la inclusión de pescados con baja y alta presencia teórica de Hg y otros grupos de productos de la pesca como crustáceos, cefalópodos y bivalvos contemplados en el Reglamento (CE) N.º 1881/2006⁶.

En ninguna de las muestras analizadas se observó efecto matriz en cuanto a los resultados de precisión y exactitud. Además, la comparación de los porcentajes de recuperación de los QC con los de las muestras adicionadas nos permitió constatar su similitud y descartar la presencia de efecto matriz. La variedad de matrices y los buenos resultados obtenidos de exactitud y precisión confirmaron la selectividad del método, sin que se detectaran interferencias a declarar ni efecto matriz.

Rango lineal e intervalo de trabajo

Los patrones de calibración y el método empleado nos permitieron establecer un rango lineal en muestra de 0,016-0,32 mg/kg y un

intervalo de trabajo de 0,10-0,32 mg/kg, cuyo límite inferior vino definido por el LOQ, nivel a partir del cual se demostró la precisión y la exactitud del método. Para los rangos de validación en los que se emplearon diluciones, el equipo calculó la concentración de analito en la muestra aplicando los factores de dilución apropiados.

La curva de calibración, obtenida trazando el área del pico de los cuatro patrones de calibración y del blanco de reactivos, expresada en unidades de absorbancia (eje y) y de concentración (eje x), se

realizó a diario antes de comenzar los ensayos (figura 1). La observación de la recta calibración constituyó la primera evaluación de la linealidad de esta.

En la tabla 2 se muestran los valores de pendiente, de intersección en eje de ordenadas, de R^2 , de C_m , de RSD y de F en las distintas rectas. Todas las rectas cumplieron con el criterio cualitativo ($R^2 \geq 0,995$) y con los cuantitativos (RSD ≤ 15 % para el LOQ y 10 % para el resto de los puntos; $C_m \geq 98$ %; valor $F_{ob} > F_{tab}$).

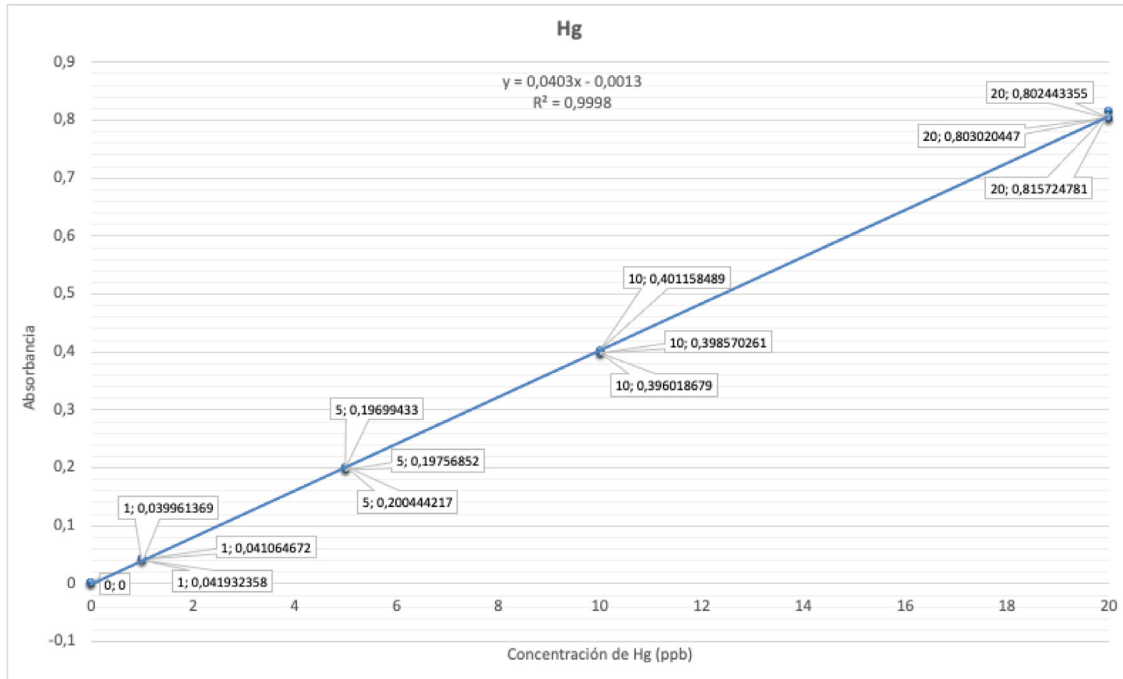


Figura 1. Recta de calibrado siguiendo el modelo de regresión lineal simple ($y = mx + b$) con 4 patrones y un blanco de reactivos. Coeficiente de determinación igual a 0,9998. En cada patrón se muestran las tres lecturas de absorbancia tomadas por el equipo

