



MINISTERIO DE
AGRICULTURA, ALIMENTACION
Y MEDIO AMBIENTE

DIRECCION GENERAL DE LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA

SUBDIRECCION GENERAL DE CONTROL Y DE
LABORATORIOS ALIMENTARIOS

Laboratorio Arbitral Agroalimentario

**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA
PARA METALES PESADOS EN ALIMENTOS Y PIENSOS**
(Lista de la Dirección General de Sanidad y Consumidores de la Comisión Europea)

ANALISIS DE ELEMENTOS PARA CATEGORIAS DE ENSAYO NT-18.
MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA O
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

**PROTOCOLO DE PREPARACIONES Y VALIDACIONES DE MUESTRAS
DE ALIMENTOS**

Mayo 2012

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	3
2. TÉCNICAS ESPECTROMETRICAS	4
2.1 Espectrometría Atómica	4
2.1.1 <u>Espectrometría de Absorción Atómica</u>	
2.1.1.1. Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (F-AAS)	
2.1.1.2. Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ET-AAS)	
2.1.1.3. Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HG-AAS)	
2.1.1.4. Espectrometría de Absorción Atómica con Vapor Frío (CV-AAS)	
2.1.2. <u>Espectrometría de Emisión Atómica.</u>	
2.1.2.1. Espectrometría de Emisión Atómica con Llama (F-AES)	
2.1.2.2. Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)	
2.2 Espectrometría de Masas	6
2.3 Preparación de muestra	6
3. INTERFERENCIAS	7
4. ACREDITACION POR CATEGORIAS DE ENSAYO NT-18	8
4.1 Definición de la LEBA en grupos de matrices	8
4.2 Preparación de las muestras	9
5. PROCESO DE VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD	12
5.1 Características de la fiabilidad	12
5.2 Evaluación de la calidad de los ensayos	12
6. VALIDACIONES NECESARIAS Y CRITERIOS A APLICAR	14
6.1 Protocolo de Validaciones	15
6.1.1 Validación de un nuevo elemento	
6.1.2 Validación de una matriz en un grupo no validado de un elemento incluido en la LEBA	
6.1.3 Verificación de una matriz nueva en un grupo ya validado	
7. CONCLUSIONES	21
8. BIBLIOGRAFIA	21

1. INTRODUCCIÓN

El artículo 33 del Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, establece las funciones y responsabilidades de los laboratorios nacionales de referencia, especialmente las que se refieren a la coordinación, para su área de competencia, de las actividades de los laboratorios oficiales encargados del análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales.

Por otra parte, la Nota Técnica NT-55 *“Laboratorios de Referencia en el sector agroalimentario: política sobre participación en el sistema de acreditación”*, elaborada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), resalta la contribución de los laboratorios nacionales de referencia para que los resultados de los análisis emitidos por los laboratorios que realizan el control oficial de los productos agroalimentarios sean de elevada calidad y uniformidad. Para alcanzar este objetivo, los laboratorios nacionales de referencia pueden publicar los datos de validación de un procedimiento de ensayo para que puedan ser utilizados por los laboratorios de control oficial, organizar ensayos de intercomparación, asegurar la disponibilidad de materiales de referencia, en lo posible, y colaborar en la formación técnica del personal responsable del control analítico oficial.

Además, esta Nota Técnica, establece que ENAC considerará en todo momento como adecuadas las decisiones, prácticas y procedimientos de ensayo utilizados por los laboratorios que operan en el control oficial que sigan las instrucciones, directrices, recomendaciones o documentos publicados por el correspondiente Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de cualquier estado miembro o el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EU-RL) respectivo, y en cualquier caso, no será obligatorio que el Laboratorio Autorizado para participar en el Control Oficial siga necesariamente los procedimientos de ensayo del LNR o del EU-RL respectivo, salvo indicación expresa en la legislación al respecto.

El Laboratorio Arbitral Agroalimentario de la Subdirección General de Control y de Laboratorios Alimentarios de la Dirección General de la Industria Alimentaria del Ministerio de agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, ha sido designado Laboratorio Nacional de Referencia para la determinación de residuos de elementos químicos (Grupo B3c) según la Decisión de la Comisión 2006/130/CE de 10 de febrero de 2006, y también para la detección de metales pesados en alimentos de origen vegetal y piensos, conforme al listado de LNR de SANCO de la Comisión Europea y según lo establecido en el artículo 33 del Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004.

