

# Especiación de Mercurio en Vacunas Pediátricas mediante Cromatografía Multijeringa Acoplada a Espectroscopia de Fluorescencia Atómica

J. L. Guzmán-Mar<sup>1\*</sup>, L. Hinojosa-Reyes<sup>1</sup>, E. Ruiz-Ruiz<sup>1</sup>, A. Hernández-Ramírez<sup>1</sup> y V. Cerdà-Martín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, C.P. 64570. Monterrey, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Universidad de las Islas Baleares, Departamento de Química, Laboratorio de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, E-07122, Palma de Mallorca, España.

\*E-mail: jorge.guzmanmr@uanl.edu.mx

Recibido 25 de abril de 2013, Aceptado 30 de mayo de 2013

## Resumen

Un nuevo enfoque del análisis automático para la especiación de compuestos de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), metil-mercurio ( $\text{MeHg}^+$ ) y etil-mercurio ( $\text{EtHg}^+$ ) usando la cromatografía multijeringa (MSC), acoplado a un detector específico como es la espectrometría de fluorescencia atómica por vapor frío (CV-AFS) se desarrolló y aplicó en este trabajo al análisis de vacunas pediátricas. La separación de especies de mercurio se llevó a cabo en una columna RP C18 monolítica utilizando un programa de elución multi-isocrática. Las especies de mercurio eluidas se oxidaron bajo radiación UV post-columna y después fueron reducidas con  $\text{SnCl}_2$  en un medio ácido. Posteriormente, el mercurio elemental generado se separó de la fase líquido-gas con una corriente de gas argón y transportado al analizador atómico CV-AFS. Bajo las condiciones experimentales óptimas, los límites de detección obtenidos son 0.03, 0.11 y 0.09  $\mu\text{g L}^{-1}$  para  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{EtHg}^+$ , respectivamente. La desviación estándar relativa (RSD,  $n = 6$ ) para las concentraciones de las especies a 3, 6 y 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{EtHg}^+$  (respectivamente) variaron entre 2.4 y 4.0%. El sistema MSC-CV-AFS propuesto permite una frecuencia de muestreo alta y bajos costos de operación e instrumentación. El método desarrollado fue validado con el análisis del material de referencia certificado DORM-2 (músculo de cazón), y se aplicó en la determinación de especies de mercurio en vacunas pediátricas.

**Palabras clave:** Cromatografía Multijeringa (MSC), Espectrometría de Fluorescencia Atómica con generación de Vapor Frío (CV-AFS), Especies de mercurios, Columna monolítica.

## 1. Introducción

El mercurio es uno de los metales pesados más tóxicos. Muchas de sus especies son fácilmente liberadas al medio ambiente debido a su alta volatilidad y movilidad. Por lo tanto, diferentes formas de mercurio pueden acumularse en animales y plantas, y también pueden entrar en el cuerpo humano a través del ciclo de los alimentos, lo que resulta en un daño del sistema nervioso central [1, 2]. Las especies orgánicas como el metil-mercurio ( $\text{MeHg}^+$ ) y etil-mercurio ( $\text{EtHg}^+$ ) presentan una alta toxicidad. La exposición a éstas especies de mercurio, se produce principalmente a través del consumo de pescado contaminada ( $\text{MeHg}^+$ ) y como resultado de la inmunización con vacunas que contienen timerosal ( $\text{EtHg}^+$ ) donde la población más susceptible son los niños pequeños debido a su menor peso y por estar en desarrollo su sistema nervioso central (especialmente menores de 2 años) [3]. El timerosal, cuyo nombre químico es tiosalicilato de etil-mercurio sódico contiene 49.6 % de mercurio [4]. El  $\text{EtHg}^+$  presenta acción antimicrobiana, por la que se ha utilizado desde los

años 30's en el proceso de fabricación de vacunas, para inactivar los gérmenes y como conservante para prevenir la contaminación fúngica y bacteriana, en la fase final de la producción [5].

Por lo anterior, el desarrollo de una metodología analítica para la especiación de mercurio en vacunas para infantes es de gran importancia para evaluar el contenido real de mercurio y sus formas químicas presentes.

