

## Validación del método analítico para la determinación de mercurio total en sangre humana por espectrofotometría de absorción atómica Zeeman RA-915+ con el módulo de pirólisis PYRO-915+

### Resumen

Este artículo describe la metodología de validación para la técnica de identificación de mercurio total en muestras de sangre por espectrofotometría de absorción atómica Zeeman RA-915+ con el módulo de pirólisis PYRO-915+, adecuada para la determinación directa de las concentraciones de mercurio total en varias matrices, la cual no necesita un pre-tratamiento de la muestra, a diferencia de otras técnicas de atomización (horno de grafito, vapor frío o generador de hidruros). Su aplicación en la realización de los análisis brinda la confiabilidad necesaria para la obtención y emisión de los resultados. La mayoría de parámetros de la validación se sometieron a análisis de varianza tipo ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Se obtuvo un límite de detección de 2,16 µg/L, un límite de cuantificación de 5,54 µg/L y una linealidad en el rango de 5,54 µg/L a 100 µg/L; adicionalmente, se evaluaron la exactitud y la precisión de la metodología, obteniendo resultados favorables para el análisis. El cálculo de la incertidumbre expandida para este método fue 0,610 µg/L.

**Palabras clave:** mercurio, validación de métodos, espectrofotometría de absorción atómica.

## Analytical method validation for determination of total mercury in human blood by Zeeman mercury spectrometer RA-915+ with the pyrolysis module PYRO-915+

### Abstract

This article describes the methodology of the validation about the identification of total mercury in blood samples by Zeeman atomic absorption spectrophotometry RA-915+ with the module of Pyrolysis PYRO-915+, suitable for the direct determination of total mercury concentrations in various matrices, that unlike other atomization techniques (graphite furnace, cold vapor or hydride generator) does not require a sample pre-treatment. With the application of this validation, is provided the reliability in the results. Most of the validation parameters were subjected to analysis of variance ANOVA with a confidence level of 95%. It was obtained a detection limit of 2.16 µg/L, a quantitation limit of 5.54 µg/L and linearity in the range of 5.54 µg/L to 100 µg/L; in addition, the precision and accuracy was evaluated, obtaining favorable results in the analysis. The calculation of the expanded uncertainty for this method was 0.610 µg/L.

**Keywords:** mercury, analytical methods validation, atomic absorption spectrophotometry.

## Validação de método analítico para a determinação do teor de mercúrio em humanos por espectrometria de absorção atômica RA-915+ Zeeman pyrolysis módulo com PYRO-915+

### Resumo

Este artigo descreve a metodologia de validação da técnica de identificação de mercúrio total em amostras de sangue por espectrofotometria de absorção atômica RA-915+ Zeeman com módulo de pirólise PYRO-915+, adequado para a determinação direta das concentrações de mercúrio total em várias matrizes, em comparação com outras técnicas de atomização (forno de grafite, vapor frio ou geradores de hidretos) não requer um pré-tratamento da amostra. Com a aplicação desta validação na realização dos análises se atinge a confiabilidade exigida na obtenção e emissão dos resultados. A maioria dos parâmetros de validação foram submetidos a análise de variância tipo ANOVA com um nível de confiança de 95%. Foi obtido um limite de detecção de 2,16 µg/L, um limite de quantificação de 5,54 µg/L e uma linearidade no intervalo de 5,54 µg/L a 100 µg/L; além disso, a precisão e a exactidão foi avaliada, obtendo-se resultados favoráveis para o análise. O cálculo da incerteza expandida para este método foi 0,610 µg/L.

**Palavras-chave:** mercúrio, validação de método analítico, espectrofotometria de absorção atômica.

## Introducción

A CAUSA DE LA PROBLEMÁTICA ACTUAL por contaminación con mercurio en Colombia (1), que día a día va en aumento debido a la falta de control, especialmente de la minería artesanal y de pequeña escala, se ha visto la necesidad de obtener resultados de laboratorio confiables a la hora de determinar mercurio, no solo en muestras ambientales, sino también en muestras biológicas (2, 3). Por lo anterior, se ha realizado la validación de una metodología para el análisis de mercurio en sangre humana.