El presente trabajo pretende presentar un protocolo o procedimiento sencillo de preparación de muestras para determinación de elementos en alimentos para Categorías de Ensayo por Nota Técnica NT-18 de ENAC aplicados a las técnicas de espectrometría atómica o espectrometría de masas, así como proporcionar unas directrices en cuanto a las validaciones necesarias.

Este documento ha sido consensuado en el Grupo de Trabajo de Metales Pesados coordinado por la Subdirección de Control y de Laboratorios Alimentarios de la que depende el Laboratorio Arbitral Agroalimentario, con el fin de que pueda facilitar la implantación de los alcances flexibles para la determinación de estos elementos en

los laboratorios españoles que intervienen en el control oficial de productos agroalimentarios.

2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

Desde hace más de treinta años, los métodos de análisis instrumental han tenido un desarrollo importante y son ampliamente utilizados de forma rutinaria en laboratorios de control y de investigación.

La Espectrometría es una técnica instrumental que permite determinar el mayor número de elementos en una gran variedad de matrices, basada en la identificación de analitos mediante el espectro emitido o absorbido por los mismos, pudiéndose diferenciar entre atómica o de masas.

2.1. En la Espectrometría Atómica podemos medir la luz absorbida o emitida por un átomo al pasar del estado fundamental al estado excitado o viceversa. En función de ello, se clasifica:

2.1.1. Espectrometría de Absorción Atómica cuando mide la luz absorbida por un átomo en estado fundamental al pasar al estado excitado.

- Llama F-AAS
- Atomización Electrotérmica ET-AAS
- Generación de Hidruros HG- AAS
- Vapor frío CV-AAS
- Análisis elemental/directo AMA / DMA

2.1.2. Espectrometría de Emisión Atómica cuando mide la luz emitida por un átomo excitado al pasar al estado fundamental.

- Emisión Atómica con Llama F- AES
- Con Plasma de Acoplamiento Inductivo ICP-AES

2.1.1.1. Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (F-AAS)

Es una técnica monoelemental y está sujeta a muchas interferencias químicas o de matriz que se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. El tipo más común de interferencia es el producido por aniones que forman compuestos de baja volatilidad con el analito y reducen así su velocidad de atomización lo que origina resultados menores de lo esperado. Las interferencias espectrales son poco frecuentes debido a que las líneas de la fuente son extremadamente estrechas y específicas.

2.1.1.2. Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ET-AAS)

Sigue siendo una técnica monoelemental sujeta a las interferencias de matriz descritas anteriormente pero agudizadas ya que grandes cantidades de la muestra son volatilizadas en un espacio pequeño, por lo que moléculas presentes pueden absorber la radiación en la región del analito, y presentan mucho efecto memoria. Hay distintos procedimientos para intentar evitar dichos problemas como utilizar tubo de grafito con plataforma, curva de adición, etc.

2.1.1.3. Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HG-AAS) Técnica monoelemental restrictiva a elementos refractario, que presenta una alta sensibilidad, pero sujeta a interferencias químicas debidas a altas concentraciones de los metales de transición, aunque controlando la acidez del medio y la concentración del NaBH₄, son dos factores que permiten reducir al mínimo dichas interferencias.

2.1.1.4. Espectrometría de Absorción Atómica con Vapor Frío (CV- AAS)

Al igual que en la Espectrometría Atómica por Generación de Hidruros, se utiliza un agente reductor (borhidruro sódico o el más sensible cloruro estannoso) que consigue reducir las especies de mercurio a su estado elemental, el cual es volátil y es arrastrado por argon hasta la celda de medida.

2.1.2.1. Espectrometría de Emisión con Llama (F-AES)

Presenta la ventaja que la llama actúa como fuente, no necesitando como los métodos de absorción una lámpara diferente para cada elemento. La calidad del monocromador no tiene que ser tan alta para alcanzar el mismo grado de selectividad, pero también sufre interferencias químicas semejantes.