La cromatografía en fase reversa basada en la introducción de un agente complejante tal como el 2-mercaptoetanol a la fase móvil con metanol y/o acetonitrilo como modificador orgánico es la alternativa más viable para la separación de las especies de mercurio [6-7]. La presencia de un agente quelante es necesaria para mejorar la separación cromatográfica y/o para evitar la adsorción de las especies de mercurio en la fase estacionaria. Algunos reportes sobre métodos por HPLC para la determinación de las especies de mercurio emplean columnas convencionales a base de partículas con fase estacionaria C18 unidos químicamente a la sílice porosa. Sin embargo, este material posee ciertas limitaciones cuando se

utilizan como fase estacionaria como son: una transferencia de masa lenta entre las fases móvil y estacionaria, y el aumento de la presión debido al empleo de velocidades de flujo elevadas [8]. Por lo tanto, el empleo de columnas monolíticas representa una atractiva opción. Las columnas monolíticas constan de una sola pieza con una estructura de poros bimodal (macroporos y mesoporos) que demuestra una estabilidad mecánica muy alta y largos tiempos de vida operativa [9, 10]. La compatibilidad de las columnas monolíticas de baja presión ha permitido el acoplamiento con sistemas en flujo como la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) [11], llamada cromatografía multijeringa (MSC) [12], constituye una excelente herramienta para lograr resultados similares a los reportados por HPLC, con la ventaja de ser capaz de trabajar a bajas presiones sin perder eficiencia y resolución. La técnica MSFIA presenta las siguientes características: una alta frecuencia de muestreo, la capacidad de dispensar simultáneamente los volúmenes exactos de la muestra y los reactivos, facilitando su mezcla; y la viabilidad del uso de disolventes orgánicos, [13-14]. Una ventaja adicional de la combinación de columnas monolíticas con el sistema multijeringa es la capacidad de desarrollar métodos cromatográficos multi-isocráticos, ya que las columnas monolíticas son más tolerantes al uso de diferentes fases móviles y éstas se equilibran más rápidamente [15]. Varios estudios han demostrado el gran potencial de la detección por espectrometría de fluorescencia atómica por vapor frío (CV-AFS) para el análisis de especies de mercurio. Además, los equipos de AFS son mucho más simples y los costos de mantenimiento son más bajos, por lo que esta técnica es adecuada para el análisis de rutina [16-17].

La aplicación de MSC acoplado a CV-AFS para el análisis de especiación de mercurio ha sido explotada por primera vez en este trabajo utilizando columnas de fase inversa C18 de tipo monolítico. La viabilidad de esta técnica híbrida para la especiación de mercurio en vacunas para infantes ofrece una excelente alternativa para conocer los niveles reales de mercurio a los cuales se encuentran expuestos los niños de nuestro País.

## 2. Parte experimental

### 2.1. Materiales y reactivos

Los reactivos químicos fueron grado analítico. El agua fue ultrapura (18.2 M $\Omega$ cm) purificada con un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.)

y se empleó para preparar todas las disoluciones. La solución estándar de 1000 mg L<sup>-1</sup> de mercurio inorgánico (Hg<sup>2+</sup>) en ácido nítrico al 2 mol L<sup>-1</sup> fue de Scharlab SL (Sentmenat, España). Cloruro de metil-mercurio (CH<sub>3</sub>HgCl, abreviado como MeHg<sup>+</sup>) fue adquirido en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y cloruro de etil-mercurio (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>HgCl, abreviado como EtHg<sup>+</sup>) fue adquirido en Supelco (PA, EE.UU.). Las disoluciones estándar de MeHg<sup>+</sup> y EtHg<sup>+</sup> (como Hg) se prepararon en metanol (Scharlab) y se almacenaron a 4°C en frascos de vidrio ámbar. Las soluciones de trabajo fueron preparadas diariamente y se obtuvieron por dilución de las disoluciones estándar con agua ultrapura. Acetonitrilo (Scharlab) fue utilizado como modificador orgánico de la fase móvil. La fase móvil contenía una disolución amortiguadora de 240 mM de acetato de amonio con 0.005% de 2-mercaptoetanol (Merck), a pH 6. La fase móvil se filtró a través (membrana nylon 0.45  $\mu$ m) y se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 15 min antes de su uso.

El agente reductor, 0.5% (p/v) de cloruro de estaño (II) en 1% (v/v) de HCl, se preparó diariamente disolviendo la cantidad requerida de SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck Pro análisis, máx. 0.000001% de Hg). El HCl (37%, grado reactivo) se adquirió de Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania).