En el desarrollo de la validación de la metodología para la determinación de mercurio en sangre se utilizó el equipo Lumex RA-915+ con el módulo PYRO-915+, cuyo principio de funcionamiento (4), se basa en la destrucción térmica de la muestra, la cual se calienta a una temperatura de 300 a 800 °C (dependiendo del modo de funcionamiento seleccionado), para que los compuestos de mercurio se evaporen y sean parcialmente disociados, formando así mercurio elemental que es transportado a otra cámara. Posteriormente, se realiza su análisis por espectrofotometría de absorción atómica con corrección de Zeeman y, finalmente, el dispositivo muestra una señal eléctrica y realiza un cálculo de área el cual es directamente proporcional a la concentración de mercurio.

Las técnicas de atomización como el horno de grafito, vapor frío o generador de hidruros, requieren de una etapa de calentamiento la cual puede afectar la exactitud del análisis debido a la posible pérdida de mercurio en sistemas abiertos, o al riesgo de contaminación por la manipulación de la muestra (5). A diferencia de estas técnicas, las ventajas que tiene el equipo Lumex son la disminución en el tiempo de análisis, ya que la atomización por pirólisis permite que las muestras sean analizadas sin que se requiera una preparación previa (6), además de beneficios económicos al utilizar menor cantidad de reactivos y, por tanto, menores costos en el proceso.

Este artículo describe un método para la determinación de mercurio en sangre basado en la metodología EPA 7473 (7); ello teniendo en cuenta que en el país no existe ningún laboratorio acreditado para realizar este análisis, lo que proporciona gran importancia a la presente validación.

## Materiales y métodos

Los materiales utilizados en esta metodología fueron:

- Analizador de mercurio Lumex RA-915+ con el módulo PYRO-915+ para pirólisis.
- Estándar de mercurio 1000 µg/mL marca AccuStandard®.
- Unidad de sangre no reactiva proporcionada por el Grupo Red Nacional de Bancos de Sangre y servicios de transfusión del Instituto Nacional de Salud – Colombia.
- Material volumétrico tipo A.
- Micropipetas (100-1000 µL y 40-200 µL) marca Brand®.

Para el análisis y validación del método se establecieron las siguientes condiciones en el equipo Lumex, basándose en el Manual del Ministerio de Ambiente de Japón (8) y en S. Sholupov *et al.* (9):

- Temperatura: 800 °C.
- Tiempo de análisis: 70 segundos.
- Tiempo de precalentamiento del pirolizador: 45 min.
- Volumen de inyección de muestra: 100 µL.

En la preparación de la solución stock de mercurio (1 mg/L), se parte de un estándar certificado de mercurio con concentración de 1000 µg/mL, se preparó una solución stock de mercurio con una concentración final de 1,00 mg/L en un matraz de 100 mL la cual se completó hasta la línea de aforo con agua ultrapura tipo 1 grado HPLC.

Para la obtención de la curva de calibración, de la anterior solución se prepararon las diluciones para construir la curva de calibración, aforadas con la sangre proporcionada por el Grupo Red Nacional de Bancos de Sangre del Instituto Nacional de Salud, para finalmente obtener concentraciones de 0,00, 5,00, 10,0, 25,0, 50,0 y 100 µg/L. A esta unidad de sangre, se le realizó previamente un análisis de mercurio en el equipo para verificar que no hubiese señal alguna, por lo tanto se puede indicar que se parte de una concentración de cero.

Puesto que las soluciones de la curva se prepararon en matriz sangre, fue necesario tener precaución a la hora de aforar para evitar la producción de burbujas que impidieran ver la línea de aforo.

## Resultados y discusión

La validación de esta técnica se llevó a cabo bajo los criterios de exactitud, precisión, estabilidad, linealidad, límite de detección y de cuantificación e incertidumbre. Las soluciones analizadas para cada parámetro fueron preparadas de la misma manera que la curva de calibración, es decir, en matriz sangre. Los análisis estadísticos se realizaron por medio del software Stata 11.1 todos bajo un marco de confiabilidad del 95%.