Resumiendo para estas técnicas estudiadas de Absorción y Emisión Atómica las principales interferencias son las químicas o de matriz.

2.1.2.2. Espectrometría Atómica de Emisión con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)

Técnica con gran aceptación hoy en día, que está justificada por las características analíticas de la misma:

- Un gran número de elementos determinables (> 70)
- Una reproducibilidad de hasta 0,3% en los mejores casos
- Buena exactitud
- Técnica multielemental
- Pocos efectos de matriz o químicos
- Una dinámica lineal de concentración cubriendo varios órdenes de magnitud

El ICP tiene una excelente reputación con respecto a los efectos de matriz, particularmente cuando se compara con métodos alternativos como la Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS). Sin embargo, los efectos de matriz

pueden ser observados en ICP-AES, aunque usualmente la magnitud del efecto es baja. En el caso de soluciones, el concepto de matriz incluye no solo el (los) elemento (s) mayoritario (s), sino los reactivos tales como solventes ácidos u orgánicos, debido a que su naturaleza y concentración pueden influir en la intensidad de la señal del analito. También hay que tener en cuenta que según el nebulizador utilizado los efectos matriz pueden ser muy importantes, por ejemplo si se utiliza el nebulizador ultrasónico (para intentar llegar a los límites exigidos en Pb, Cd, en algunos alimentos) es muy sensible a los efectos matriz, y por eso a veces sólo se recomienda sobretodo para matrices no muy ácidas y limpias tipo aguas, aunque es cierto que si se trabaja con el patrón interno adecuado estos efectos sí se verían reducidos incluso con antorcha en vista axial y nebulizador ultrasónico.

Si existieran esas interferencias de matriz que se deben a componentes de las muestras que afectan a la lectura de todos los elementos y teniendo en cuenta que si el tratamiento de digestión es cenizas y se toman cantidades de muestra grandes 10g para analizar Pb y Cd, ya que hay que cuantificar a niveles muy bajos, se corrigen utilizando un patrón interno, de modo que si varía la intensidad de la lectura de este patrón, el programa corrige la lectura de las muestras multiplicándolas por un factor proporcional a la variación en la lectura del patrón interno.

El concepto de robustez fue usado para describir la capacidad de un método analítico para aceptar un cambio en la composición de la matriz, sin producir un cambio en la señal del analito. La robustez está ligada las técnicas de plasma ya que presentan una capacidad para aceptar un cambio en la matriz sin que se modifiquen las condiciones del plasma; sin que cambien por ejemplo, la temperatura, la densidad electrónica y la distribución espacial de las diferentes especies.

Por todo ello se consideran que las técnicas de plasma están poco influenciadas por el efecto matriz, es decir por las diferentes composiciones de la muestras y a la vez son unas técnicas muy robustas que no se alteran ante cambios en las distintas matrices analizadas

Pero la Espectrometría Atómica de Emisión con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) presenta espectros de emisión complejos sujetos interferencias espectrales por lo que es importante tener equipos con una alta resolución.

2.2 .Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

Con la **Espectrometría de Masas** medimos la relación masa/carga de los iones producidos en un Plasma Óptico de Acoplamiento Inductivo ICP-MS.

Al igual que la anterior tiene escasas interferencias de matriz, las cuales se pueden corregir con el uso de patrón interno. Además en este caso, la introducción de muestra suele ser menor que en los ICP-AES ya que habitualmente se trabaja con micronebulizadores, de forma que el efecto matriz es aún menor.

Asimismo, los métodos de análisis que utilizan ICP-MS presentan también pocas interferencias espectrales por lo que es la técnica más libre de interferencias.

2.3 En el proceso de preparación de la muestra, es importante para las interferencias de matriz, la mayor o menor cantidad necesaria de pesada de la muestra para llevar a cabo el proceso analítico, que puede ser por:

- Vía seca o calcinación → (mucho peso de muestra)
- Vía húmeda → en recipiente abierto (poco peso de muestra)
- Microondas → (poco peso de muestra)

3. INTERFERENCIAS

Los tipos de interferencias pueden ser:

Interferencias físicas causadas por diferencias en las propiedades físicas de las soluciones como la viscosidad, tensión superficial o presión de vapor.