### 2.2. Preparación de muestras

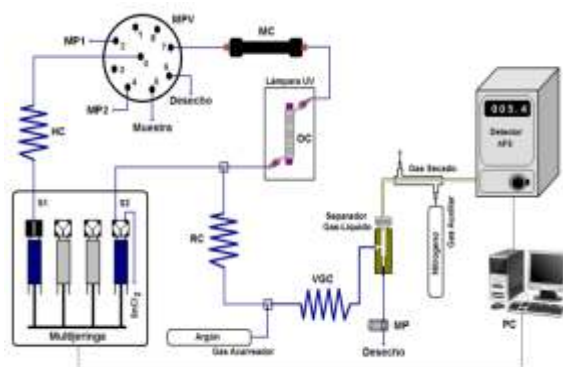
El material de referencia certificado DORM-2 (Músculo de Cazón) del Consejo Nacional de Investigaciones de Canadá (Ottawa, Ontario, Canadá) se preparó utilizando un método de extracción ácida [18]. Aproximadamente 0.25 g de muestra se pesó en un tubo de polietileno de 10 mL con tapa. Se adicionó la disolución extractante de 0.1% (v/v) de HCl, 0.1% (p/v) 2-mercaptoetanol y 0.15% (p/v) de KCl. La disolución resultante se agitó durante la noche (12h) o se sometió a extracción por ultrasonidos durante 30 min. Después, el sobrenadante se recogió por centrifugación a 3000 rpm durante aproximadamente 10 min. El sobrenadante se filtró antes del análisis. Los blancos reactivos se prepararon de igual manera.

La concentración total de mercurio en los extractos del material de referencia DORM-2 y las disoluciones de las vacunas pediátricas se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) (modelo 4110 ZL, Perkin-Elmer, Überlingen, Alemania). El análisis de especiación de mercurio se realizó por el sistema propuesto en este trabajo

MSC-CV-AFS. Para ambas técnicas las concentraciones se determinaron por el método de calibración externa.

### 2.3. Instrumentación y software

Un diagrama del sistema utilizado para el análisis MSC-CV-AFS de especiación de mercurio se presenta en la Figura 1. El sistema comprende una bureta multijeringa (BU-4-S, Crison Instruments, Alella, Barcelona, España) como unidad de propulsión con dos jeringas (Hamilton, Bonaduz, Suiza), una de 5 mL y otra de 10 mL. Una válvula de conmutación de tres vías (N-Research, Caldwell, NJ, EE.UU.) colocada en la cabeza de la jeringa S2, lo que permite el acceso al contenedor del reactivo reductor  $\text{SnCl}_2$  (posición Off) o dispensarlo al sistema para la reacción (posición On). Un conector de dos vías (Sciware, Palma de Mallorca, España) de Delrin® resistente a disolventes orgánicos. Un módulo de válvulas equipada con una válvula de selección de 8 puertos multicanal (MPV, Crison). El puerto central se conecta a la jeringa S1 a través de un espiral de carga (HC, 200 cm de longitud, 1.5 mm de diámetro interno (d.i.)), permitiendo la aspiración secuencial de la fase móvil 1 (MP1, puerto 2), fase móvil 2 (MP 2, puerto 4), la muestra (puerto 5) y la columna monolítica (MC) a través del puerto 7. El MPV canal 6 fue utilizada para los desechos. El sistema fue construido con tubería de politetrafluoroetileno (PTFE) 0.8 mm de d.i. (Omnifit, Cambridge, Reino Unido). El HC y el espiral de reacción para la generación del vapor frío (VGC, 1 m de longitud) fueron construidos con 1.5 mm de d.i.



**Figura 1.** Sistema MSC-CV-AFS para el análisis de especiación de mercurio. HC, espiral de carga; jeringas S1 y S2; MPV, válvula multicanal; MP1 y MP2, fases móviles 1 y 2; MC, columna monolítica; OC, espiral de oxidación; RC, espiral de reducción; VGC, espiral generador de vapor frío; y MP, micro-bomba.

La separación cromatográfica de las especies de mercurio se realizó en una columna monolítica Onyx™ C18 (50 mm x 4.6 mm, Phenomenex®, EE.UU.) con una guarda columna de 10 mm x 4.6 mm.

El sistema de oxidación post-columna constó de una lámpara de irradiación UV (8W, 254 nm, Zhenjiang, China) con un espiral de Teflón (OC, 0.8 mm d.i.) de 1 m de longitud. Un espiral de reducción (RC, 50 cm de longitud, 0.8 mm de d.i.), un separador gas-líquido (Perkin-Elmer modelo B0507959) se utilizaron para separar el vapor frío de mercurio generado. Una membrana de PTFE intercambiable (25 mm de d.i., 1  $\mu\text{m}$ , Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) colocada en la tapa del separador. La eliminación del exceso de líquido procedente del separador gas-líquido se controla a través de una micro-bomba solenoide (MP, Biochem válvula, Inc., Boonton, NJ). El módulo multijeringa (Palma de Mallorca, España) se conecta a la computadora mediante una interfase RS485/RS232. El vapor frío de mercurio elemental se purgó con una corriente de gas argón y se secó en una unidad de PermaPure® (Torms River, Nueva Jersey, EE.UU.) usando como gas de secado nitrógeno (170 mL  $\text{min}^{-1}$ ). Las condiciones experimentales para el sistema MSC-CV-AFS se presentan en la Tabla 1.