### Exactitud

La exactitud se determinó analizando 15 muestras por cada concentración de la curva (5,00, 10,0, 25,0, 50,0 y 100 µg/L), para un total de 75 muestras a las cuales se les determinó el porcentaje de recuperación por medio de la ecuación 1 (10) (Figura 1):

$$\%R = \frac{\text{Concentración calculada}}{\text{Concentración teórica}} \times 100 \quad [\text{ec. 1}]$$

La concentración se calculó para cada muestra interpolando la respuesta del equipo en la curva de calibración. La concentración teórica es la concentración preparada, de la cual se espera obtener y recuperar el 100% al realizar el análisis. Para este método se encontró un porcentaje de recuperación promedio de 99,2%, con una desviación estándar relativa de 12,2% con un *n* de 75.

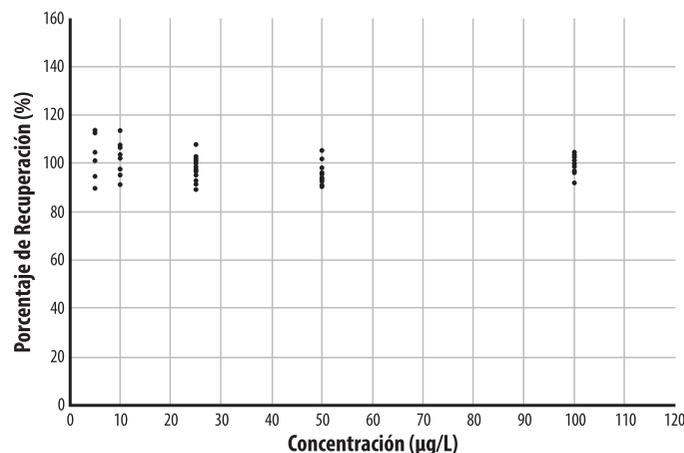


Figura 1. Porcentajes de recuperación en las cinco concentraciones analizadas.

Con el cálculo de porcentaje de recuperación se obtuvo una *t* student experimental de 1,18, que es menor a 1,66, valor crítico de *t* para un nivel de confianza del 95%, *n*-1 de 74, con hipótesis nula (*H*<sub>0</sub>) del 100% de recuperación. Lo anterior indica que, bajo el parámetro de exactitud, este método presenta un buen comportamiento, pues se optimiza a medida que aumenta la concentración.

## Precisión

### Repetibilidad

Se analizaron 20 muestras para tres niveles de concentración: bajo (5,00 µg/L), medio (25,0 µg/L) y alto (100 µg/L), a partir de los cuales se determinó la desviación estándar relativa. Los resultados obtenidos fueron 18,7%, 9,70% y 9,60%, respectivamente. Según la Food and Drug Administration - FDA (11), la desviación estándar relativa debe ser menor del 20% para concentraciones de nivel bajo, y menor del 15% para las concentraciones medias y altas. Por lo tanto, se concluye que para los tres niveles se cumplen las especificaciones y el método es repetible bajo las condiciones dadas.

### Precisión intermedia

Este parámetro puede determinarse con la repetición de las medidas sin modificar el procedimiento pero adicionando una variación (12), que para este caso fue el cambio de analista. Los dos operadores prepararon las muestras por aparte y las analizaron en el equipo Lumex. Para determinar la precisión intermedia se analizó por triplicado cada una de las concentraciones, como lo plantea la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Ministerio de Salud y Protección Social (13), posteriormente se determinó el porcentaje de recuperación y se realizó la comparación entre los resultados de los analistas para un *n* total de 30, obteniéndose un coeficiente de variación de 9,60%. Esto indica que es posible realizar el procedimiento con diferentes analistas utilizando las mismas condiciones analíticas.

## Estabilidad

Se determinó la estabilidad del analito a temperatura de refrigeración en un corto periodo de tiempo, de acuerdo a lo que plantea la FDA (14). Se realizaron tres repeticiones del análisis para una concentración de 100 µg/L en tres momentos diferentes: recién preparada la curva, luego de 4 horas y, finalmente, después de 24 horas (Tabla 1).