Interferencias químicas: cualquier alteración en el número total de átomos libres formados por unidad de volumen debido a la formación de compuestos químicos termoestables. Las causas más comunes de éstas son:

- Disociación incompleta de la molécula formada o formación de una sal difícil de fundir.
- Reacción espontánea de los átomos libres con otros átomos o radicales presentes en el medio ambiente.

Interferencias ionización: debido a una excesiva ionización de los átomos, disminuye la población de átomos neutros y disminuye la sensibilidad.

Interferencias espectrales: Las interferencias espectrales de línea ocurren cuando hay superposición de dos líneas atómicas o cuando éstas no son resueltas por el monocromador.

Las interferencias espectrales de banda se producen debido a la absorción de la radiación por moléculas o radicales, y por dispersión de la radiación por sólidos.

Conclusión: Las técnicas de Absorción y Emisión Atómica están sujetas preferentemente a interferencias de matriz, la Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo presenta preferentemente interferencias espectrales y la Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo es la técnica con menor número de interferencias.

4. ACREDITACIÓN POR CATEGORÍAS DE ENSAYO NT-18

En la Nota Técnica 18 de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) “Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo”, se especifica:

En el punto 4.- Definiciones:

A) **Ensayo:** un ensayo viene descrito por:

- Producto o material a ensayar (p.e. agua residual, acero, etc.)
- Parámetro a determinar (p.e. cobre, pH, etc.)
- Técnicas o método de medida (p.e. absorción atómica, polarimetría, etc.)
- Los intervalos o capacidades de ensayo

B) **Categoría de ensayo:** un conjunto de ensayos realizados por una técnica o método de ensayo común para determinar un parámetro o familia de parámetros en un producto o familia de productos.

En el punto 5.- Alcance de acreditación

En la definición del alcance de acreditación para categoría de ensayo, se establece que debe indicarse:

- Categoría del ensayo
- La familia de productos y/o parámetros que definen la categoría
- Se hará mención a un procedimiento de ensayo aplicable a la categoría
- Se hará referencia a la Lista de Ensayos Bajo Acreditación (LEBA)

Para definir la LEBA, en nuestro caso, es necesario establecer primero, la familia de parámetros o analitos que pueden ser elementos, definir las familias de matrices que forman la categoría de ensayo que pueden ser alimentos y aguas continentales y por último definir la técnica empleada que puede ser cualquiera de las técnicas descritas anteriormente.

Por último, se elaboraran y desarrollarán procedimientos analíticos (PNT's) que contemplen todo el desarrollo de esta categoría.

4.1 Definición de la LEBA en grupos de matrices

Una vez establecida la LEBA, en el apartado de productos que definen la categoría, dividir este alcance (alimentos) estableciendo grupos que, el LAA como LNR, propone que estén basados en las diferentes sistemáticas de preparación de las muestras necesaria para ponerlas en disolución y posterior proceder a su cuantificación según las técnicas anteriormente mencionadas.

A continuación, como una propuesta orientativa de clasificación, se describen 6 grupos que abarcarían el total de las matrices alimenticias:

<i>Grupo 1 (G1)</i>	<i>Aguas de consumo, aguas continentales y bebidas refrescantes.</i>
<i>Grupo 2 (G2):</i>	<i>Bebidas alcohólicas de baja graduación y derivados.</i> Por ejemplo: vinos, vinagres, cervezas, sidras, etc.
<i>Grupo 3 (G3):</i>	<i>Bebidas alcohólicas de alta graduación, pero bajo contenido en azúcares^{1*}</i> Por ejemplo: ron, vodka, ginebra, brandy, alcoholes, etc.
<i>Grupo 4 (G4):</i>	<i>Alimentos de alto contenido en humedad^{2*}(>50%)</i> Por ejemplo: cárnicos, pescados, hortalizas, frutas, zumos, conservas, leche, yogur, licores con alto contenido en azúcares y extractos de café al

	10 %.
<i>Grupo 5 (G5):</i>	Alimentos de bajo contenido en humedad ^{2*} ($\leq 50\%$) Por ejemplo: queso, cacao, mermelada, especias secas, aceites, frutos secos, cereales, legumbres, embutidos, té y similares, etc.
<i>Grupo 6 (G6):</i>	Sal

^{1*} Azúcares menor de 50g/l.