Un detector de Fluorescencia Atómica PS Analytical modelo 10.023 Merlín (PS Analítica, Reino Unido) se utilizó como un detector específico para mercurio. El control, adquisición de datos y el procesamiento se realizó con el software Autoanalysis v5.0 (Sciware, Palma de Mallorca, España). Los datos obtenidos se procesaron con el software Origin v6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.).

### 2.4. Procedimiento MSC-CV-AFS

El procedimiento completo consta de 10 pasos. La secuencia de funcionamiento incluye los detalles del movimiento de la bureta multijeringa, la posición de la micro-bomba, la válvula múlticanal, y los consumos de muestra, fases móviles y el agente reductor. Después de cargar un volumen definido de fase móvil 1 y la muestra (600  $\mu\text{L}$ ) en el HC, en procedimiento multi-isocrático se utilizó para la separación cromatográfico. Las especies de mercurio que eluyeron de la columna monolítica fueron oxidadas con radiación UV y después se redujeron a mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ). Las especies volátiles de mercurio fueron detectadas por AFS.

**Tabla 1.** Condiciones experimentales para la determinación de especies de mercurio mediante MSC-CV-AFS.

Condiciones cromatográficas	
Columna	Monolítica C18 Onyx (50 x 4.6 mm), Phenomenex.
Fase móvil	<b>Etapa 1:</b> 0.005 % 2-mercaptoetanol en 240 mM acetato de amonio (pH 6)-acetonitrilo (99:1, v/v) (A). <b>Etapa 2:</b> 0.005 % 2-mercaptoetanol en 240 mM acetato de amonio (pH 6)-acetonitrilo (90:10, v/v) (B).
Programa multi-isocrático de separación	<b>Etapa 1:</b> 0 a 4.5 min 100 % A y 0 % B <b>Etapa 2:</b> 4.6 a 10 min 100 % B y 0 % A
Flujo	0.8 mL min <sup>-1</sup>
Volumen de inyección	600 µL
Oxidación UV	
Lámpara UV	8 W, 254 nm (City Bright)
Bucle de oxidación	0.8 mm d.i., 1 m de largo
Generación de vapor frío	
Bucle de reducción	0.8 mm d.i., 50 cm de largo
Agente reductor	SnCl <sub>2</sub> (0.5 % p/v) en HCl (1 % v/v)
Bucle de generación de vapor	1.5 mm d.i., 1 m de largo
Detección AFS	
Lámpara	Lámpara de mercurio de cátodo hueco, 253.7 nm
Voltaje PMT	280 V
Corriente	40 mA
Gas acarreador	Ar, 120 mL min <sup>-1</sup>

### 3. Resultados y discusión

El método MSC-CV-AFS se optimizó con respecto a los parámetros individuales que corresponden a las dos etapas: separación cromatográfica (MSC) y detección por CV-AFS. Una optimización univariante se utilizó para evaluar parámetros de estudio. Para los experimentos se utilizó una mezcla de las tres especies de mercurio 20 µg L<sup>-1</sup>. La altura del pico cromatográfico fue utilizada para la cuantificación de las especies de mercurio.

#### 3.1. Condiciones de la separación cromatográfica

*Efecto del 2-mercaptoetanol:* El 2-mercaptoetanol fue utilizado como aditivo de la fase móvil para formar especies de mercurio que se retuvieran en la fase estacionaria y lograr la separación de las especies en la columna monolítica C18. El complejo de MeHg<sup>+</sup> con 2-mercaptoetanol fue más hidrofílico que los complejos de Hg<sup>2+</sup> y EtHg<sup>+</sup>, y estos últimos tenían mayores tiempos de retención en la columna RP C18 monolítica. El

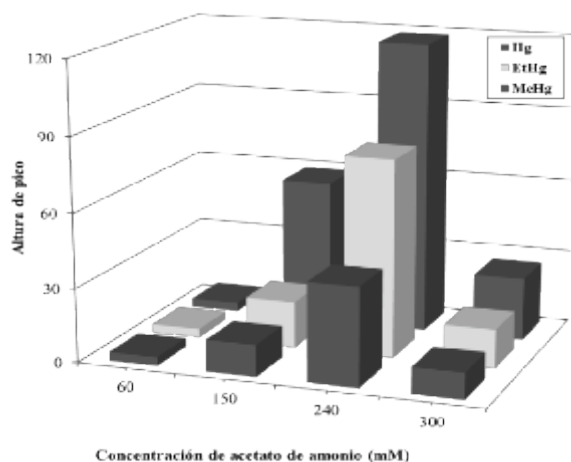
efecto de la concentración de 2-mercaptoetanol en la fase móvil fue estudiada en el intervalo de 0.005-0.02% (v/v). Se observó que la separación de las tres especies de mercurio no fue influenciada en el intervalo investigado, sin embargo la recuperación de las tres especies de mercurio disminuyó entre un 40-50% cuando la concentración de 2-mercaptoetanol fue superior al 0.005%. Además, el uso de concentraciones mayores de 2-mercaptoetanol producía una coloración marrón en el espiral de reducción (RC). Así, 2-mercaptoetanol 0.005% (v/v) se eligió para estudios posteriores.