Con los resultados del ANOVA se concluyó que estadísticamente no hay diferencias significativas (*p* > 0,05) entre las mediciones hechas en los diferentes tiempos a temperatura de refrigeración, con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 1.** Respuesta del equipo para una solución de 100 µg/L analizada en diferentes tiempos.

Respuesta del equipo (Área)		
0 horas	4 horas	24 horas
2,82x10 <sup>3</sup>	2,81x10 <sup>3</sup>	2,91x10 <sup>3</sup>
3,01x10 <sup>3</sup>	2,92x10 <sup>3</sup>	2,93x10 <sup>3</sup>
2,84x10 <sup>3</sup>	2,91x10 <sup>3</sup>	2,87x10 <sup>3</sup>

## Linealidad del método

La linealidad del método puede observarse en el gráfico de los resultados de los ensayos en función de la concentración del mensurando (Figura 2); fue calculada a partir de la ecuación de la regresión lineal determinada por el método de los mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación lineal es usado para indicar cuanto puede ser considerada adecuada la recta como modelo matemático.

En la determinación de la linealidad del método, se tomaron 15 medidas por cada concentración de la curva, de la cual se obtuvo el coeficiente de correlación, intercepto y pendiente de la curva lineal, los cuales se encuentran en la Tabla 2.

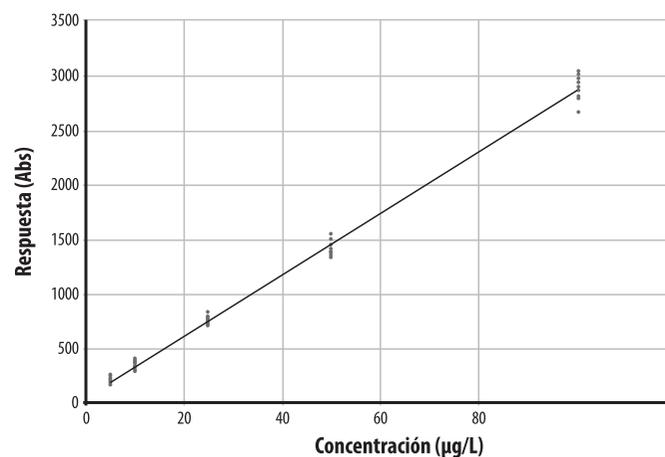
Como se observa en la Tabla 2, el coeficiente de correlación es mayor de 0,997, lo cual permite concluir que cumple con los parámetros establecidos según la FDA (15). Para el ANOVA de la regresión, se encontró que *p* < 0,05 lo que indica que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de mercurio, con un nivel de confianza del 95%.

## Límites de detección y cuantificación

El límite de detección se determinó con el análisis de 20 repeticiones del blanco (solución preparada bajo las mismas condiciones que la curva sin adición de solución stock, es decir de concentración cero para mercurio) y posteriormente se calculó con la ecuación 2 (16):

$$\text{LOD} = X + (3 \cdot \text{SD}) \quad [\text{ec. 2}]$$

Donde *X* es la media de la respuesta instrumental del blanco y SD es la desviación estándar de la respuesta instrumental del blanco.



**Figura 2.** Curva de la regresión lineal.

**Tabla 2.** Coeficientes de la regresión lineal.

Intercepto	49,0 (Área)
Pendiente	28,1 (Área · L/µg)
Coefficiente de correlación	0,999

El límite de cuantificación se determinó a partir de los mismos resultados de las mediciones de blanco con las que se estableció el límite de detección, y se calculó con la ecuación 3 (17):

$$\text{LOQ} = X + (10 \cdot \text{SD}) \quad [\text{ec. 3}]$$

En la Tabla 3 se encuentran los resultados de la desviación estándar, límite de detección y cuantificación.

### Incertidumbre

La incertidumbre representa el intervalo en el que se puede encontrar el valor verdadero con mayor probabilidad. Los parámetros para la estimación de incertidumbre son: incertidumbre estándar, incertidumbre estándar combinada e incertidumbre expandida (18). Las formas de evaluar la incertidumbre estándar son de tipo A y tipo B.