^{2*} Según las tablas de composición de alimentos publicadas por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

4.2. Preparación de las muestras

Una vez establecidos estos grupos, se proponen las siguientes preparaciones de muestras:

GRUPO 1 Aguas de consumo , aguas continentales y bebidas refrescantes..

- Dosificación directa en el Equipo
Muestras que no necesitan preparación: aguas y bebidas refrescantes sin gas, excepto bebidas de cola. Las aguas serán acidificadas añadiendo ácido nítrico del 65% para llevarlas a una concentración final de ácido de aproximadamente el 3% ó la misma concentración de ácido en que se preparen los patrones. En aguas con residuos en suspensión efectuar una centrifugación previa de la muestra a 5000 rpm, tomando el sobrenadante e indicando en el informe de ensayo que sólo se analiza la fracción soluble.
- Dosificación directa en el Equipo previa desgasificación
Muestras de bebidas gaseosas (agua con gas, tónicas...): hacer una desgasificación previa introduciendo un vaso de precipitados con un volumen aproximado de 50 mL de muestra en el baño de ultrasonidos durante aproximadamente 10 min.

GRUPO 2 (G2) Bebidas alcohólicas de baja graduación y derivados

- Dilución de la muestra previa al Equipo
Muestras de bebidas alcohólicas de baja graduación (vino, vinagre, sidra, cervezas...) y bebidas de cola. Diluir 1 mL de muestra en 10 g de ácido nítrico al 3%. La muestra se toma con pipetas desechables. En el caso de muestras con gas se realiza la desgasificación previa según lo indicado anteriormente.
- En caso que la bebida no sea nítida (vinos turbios, cervezas con cuerpo, etc....) se recomienda digerir la muestra para evitar posibles problemas en sistemas de entrada de muestra capilares como puede ser el nebulizador micro-concéntrico del ICP-MS.

GRUPO 3 (G3) Bebidas alcohólicas de alta graduación, pero bajo contenido en azúcares (< 50 g/L)

- Dosificación directa en el Equipo previa eliminación del alcohol

Muestras de bebidas alcohólicas de alta graduación (vodka, ginebra, ron, brandy, alcoholes...). Tomar 25 ó 50 mL de muestra y evaporar el alcohol por calentamiento hasta casi sequedad, luego se regenera el volumen inicial con ácido nítrico del 3% o concentración similar a la preparación de patrones.

PREPARACION DE MUESTRA PARA GRUPO 4 Y GRUPO 5

Digestión de la muestra previa a la cuantificación en el equipo instrumental. La preparación de las muestras se puede efectuar por digestión ácida en microondas o por vía seca (cenizas). Según el tipo de muestras se pesan o se toman volúmenes de alícuotas diferentes según el % de humedad.

Grupo 4 Alimentos de alto contenido en humedad (>50%):

Tipos de muestras: carnes, vísceras, peces, moluscos, crustáceos, verduras, hortalizas, frutas, leche, yogures, infusiones y similares, licores con alto contenido en azúcares y extractos de café del 10 % (estos últimos se preparan con la misma dilución del grupo, pero sin someterlos al procedimiento de digestión).

Grupo 5 Alimentos de bajo contenido en humedad (≤50%)

Tipos de muestras: aceites y grasas, cacao y derivados, productos lácteos y sus derivados (excepto leche y yogures), embutidos y productos cárnicos tratados por el calor, azúcares, féculas, cereales, legumbres, confituras, mermeladas, frutos secos, especies.

A) Digestión en microondas:

- GRUPO 4 (G4)

Se pesa 1 g de muestra.

Para las muestras de leche líquida, se puede pesar más cantidad.

- GRUPO 5 (G5)

Se pesa 0.5 g de muestra.

En el caso de aceites y de grasas tanto animales como vegetales, si se observan fenómenos de sobrepresión, se puede pesar menor cantidad (0,30 gramos).