Día	Pendiente	Intersección eje y	R^2	C_m (%)	Valor F_{obs}	Patrones de calibración (ppb)			
						1	5	10	20
1	0,0406	-0,0003	0,9995	98,68	19.062	0,907	1,068	1,841	0,037
2	0,0425	0,0011	0,9998	99,30	71.246	0,536	1,577	0,969	0,139
3	0,0379	-0,0038	0,9998	99,28	69.482	4,634	0,167	0,828	0,312
4	0,0414	0,0022	0,9998	99,06	43.825	5,993	0,003	1,326	0,150
5	0,0440	0,0020	0,9990	97,82	8.343	1,592	1,859	2,483	0,496
6	0,0381	-0,0000	0,9999	99,68	100.11	5,233	0,158	0,184	0,629
7	0,040	-0,0075	0,9997	98,79	23.796	9,792	0,715	1,00	0,444
8	0,040	-0,0086	0,9996	98,83	27.375	6,315	0,953	0,501	0,079
9	0,040	-0,0021	0,9998	99,42	41.522	4,380	0,844	0,556	0,197
10	0,041	-0,0036	0,9998	99,43	79.330	2,635	1,541	0,353	0,118
11	0,040	-0,0056	0,9996	98,99	27.797	12,468	2,241	0,897	0,504
12	0,044	-0,0113	0,9992	98,10	11.457	12,245	5,174	1,007	0,306
13	0,040	-0,0044	0,9995	98,61	19.081	5,199	0,722	1,539	0,133

R^2 : coeficiente de determinación. C_m : coeficiente de linealidad de la pendiente. F_{obs} : valor observado prueba de Fisher. RSD: desviación estándar relativa.

Tabla 2. Parámetros asociados a las distintas rectas de calibrado durante los ensayos ($n = 13$).

Recuperación y veracidad

En la tabla 3 se resumen los valores de cada ensayo, extraídos del promedio de cada par de duplicados en los respectivos niveles de adición (una vez sustraída la cantidad correspondiente al blanco de muestra), así como la media del conjunto de resultados en cada nivel

de adición y su correspondiente resultado de veracidad. El promedio de la recuperación de los QC (valor esperado 10 ppb) incluidos en cada ensayo fue de $101,54\% \pm 3,40$. El valor obtenido en el análisis del MRC ERM-BB422 fue de 0,627 mg/kg de Hg y el valor asignado del certificado 0,601 mg/kg, por lo que su exactitud fue del 4,32 % y su recuperación del 104,32 %.

Rango (mg/kg)	Resultados								Media	Veracidad
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0,1	0,104	0,102	0,106	0,122	0,112	0,088	0,102	0,100	0,104	4,28
0,5	0,493	0,484	0,483	0,497	0,483	0,432	0,510	-	0,483	3,20
1,0	0,938	0,876	0,887	0,939	0,834	0,879	0,789	-	0,877	12,28
2,0	1,970	1,881	1,781	2,082	2,110	1,772	2,288	-	1,983	0,84

Tabla 3. Resumen de los resultados de veracidad en las muestras adicionadas durante los ensayos.

Precisión

La tabla 4 presenta, para los cuatro rangos de validación, el valor medio de los resultados, la media de las RSD de las muestras anali-

zadas en condiciones de repetibilidad (por duplicado) y de reproducibilidad, así como la RSD_R y la RSD_r , calculadas con la ecuación de Horwitz y los respectivos valores de Horrat.

Rango mg/kg	Valor medio	RSD_R observada	RSD Horwitz	RSD_r observada	2/3 RSD Horwitz	Horrat _R	Horrat _r
0,1	0,104	9,10	22*	7,03	14,52	0,41	0,48
0,5	0,484	5,34	17,85	4,17	11,78	0,30	0,35
1,0	0,877	6,10	16,32	1,19	10,77	0,37	0,11
2,0	1,983	9,54	14,43	4,46	9,53	0,66	0,47
Promedio RSD		7,52		4,21	Promedio Horrat	0,43	0,35

* Valor según la letra f del apartado C.3.3.1 del Reglamento (CE) N° 333/2007¹⁴. RSD_R : desviación estándar relativa (%) en condiciones de reproducibilidad. RSD_r : desviación estándar relativa (%) en condiciones de repetibilidad.

Tabla 4. Precisión del método para cada rango de validación.

LOQ Y LOD

En este estudio las especies de pescado analizadas presentaron unos límites legales máximos de entre 0,50-1,0 mg/kg (recientemente se ha reducido a 0,30 mg/kg en algunas especies²⁹), por lo que nuestros límites teóricos fueron fijados entre 0,10-0,20 mg/kg para el LOQ y entre 0,03-0,06 mg/kg para el LOD, en ambos casos referidos a la muestra.