*Efecto del acetato de amonio:* El efecto de la concentración de acetato de amonio se estudió en el intervalo de 60-300 mM. El tiempo de retención para las tres especies de mercurio fue constante al incrementar la concentración de acetato de amonio teniendo en todo los casos una separación a línea base. Sin embargo, la concentración de acetato de amonio afectó la intensidad de fluorescencia obtenida (Figura 2).

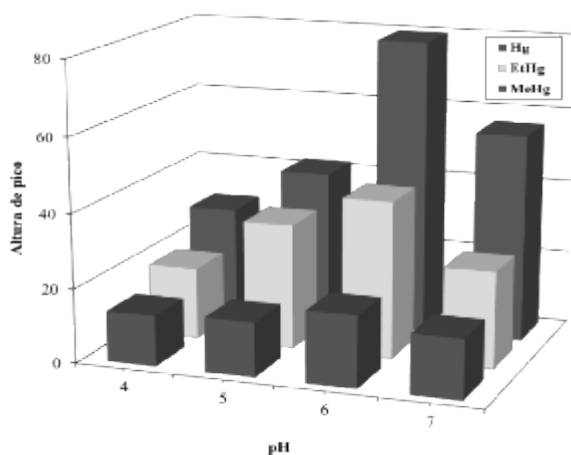
Las intensidades de las señales de las especies de mercurio aumentaron conforme la concentración de acetato de amonio se incremento de 60 a 240

mM, pero disminuyó a concentraciones superiores. Por lo tanto, una concentración de 240 mM acetato de amonio fue seleccionada para este trabajo.

**Efecto del pH de la fase móvil:** Se evaluó el pH en el intervalo de 4 a 7 utilizando 240 mM acetato de amonio. Como se muestra en la Figura 3, las intensidades de fluorescencia se incrementan significativamente con el aumento del pH hasta 6 y después de este pH la intensidad disminuye con el aumento del pH. Por otra parte, bajando el pH se disminuye la resolución cromatográfica de las especies  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{MeHg}^+$ . Así, pH 6 fue seleccionado para la fase móvil para estudios posteriores en este trabajo.



**Figura 2.** Efecto de la concentración de acetato de amonio en la intensidad de fluorescencia de las especies de mercurio. La concentración de 2-mercaptoetanol fue 0.005% (v/v).



**Figura 3.** Efecto del pH de la fase móvil en la intensidad de fluorescencia de las especies de mercurio. Las condiciones de trabajo: acetato de amonio 240 mM y 2-mercaptoetanol 0.005% (v/v).

**Efecto del acetonitrilo:** El acetonitrilo fue utilizado como modificador orgánico en la separación cromatografía de las especies de mercurio.

Los primeros estudios para la separar de los analitos se realizó en condiciones isocráticas. El efecto de acetonitrilo como un aditivo en la separación cromatográfica se estudió en el intervalo de 1-10% (v/v). Los resultados mostraron que solo se lograba separar  $\text{MeHg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  a línea base (resolución cromatográfica, 1.3) cuando el contenido de acetonitrilo fue 1% (v/v). Bajo estas condiciones,  $\text{EtHg}^+$  eluyó después de 12 min. Sin embargo, un incremento del contenido de acetonitrilo en la fase móvil redujo el tiempo de retención de  $\text{EtHg}^+$ , pero produjo el solapamiento de  $\text{MeHg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$ . Para evitar este problema se utilizó un programa de elución multi-isocrático. El modo multi-isocrático conlleva el bombeo de un volumen definido de fase móvil 1, que consistía en 0.005% 2-mercaptoetanol en acetato de amonio 240 mM (pH 6)-acetonitrilo (99:1, v/v) durante 4.5 minutos para la elución de  $\text{MeHg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , seguido por una disminución adicional de la polaridad de la fase móvil 2, constituida por 0.005% 2-mercaptoetanol en acetato de amonio 240 mM (pH 6)-acetonitrilo (90:10, v/v) durante 4.5 minutos, lo que permitió la elución rápida de  $\text{EtHg}^+$ . Usando estas condiciones, las especies de mercurio fueron separados con un tiempo de análisis menor a 9 minutos.