A continuación se añaden 10 mL de ácido nítrico al 20% y tras media hora de espera se introducen los tubos en el microondas para su digestión. Para la mineralización de la materia orgánica se utiliza un microondas en el que se someten las muestras a altas presiones y temperaturas en vasos cerrados.

Para la digestión de las muestras grasas se añadirán 10 mL de ácido nítrico al 20% y 1 mL de agua oxigenada. Una vez digeridas las muestras se transfieren a frascos de polipropileno de 50 mL y se llevan a 30 g de peso con agua destilada.

Las diluciones finales de las muestras se pueden preparar por volumetría o gravimetría. Es importante reseñar que se aconseja preparar las diluciones por gravimetría, como queda indicado en el texto, ya que es un procedimiento más exacto, pero teniendo en cuenta que, según el procedimiento escogido, los patrones de la curva de calibración se deben preparar igual a las muestras.

Las diluciones y las pesadas de la muestra, así como los volúmenes de ácido indicados son orientativos, ya que pueden depender del tipo de microondas y de la instrumentación elegida. Las preparaciones de las muestras son estables, al menos, durante 48 horas en condiciones de refrigeración. Las muestras para la determinación de estaño se preparan utilizando los mismos procedimientos de digestión indicados anteriormente pero añadiendo entre 1 y 2 mL de ácido clorhídrico, para evitar procesos de precipitación.

B) Vía seca (a modo de ejemplo, se expone el siguiente proceso):

GRUPO 4 (G4) y GRUPO 5 (G5)

Pesar una cantidad de muestra suficiente para obtener como mínimo 1 gramo de muestra seca que variará en función del contenido en humedad. Las muestras deben pesarse en cápsulas o vasos de vidrio.

Añadir nitrato de magnesio, si se quiere determinar arsenico para evitar pérdidas por volatilización, y además acelera la calcinación produciendo cenizas más esponjosas. Añadir suficiente agua destilada para conseguir una consistencia pastosa. Mezclar y evaporar hasta sequedad en estufa de aire.

Quemar con lámpara de infrarrojo y a continuación introducir en mufla a $250^{\circ}\text{C}\pm 25^{\circ}\text{C}$ y aumentar la temperatura progresivamente, a razón de $50^{\circ}\text{C}/\text{hora}$, hasta $450^{\circ}\text{C}\pm 25^{\circ}\text{C}$. Continuar la mineralización hasta obtención de cenizas grises. Añadir 1 mL de ácido nítrico y aproximadamente 2 mL de agua destilada para el blanqueo de las cenizas. Repetir el proceso hasta obtención de cenizas blancas.

Para la determinación de arsénico en muestras con un contenido en cloruros $>200\text{ppm}$, es necesario mantener las condiciones de oxidación de forma constante en el tiempo, ya que se pueden producir pérdidas por volatilización en forma de tricloruro. Para ello, se añade un exceso de ácido nítrico y solo se quema la muestra cuando los cloruros se han eliminado en forma de nitrosil cloruro, por lo que a la vez de añadir el nitrato de magnesio se deben adicionar 20 mL de ácido nítrico.

Posteriormente, calentar en una placa eléctrica a reflujo durante 30 minutos. Quitar el vidrio de reloj y llevar a sequedad, introduciendo la muestra en la mufla y proceder como se ha descrito anteriormente.

En el caso de arsénico las cenizas se disuelven en ácido clorhídrico 6N.

Para la determinación de mercurio, debido a su alta volatilidad, se aconseja preparar siempre por digestión en microondas

GRUPO 6 (G6) Sal

Para la sal se pesa 0.5g y se diluye a 50 mL con agua desionizada.

5. PROCESO DE VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

Las características de funcionamiento de los métodos analíticos deben definirse y deben comprender todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destina.

Se consideran tres grupos de características:

- De fiabilidad
- De practicabilidad
- De idoneidad

5.1 Características de fiabilidad

Demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Hay cuatro criterios fundamentales:

1. Proporcionalidad entre concentración de analito y respuesta del instrumento.
2. Dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio o central (precisión, repetibilidad y reproducibilidad)
3. Diferencia entre el valor obtenido en el análisis y el valor verdadero (veracidad y exactitud)
4. Cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo.