Incertidumbre

El resultado de la incertidumbre siempre se debe estudiar con relación a la incertidumbre expandida (o en su forma deri-

vada, la incertidumbre relativa), ya que es la que proporciona un intervalo más certero en el que se encontrará, con mayor probabilidad, el valor real de la medición. Los resultados de la incertidumbre combinada y de la incertidumbre expandida de nuestros resultados, hallados por el método de caja negra para cada rango de validación, así como la incertidumbre relativa, se muestran en la tabla 5, encontrándose por debajo de los límites legales. La contribución de la incertidumbre asociada al patrón de calibración, calculada como $u_{\text{adición}}$ fue despreciable, arrojando valores de 6,04306E-05 mg/kg; 3,42E-04 mg/kg; 3,47542E-05 mg/kg y 3,69245E-05 mg/kg, para los rangos de adición de 0,1 mg/kg; 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg, respectivamente.

Rango (mg/kg)	IC	u (mg/kg)	gl	k	U (mg/kg)	I (%)
0,1	1,27	0,010	8	2,3060	0,023	22,26
0,5	1,63	0,027	7	2,3646	0,065	13,49
1,0	6,07	0,091	49	2,0096	0,183	20,87
2,0	0,23	0,202	7	2,3646	0,478	24,11

IC: índice de compatibilidad. u: incertidumbre combinada. gl: grados de libertad. k: factor de cobertura. U: incertidumbre expandida. I: Incertidumbre expandida relativa

Tabla 5. Valores de incertidumbre para los distintos rangos de validación.

DISCUSIÓN

Existe cierta discrepancia al valorar el impacto del proceso culinario en la concentración y en la especiación del Hg en los alimentos. En algunos casos se considera que no hay diferencias significativas entre las muestras crudas y cocinadas¹⁶⁻¹⁸ y en otros los niveles se incrementaron o incluso se redujeron¹⁹⁻²¹. Debido a ello, también se incluyeron productos con diferentes tratamientos culinarios o tecnológicos (tratamientos térmicos, salazón, congelación, frescos), incluyendo platos preparados y conservas de RIC por ser los más consumidos en IAM, ejercicios y maniobras.

Las concentraciones de los patrones de calibración que hemos empleado se asemejan a los de otros autores²²⁻²⁴. En otros casos los patrones empleados tuvieron concentraciones considerablemente más bajas al pesar menos cantidad de muestra²⁵.

Los porcentajes de recuperación y de veracidad de todas las adiciones, de los QC y del MRC ERM-BB422 cumplieron con el criterio de aceptación establecido de $\pm 20\%$ (recuperación 80-120 %), en consonancia con lo descrito en otros estudios similares^{22,26,27}.

Las RSD calculadas fueron inferiores a las estimadas con la ecuación Horwitz, tanto en condiciones de reproducibilidad como de repetibilidad, demostrando la precisión de nuestro método. Además, siguiendo las recomendaciones del Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA), de unos valores Horrat, y $\text{Horrat}_R < 1,5$ para la repetibilidad y la reproducibilidad, respectivamente; nuestros resultados cumplieron estos criterios demostrando una excelente precisión, tanto global como en cada rango de adición, asemejándose a los de otros trabajos similares²⁸.

Pudimos constatar la idoneidad de nuestro método al situarse ambos LOQ dentro de nuestro rango de trabajo y, más concretamente, al coincidir el menor valor de LOQ con el rango de adición más bajo (0,10 mg/kg).

El cuarto nivel de adición (2,0 mg/kg) nos permitió sobrepasar el máximo nivel legal permitido (1,0 mg/kg) incluso sumando al mismo el aporte de la incertidumbre del método para dicho rango, por lo que nuestro método fue capaz de asegurar la certidumbre de los resultados analíticos en el rango paramétrico legal. Los resultados obtenidos nos permitieron declarar una incertidumbre relativa del 25 % para todo el método, en cumplimiento de los requisitos del Reglamento (CE) N.º 333/2007¹⁴.

El método para la cuantificación de mercurio total, siguiendo procedimientos internos basados en la norma UNE-EN 13806:2002, ha demostrado una gran selectividad para cualquier producto de la pesca, independientemente de su forma de presentación o tratamiento. Además, los resultados obtenidos para