**Efecto del caudal de fase móvil:** Aunque las columnas monolíticas son altamente permeables debido a su estructura única de poros bimodales, caudales entre 0.5 y 1  $\text{mL min}^{-1}$  se recomiendan en los sistemas en flujo para evitar fugas y sobrepresión dentro del sistema. Por lo tanto, el caudal de la fase móvil se estudió en el rango de 0.6 a 1  $\text{mL min}^{-1}$  utilizando el programa de elución multi-isocrático (Tabla 1). Una caudal bajo de la fase móvil dio lugar a la difusión de las especies de mercurio y una disminución en las intensidades de fluorescencia. Mediante el uso de un caudal de fase móvil de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ , la separación y las intensidades de fluorescencia fueron adecuadas para las tres especies.

### 3.2. Condiciones de detección CV-AFS

**Efecto de la longitud del espiral de oxidación:** La longitud del espiral de oxidación se determinó en función del tiempo de exposición de las especies de mercurio a la radiación UV, lo que es importante para la transformación rápida de las especies orgánicas de mercurio a  $\text{Hg}^{2+}$ . La longitud del espiral de oxidación se estudió entre 1 y 3 m. Las

intensidades de fluorescencia para todas las especies de mercurio se vieron disminuidas cuando el espiral de oxidación era muy largo (2 y 3 m). Por consiguiente, se decidió utilizar 1 m de tubo para generar el espiral de oxidación y obtener intensidades máximas de fluorescencia para cada especie de mercurio. El tiempo de irradiación fue de aproximadamente 30 segundo, calculada a partir del volumen interno del espiral de reacción y el caudal de la fase móvil.

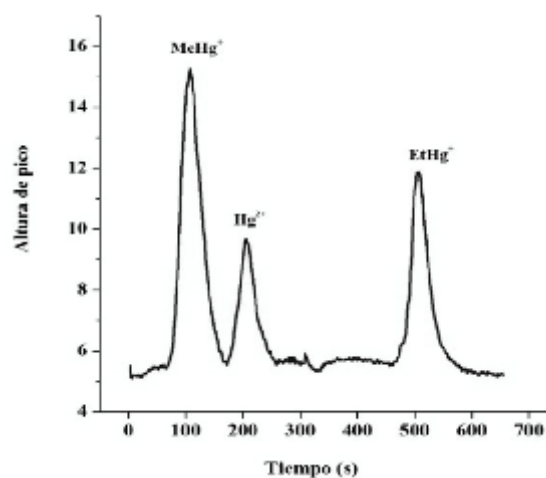
*Efecto de la concentración de SnCl<sub>2</sub>:* La concentración de SnCl<sub>2</sub> es una de las variables más importantes en la generación de vapor frío para la detección por AFS [19]. Las concentraciones en el rango de 0.5-2% (p/v) de SnCl<sub>2</sub> se estudiaron utilizando 1% de HCl (v/v). Una mayor respuesta se obtuvo utilizando 0.5% (p/v) de SnCl<sub>2</sub>. El SnCl<sub>2</sub> se solubilizó en 1% de HCl (v/v) para evitar su descomposición [19]. Concentraciones mayores de SnCl<sub>2</sub> dieron lugar a la precipitación de la disolución de SnCl<sub>2</sub> en el espiral de reducción cuando se mezcló con la fase móvil. El uso de una concentración baja de SnCl<sub>2</sub> en el sistema proporciona un blanco reactivo bajo, un método más limpio, y un menor costo de análisis.

*Efecto del caudal del gas acarreador:* El argón se utilizó como un gas portador para llevar el vapor generado Hg<sup>0</sup> de la fase líquida a la fase gaseosa y luego entrar a la celda de detección. El efecto del caudal de argón en la detección de MeHg<sup>+</sup> se estudió de 100 a 300 mL min<sup>-1</sup>. Bajas intensidades de fluorescencia se observaron a velocidades de 100 mL min<sup>-1</sup>, probablemente este resultado fue debido a la liberación incompleta de las especies volátiles de mercurio en el espiral de reducción. Una mejor intensidad se obtuvo con un caudal de 120 mL min<sup>-1</sup> de gas. Un caudal de gas portador mayor que 120 mL min<sup>-1</sup> disminuye la sensibilidad para MeHg<sup>+</sup>. Por lo tanto, un caudal de gas de 120 mL min<sup>-1</sup> se utilizó para mantener una intensidad máxima de fluorescencia.