**Tipo A:** se relaciona con fuentes de errores aleatorios, y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados, que pueden caracterizarse por desviaciones estándar (19).

**Tipo B:** esta incertidumbre no se determina por medios estadísticos, están asociadas a los errores de tipo sistemático; esto es, se estiman a partir de datos del fabricante del equipo, especificaciones, certificados de calibración, y en general de datos subjetivos (20, 21).

Las fuentes de incertidumbre fueron clasificadas en tres grupos: instrumentales, preparación del estándar analítico y preparación de las muestras; y sus contribuciones se pueden observar en la Tabla 4.

Estas contribuciones se relacionaron cada una como desviación estándar relativa RSD bajo las ecuaciones de la Tabla 5. Para el material aforado y las micropipetas sólo se tuvo en cuenta el aporte de la RSD de los errores máximos permitidos, ya que el RSD de la repetibilidad y resolución, respectivamente, fueron despreciables.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, por medio de la ecuación 4 se determinó la incertidumbre:

$$U_{\text{Analito}} = C_{\text{Analito}} \cdot \sqrt{\text{RSD}_I^2 + \text{RSD}_P^2 + \text{RSD}_M^2} = 0,305 \quad [\text{ec. 4}]$$

**Tabla 3.** Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método.

Promedio	0,710 µg/L
SD	0,480 µg/L
LOD	2,16 µg/L
LOQ	5,54 µg/L

Esta incertidumbre corresponde a la incertidumbre máxima del método analítico validado; dicho valor corresponde a la incertidumbre en el nivel 5 de la curva de calibración (100 µg/L).

La incertidumbre expandida se halló de la siguiente forma:

$$U = K \cdot U_{\text{Analito}} \quad [\text{ec. 5}]$$

donde  $K$  es el factor de seguridad o de cobertura;  $K = 2$  para un nivel de confianza del 95%.

Finalmente, para el método de determinación de mercurio en sangre por absorción atómica con pirólisis, realizado bajo las condiciones del laboratorio se obtuvo una incertidumbre expandida  $U = \pm 0,610$  µg/L.

### Análisis de muestras a partir de la validación

A partir de la validación, se ha realizado a la fecha el análisis de mercurio total en 300 muestras de sangre provenientes de participantes expuestos y no expuestos a éste metal por extracción artesanal de oro en la Región de la Mojana – Colombia (Figura 3). Este estudio se está ejecutando actualmente dentro de un Programa Piloto de Vigilancia Epidemiológica de Mercurio en el Instituto Nacional de Salud.

De la totalidad de muestras, 203 se hallaron por debajo del límite de cuantificación y, como se observa en la Figura 3, 151 muestras fueron detectadas por el equipo a pesar de que no fue posible cuantificarlas. La concentración máxima se encontró en  $38,5 \pm 0,610$  µg/L, teniendo en cuenta que valores de referencia de mercurio en sangre se encuentran en 5 µg/L para personas no expuestas y 15 µg/L para personas expuestas (22).

### Conclusión

Se validó una metodología para la determinación de mercurio en sangre por espectrofotometría con pirólisis haciendo uso del equipo Lumex RA-915+ el cual es específico para el analito de interés. El método demostró linealidad, precisión y exactitud bajo las condiciones analíticas del proceso, según lo establecido en la bibliografía consultada para la determinación de trazas de metales pesados en matrices biológicas.