todas las características de desempeño confirman su validación. Consecuentemente, se establecen los siguientes criterios de control de calidad interno: exactitud $\pm 20\%$; precisión en condiciones de repetibilidad: Horrat_R inferior a 1 y coeficiente de variación máximo del 9 %; precisión en condiciones de reproducibilidad: Horrat_R inferior a uno y coeficiente de variación máximo del 14 %; e incertidumbre relativa del 25 % para todo el rango de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alizada N, Malik S, Muzaffar SB. Bioaccumulation of heavy metals in tissues of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) from the UAE coast, Arabian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*. 2020;154:111033.
- Liao W, Wang G, Zhao W, Zhang M, Wu Y, Liu X, et al. Change in mercury speciation in seafood after cooking and gastrointestinal digestion. *Journal of Hazardous Materials*. 2019;375:130-7.
- EFSA Scientific Committee, 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal* 2015;13(1):3982, 36 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3982 Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3982>.
- Hajeb P, Sloth J, Shakibazadeh S, Mahyudin NA, Afsah Hejri L. Toxic Elements in Food: Occurrence, Binding, and Reduction Approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13.
- Schmidt L, Bizzi CA, Duarte FA, Muller EI, Krupp E, Feldmann J, et al. Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish. *Food Control*. 2015;47:413-9.
- Unión Europea. Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L 364/5*, 20 de diciembre de 2006, pp 5-24.
- Farré Rovira, R., Cameán Fernández, A.M., Vidal Carou, M.d.C., López-Santacruz Serraller, A., Teruel Muñoz, V. y Teseo Canales, E. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 13, 29-36.
- Organización Internacional de Estandarización. ISO 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Comité Europeo de Normalización. EN 13806:2002. Productos alimenticios - Determinación de mercurio por espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS) tras digestión bajo presión.
- Skoog DA WD, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. Novena Edición. Cengage Learning. 2014.A
- AOAC International, "AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals," Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 2002.
- Horwitz W, Albert RH. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*. 2006;89 4:1095-109.

13. Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry*. 1982;54(1):67A-76A.
14. Unión Europea. Reglamento (CE) 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 88, pp. 29-38.
15. Unión Europea. Reglamento (UE) 2016/582 de la Comisión, de 15 de abril de 2016, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 333/2007 en lo que se refiere al análisis del arsénico inorgánico, el plomo y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, y a determinados criterios de funcionamiento aplicables al análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 101, pp. 3-6.
16. Perelló G, Martí-Cid R, Llobet JM, Domingo JL. Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods. *J Agric Food Chem*. 2008;56(23):11262-9.
17. Morgan JN, Berry MR, Graves RL. Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 1997;7(1):119-33.
18. Gremiachikh VA, Tomilina, II, Komov VT. [Impact of cooking on the content of fish mercury]. *Gig Sanit*. 2007(6):64-7.
19. Burger J, Dixon C, Boring CS, Gochfeld M. Effect of deep-frying fish on risk from mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 2003;66(9):817-28.
20. Costa S, Afonso C, Bandarra NM, Gueifão S, Castanheira I, Carvalho ML, et al. The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): How culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;60:277-85.
21. Mieiro CL, Coelho JP, Dolbeth M, Pacheco M, Duarte AC, Pardal MA, et al. Fish and mercury: Influence of fish fillet culinary practices on human risk. *Food Control*. 2016;60:575-81.
22. León Perez DE, Hernández Ángel ML, Salazar Gomez MA, Jiménez Cartagena C. Validation of an analytical method for the determination of mercury in shrimp and fish. *Revista Lasallista de Investigación*. 2014;11:11-7.
23. Damin IC, Santo MA, Hennigen R, Vargas DM. Validation of a hydride generation atomic absorption spectrometry methodology for determination of mercury in fish designed for application in the Brazilian national residue control plan. *J Environ Sci Health B*. 2013;48(12):1103-11.
24. Neto APN, Costa L, Kikuchi ANS, Furtado DMS, Araujo MQ, Melo MCC. Method validation for the determination of total mercury in fish muscle by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2012;29(4):617-24.
25. Yáñez-Jácome GS, Romero-Estévez D, Navarrete H, Simbaña-Farinango K, Vélez-Terreros PY. Optimization of a Digestion Method to Determine Total Mercury in Fish Tissue by Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrophotometry. *Methods and Protocols*. 2020;3(2):45.
26. Perring L, Andrey D, Spectroscopy A. Optimization and Validation of Total Mercury Determination in Food Products by Cold Vapor AAS: Comparison of Digestion Methods and With ICP-MS Analysis. *Atomic Spectroscopy*. 2001;22:371-8.
27. Elezz AA, Mustafa Hassan H, Abdulla Alsaadi H, Easa A, Al-Meer S, Elsaid K, et al. Validation of Total Mercury in Marine Sediment and Biological Samples, Using Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry. *Methods and Protocols*. 2018;1(3):31.
28. Fernández ZH, Valcárcel Rojas LA, Álvarez AM, Estevez Álvarez JR, Araújo dos Santos J, González IP, et al. Application of Cold Vapor-Atomic Absorption (CVAAS) Spectrophotometry and Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry methods for cadmium, mercury and lead analyses of fish samples. Validation of the method of CVAAS. *Food Control*. 2015;48:37-42.
29. Unión Europea. Reglamento (UE) 2022/617 de la Comisión, de 12 de abril de 2022, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de mercurio en el pescado y la sal. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 115, pp. 60-63.