*Efecto del caudal en la generación del vapor frío:* El caudal a través del espiral reductor donde se generó el vapor frío se estudió entre 5 y 11 mL min<sup>-1</sup>. La longitud del espiral de reducción fue de 50 cm, 1 metro del espiral para la generación del vapor frío y un caudal de argón a 120 mL min<sup>-1</sup>, fueron seleccionados como condiciones finales de análisis. Un caudal de 9 mL min<sup>-1</sup> fue elegido ya que permite asegurar la sensibilidad y la eficiencia en el separador gas-líquido. Las condiciones instrumentales optimizadas se resumen en la Tabla 1.

### 3.3. Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos se evaluaron en las condiciones experimentales establecidas. Un cromatograma de los estándares de MeHg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y EtHg<sup>+</sup> a 6, 12 y 6 µg L<sup>-1</sup> (como Hg) se presenta en la Figura 4. Las tres especies de mercurio presentan buena resolución y la separación se llevó a cabo en 9 minutos. Las características analíticas del método para la especiación de mercurio se muestran en la Tabla 2. Las desviaciones estándar relativas (RSD, %) de la altura del pico para seis repeticiones fueron 2.4% para MeHg<sup>+</sup>, 4.0% para Hg<sup>2+</sup> y 2.7% para EtHg<sup>+</sup>. Los límites de detección (3σ) para MeHg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y EtHg<sup>+</sup> fueron 0.03, 0.11 y 0.09 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente; límites de detección absolutos fueron 17.8, 64.9 y 53.1 pg (como Hg). El método permitió el análisis de 6 muestras por horas (tiempo de equilibrio de la columna no requerido). El presente método proporciona además un bajo costo instrumental y operativo, comparado con un sistema clásico de HPLC.



**Figura 4.** Cromatograma MSC-CV-AFS de una solución estándar de MeHg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y EtHg<sup>+</sup> a las concentraciones de 6, 12 y 6 µg L<sup>-1</sup> (como Hg).

### 3.4. Aplicaciones de la metodología

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de especiación del material de referencia certificado DORM-2 (músculo de cazón) después de extracción ácida. Los resultados para DORM-2 se resumen en la Tabla 3. La extracción de los compuestos de mercurio se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un agitador horizontal (12 horas) y en baño de ultrasonidos (30 min). Como se observa en la Tabla 3, el contenido de MeHg<sup>+</sup> determinado por los dos procedimientos de extracción, esta en concordancia con el valor

**Tabla 2.** Parámetros analíticos para las tres especies de mercurio mediante el procedimiento MSC-CV-AFS.

Parámetro analítico	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	EtHg <sup>+</sup>
Tiempo de retención	75	190	477
Pendiente de calibración	1.460±0.036	0.293±0.013	1.158±0.060
Ordenada de calibración	0.133±0.065	0.320±0.102	0.420±0.118
Coefficiente de correlación (r)	0.9973	0.9957	0.9979
Rango de calibración (µg L <sup>-1</sup> )	0.5 - 8	2 - 16	1 - 8
LOD (µg L <sup>-1</sup> )	0.03	0.11	0.09
RSD (%) <sup>a</sup>	2.4	4.0	2.7

<sup>a</sup>Las concentraciones de MeHg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y EtHg<sup>+</sup> fueron 3, 6 y 3 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente; n = 6.

certificado a un nivel de confianza del 95%. Asimismo, la suma de las especies de mercurio fue igual que el contenido total de mercurio certificado y que fue determinado por CV-AAS.

**Tabla 3.** Contenido de Hg total y MeHg<sup>+</sup> en el material de referencia certificado DORM-2 (mg kg<sup>-1</sup>, intervalo de confianza al 95%, para n = 3).

Procedimiento de extracción	Mercurio total <sup>a</sup>	
	Valor certificado	Determinado
Ultrasonido Horizontal (12 h)	4.64±0.26	4.65±0.16
Baño ultrasonidos (30 min)	4.64±0.26	4.77±0.26
	MeHg <sup>+</sup> <sup>b</sup>	
	Valor certificado	Determinado
Ultrasonido Horizontal (12 h)	4.47±0.32	4.48±0.33
Baño ultrasonidos (30 min)	4.47±0.32	4.11±0.36

<sup>a</sup> Hg Total se determinó por HG-AAS.

<sup>b</sup> MeHg<sup>+</sup> se determinó por MSC-CV-AFS.

El método se aplicó en la determinación de especies de mercurio en tres vacunas pediátricas. Los resultados analíticos se presentan en la Tabla 4. Las vacunas de dosis única analizadas fueron: DTPa: Difteria-tetanus-acelular pertussis, Hib: Haemophilus influenzae tipo b y Hepatitis B comercialmente distribuidas en México. El nivel más alto de mercurio se encontró en la muestra 1 (hepatitis B), la especie de mercurio encontrada en esta muestra fue EtHg<sup>+</sup>. En la muestra 2 (DTPa y polio) se detectó la presencia de las tres especies de mercurio, y en la muestra 3 (Hib) se encontró MeHg<sup>+</sup> y EtHg<sup>+</sup>.