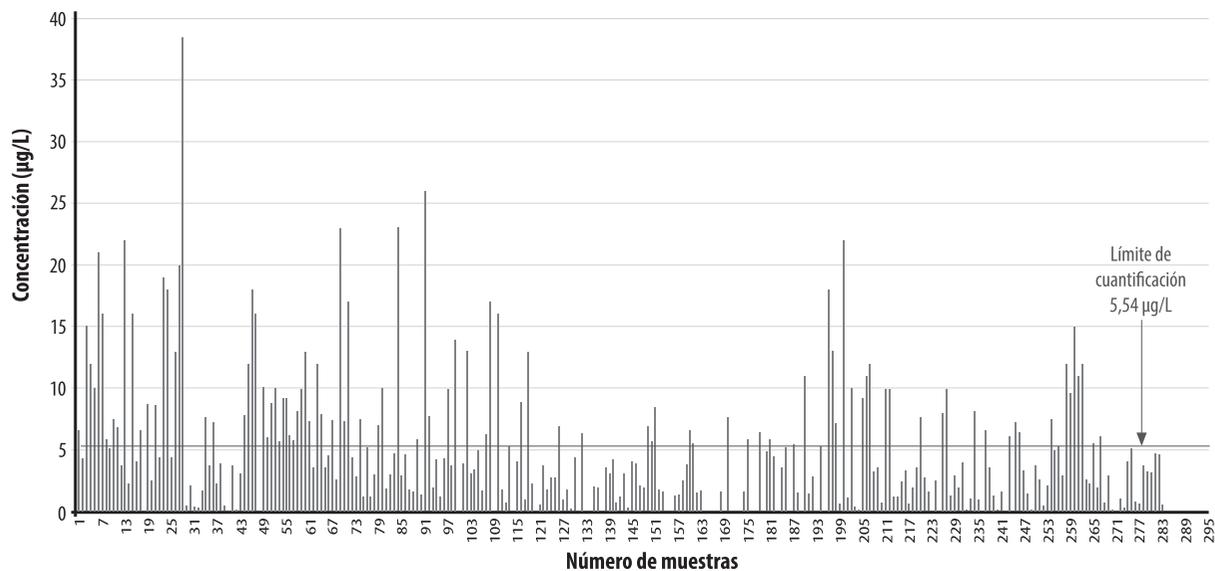
**Tabla 4.** Contribuciones a las fuentes de incertidumbre.

Estándar de mercurio (1000 mg/L)	$\pm 0,5$ mg/L
Matraz de 100 mL tipo A	$\pm 0,08$ mL
Matraz de 25 mL tipo A	$\pm 0,03$ mL
Micropipeta de 100 a 1000 µL	$\pm 6,40 \times 10^{-2}$ µL
Micropipeta de 40 a 200 µL	$\pm 1,70 \times 10^{-2}$ µL

**Tabla 5.** Fuentes de incertidumbre y contribuciones.

Fuentes de incertidumbre	Contribuciones	Expresión matemática
Instrumental (I) $RSD_I^2 = RSD_{cc}^2 = 5,12 \times 10^{-7}$	Curva de calibración (CC)	Linealidad $RSD_{cc}^2 = \left( \frac{S_y^x}{m \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{q} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{\sum (X_0 - \bar{X})^2}}} \right)^2 = 5,12 \times 10^{-7}$
Preparación del patrón analítico (P) $RSD_P^2 = RSD_{PE}^2 + RSD_{MA}^2 + RSD_{Micro}^2 = 8,78 \times 10^{-6}$	Pureza del estándar (PE) $RSD_{PE}^2 = RSD_{EMP}^2$	Error máximo permitido (EMP) $RSD_{EMP}^2 = \left( \frac{\frac{A}{\sqrt{3}}}{\%Pureza} \right)^2 = 8,42 \times 10^{-6}$
	Material aforado (MA) $RSD_{MA}^2 = RSD_{EMP}^2$	Error máximo permitido (EMP) $RSD_{EMP}^2 = \left( \frac{\frac{A}{\sqrt{6}}}{Volumen} \right)^2 = 3,47 \times 10^{-7}$
	Micropipetas (Micro) $RSD_{Micro}^2 = RSD_{EMP}^2$	Error máximo permitido (EMP) $RSD_{EMP}^2 = \left( \frac{\frac{A}{\sqrt{3}}}{Volumen} \right)^2 = 1,13 \times 10^{-8}$
Preparación de las muestras (M) $RSD_M^2 = RSD_{Micro}^2$	Micropipetas (Micro) $RSD_{Micro}^2 = RSD_{EMP}^2$	Error máximo permitido (EMP) $RSD_{EMP}^2 = \left( \frac{\frac{A}{\sqrt{3}}}{Volumen} \right)^2 = 7,23 \times 10^{-9}$

$S_{xy}$  = Desviación estándar de los residuales o error típico. m= Pendiente curva de calibración. p= Réplicas de la curva de calibración. q= Número de niveles de la curva de calibración.  
 $X_0$  = Concentración a la cual se evaluó la incertidumbre.  $\bar{X}$  = promedio de las concentraciones de la curva de calibración. A= Tolerancia certificado calidad.  
 n = número de repeticiones para evaluar repetibilidad del material volumétrico.


**Figura 3.** Concentración de mercurio en muestras de sangre provenientes de participantes del Proyecto de la Mojana.

## Referencias

- Moreno, J. A. Alteraciones comportamentales y de personalidad debido a la exposición ocupacional a mercurio en un grupo mineros del oro de la región del Bagre Antioquia. Trabajo de grado. Universidad CES, Medellín, Colombia. 2008.
- United Nations Environment Programme. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva (Switzerland): UN-EP. 2008.
- Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005. **24**(5): 383-393.
- User's Manual PYRO-915+ Attachment for Mercury RA-915+.
- Aranda, P. R.; Gil, R. A.; Moyano, S.; De Vito, I.; Martínez, L. D. Slurry sampling in serum blood for mercury determination by CV-AFS. *Journal of Hazardous Materials*. 2009. **161**(2-3): 1399-1403.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). Method 1669. Sampling ambient water for trace metals, trace at EPA water quality criteria levels. 1996.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry. 2007.
- Manual de Análisis de Mercurio. Ministerio de Ambiente. Japón. Marzo. 2004.
- Sholupov, S.; Pogarev, S.; Ryzhov, V.; Mashyanov, N.; Stroganov, A. Zeeman atomic absorption spectrometer RA-915+ for direct determination of mercury in air and complex matrix samples. *Fuproc*. 2004. **85**: 473-485.
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. 1<sup>st</sup> edition. 1998. Disponible en: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. [Consultado en julio de 2013].
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for the Industry. Bioanalytical Method Validation. Estados Unidos de América. 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>. [Consultado en julio de 2013].
- Centro Español de Metrología. Vocabulario Internacional de Metrología: conceptos fundamentales y generales y términos asociados. 3<sup>a</sup> edición. 2012.
- Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de validación de métodos analíticos. Colombia. 2003.
- Manual de Análisis de Mercurio. Ministerio de Ambiente. Japón. Marzo. 2004.
- Manual de Análisis de Mercurio. Ministerio de Ambiente. Japón. Marzo. 2005.
- Thompson M.; Ellison S. L. R.; Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002. **74**(5): 835-855.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for the Industry. Bioanalytical Method Validation. Estados Unidos de América. 2003.
- González-Hinostroza, C. M. Aplicación del cálculo de incertidumbre combinada a la validación de una metodología analítica por HPLC en un producto que contiene Citalopram Bromhidrato. Internado presentado como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia (Chile). 2006.
- Instituto Nacional de Normalización. INCh 2755/1. Guía para la cuantificación y expresión de la incertidumbre en el análisis químico. Parte 1: Fundamentos. Santiago (Chile): INNCh. 81 p. 2003.
- Costley, C. T.; Mossop, K. F.; Dean, J. R.; Garden, L. M.; Marshall, J.; Carroll J. Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. *Analytica Chimica Acta*. 2000. **405**: 179-183.
- Norma ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. 2<sup>a</sup> edición. 2005.
- WHO, UNEP, DTIE - Chemicals Branch, United Nations Environment Programme. Guidance for Identifying Populations at Risk From Mercury Exposure. Ginebra (Suiza): United Nations Environment Programme. 2008. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf>. [Consultado en julio de 2013].

### Article citation:

Ramírez, C.; Olarte, E.; Téllez, E.; Palma, M. Validación del método analítico para la determinación de mercurio total en sangre humana por espectrofotometría de absorción atómica Zeeman RA-915+ con el módulo de pirólisis PYRO-915+. *Rev Colomb Quim*. 2013. **42**(3): 11-16.