**Tabla 4.** Determinación de las especies de mercurio por el sistema MSC-CV-AFS y de mercurio total por HG-AAS en las vacunas pediátricas (mg L<sup>-1</sup>, n = 3).

Vacuna	MSC-CV-AFS			CV-AAS
	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	EtHg <sup>+</sup>	Hg total
Hepatitis-B	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	69.4±0.6	68±2
DTPa y polio <sup>a</sup>	0.65±0.02	0.03±0.01	0.05±0.02	0.71±0.09
DTPa, polio y Hib <sup>b</sup>	0.32±0.03	ND <sup>c</sup>	0.05±0.02	0.33±0.09

<sup>a</sup> DTPa: Difteria-tetanus-acelular pertussis.

<sup>b</sup> Hib: Haemophilus influenzae tipo b.

<sup>c</sup> No detectada (ND).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece un límite máximo permitido suministrado en vacunas a niños de 4.2 µg de mercurio por Kg de peso corporal, si se considera un niño de 6 meses de edad y 8 Kg de peso corporal medio, la vacuna Hepatitis-B (0.5 mL) que contiene 68 µg Hg L<sup>-1</sup> contribuye 10.6 veces el valor recomendado por la FDA.

#### 4. Conclusiones

Se desarrolló un método analítico sencillo, rápido y reproducible para el análisis de especies de mercurio en vacunas pediátricas mediante Cromatografía Multijeringa (MSC) con detección por Espectroscopia de Fluorescencia Atómica con generación de Vapor Frío (CV-AFS). Este método fue validado mediante el análisis del material de referencia certificado DORM-2 y fue aplicado a la determinación de especies de mercurio en vacunas pediátricas. Los resultados obtenidos demuestran que el timerosal empleado como preservativo en algunas vacunas pediátricas representa un riesgo potencial para la población infantil de nuestro país.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero a SEP-PROMEP; a la Universidad Autónoma de Nuevo León; a la Facultad de Ciencias Químicas, UANL; al Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (CTQ2010-15541) y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de las Islas Baleares, España.

## 6. Referencias

1. Mousavi A.; Chavez R.D.; Abdul-Mehdi S.A.; Cabaniss S.E. *Environ. Forensics*, **2011**, 12, 14-18.
2. Stoichev T.; Amouroux D.; Martin-Doimeadios R.C.R.; Monperrus M.; Donard O.F.X.; Tsalev D.L. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2006**, 41, 591-619.
3. Michalke B.; Halbach S.; Nischwitz V. *J. Environ. Monit.*, **2009**, 11, 939-954.
4. American Academy of Pediatrics. *Committee on Infectious Diseases*, **1999**, 104, 570-574.
5. American Academy of Family Physicians Clinical Recommendations, *Joint Statement of the AAFP, AAP, ACIP and the USPHS*. **2002**.
6. Lin L.Y.; Chang L.F.; Jiang S.J. *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, 56, 6868-6872.
7. Yin Y.; Liu J.; He B.; Shi J.; Jiang G. *Microchim. Acta*, **2009**, 167, 289-295.
8. Zou H.; Huang X.; Ye M.; Luo Q. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 954, 5-32.
9. Atia N.N.; York P.; Clark B.J. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32, 931-938.
10. Cabrera K. *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 843-852.
11. Cerdà V.; Estela J.M.; Forteza R.; Cladera A.; Becerra E.; Altimira P.; Sitjar P. *Talanta*, **1999**, 50, 695-705.
12. González-San Miguel H.M.; Fernández M.; Estela J.M.; Cerda V. *Anal. Chem.*, **2009**, 28, 336-346.
13. Cerda V.; Forteza R.; Estela J.M. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 600, 35-45.
14. Almeida M.I.G.S.; Estela J.M.; Cerda V. *Anal. Lett.*, **2011**, 44, 360-373.
15. Fernández M.; Miró M.; González H.; Cerdà V. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 817-825.
16. Liu Q. *Microchem. J.*, **2010**, 95, 255-258.
17. Margetinova J.; Houserova-Pelcova P.; Kuban V. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 615, 115-123.
18. Wang M.; Feng W.Y.; Shi J.W.; Zhang F.; Wang B.; Zhu M.T.; Li B.; Zhao Y.L.; Chai Z.F. *Talanta*, **2007**, 71, 2034-2039.
19. Serra A.M.; Estela J.M.; Cerda V. *Talanta*, **2008**, 77, 556-560.