Estos cuatro criterios se obtienen en el proceso de validación del método analítico.

5.2. Evaluación de la calidad de los ensayos

Al mismo tiempo es importante asegurar que los parámetros de calidad, obtenidos en el proceso de validación, se sigan manteniendo a lo largo del tiempo en el trabajo de rutina de aplicación de nuestro método analítico en el laboratorio. Esto se alcanza mediante un conjunto de actuaciones que permitan garantizar la calidad de nuestros resultados en condiciones normales y que también permitan detectar posibles causas de errores analíticos.

Por tanto, debe existir una estrecha relación entre validación y evaluación de la calidad de los ensayos, estableciendo para ello una serie de controles de calidad internos y unos criterios de aceptación en cada serie analítica.

Se debe recordar que la veracidad se expresa cuantitativamente en términos de "sesgo" y que puede determinarse:

1. Comparando la respuesta del método frente a un material de referencia certificado (MRC) con un valor conocido
2. Comparando la respuesta frente a un método de referencia normalizado

3. Con el uso de la técnica de la adición/recuperación.

En cada serie analítica se debe verificar que se siguen manteniendo la exactitud y el sesgo requerido y que, debido a la posible ausencia de materiales de referencia certificados (por otra parte, procedimiento excesivamente costoso), se puede comprobar mediante la técnica de adición/recuperación antes mencionada.

Se propone aplicar los siguientes controles de calidad, aunque cada laboratorio podrá aplicar los que considere más convenientes. Los más aconsejados son:

1. Un blanco con los mismos reactivos y preparado en las mismas condiciones que las muestras, para comprobar que no existen contaminaciones en el material y reactivos.
2. Muestras por duplicado para verificar la repetibilidad de los ensayos, al menos una dentro de cada serie analítica.
3. Una muestra con una adición de concentración lo más próxima posible al contenido de la muestra problema (siempre que este sea superior al LoQ). La adición se debe efectuar antes de preparar o digerir las muestras. La recuperación obtenida nos permite saber si la matriz está interfiriendo en la lectura de algún elemento o si ha habido pérdidas del analito.
4. Cada diez muestras y al principio y final de la serie analítica se realiza el control que consiste en la lectura del blanco o punto cero de la curva. Sirve para comprobar que no hay efecto memoria.
5. Cada diez muestras y al comienzo y al final de la serie analítica se realiza un control que consiste en leer una solución que es de concentración similar al patrón de concentración media de la curva de calibrado pero obtenida mediante otra preparación. Sirve para comprobar la vigencia de la curva de calibrado durante toda la serie.
6. Previamente a la lectura de las muestras se realiza el control de un patrón de verificación de baja concentración. Este control de calidad nos permite verificar que la lectura de los elementos que están en bajas concentraciones se está realizando correctamente. También, se puede calcular la concentración equivalente en el primer estándar de calibración, es decir el error residual, y si es correcto, no haría falta dicha solución, ya que quedaría comprobada la lectura a bajas concentraciones.

6. VALIDACIONES NECESARIAS Y CRITERIOS A APLICAR.

Una vez establecidos los seis grupos de muestras en base a su preparación analítica, sería necesario establecer unos criterios sobre el número de validaciones necesarias dentro de cada grupo, atendiendo a las diferentes matrices existentes en los mismos.

Previamente la categoría de ensayo en ALIMENTOS, se ha establecido:

1. División de la categoría del ensayo “ALIMENTOS” en grupos basados en los distintos procedimientos de preparación de muestras.
2. División posiblemente de familias dentro de cada grupo.
3. Validaciones por matrices representativas dentro de cada familia.

Dependiendo de la preparación muestra y de las interferencias de matriz o espectrales que pueden afectar a la técnica de cuantificación empleada

>interferencias > N° de familias a validar

CATEGORIA DE ENSAYO “ALIMENTOS”

<u>División en grupos según su preparación de muestras</u>					
G1	G2	G3	G4	G5	G6
<u>Clasificación inicial de matrices o familias representativas dentro de cada grupo</u>					
Agua	Vino	Ginebra	Carne	Aceite	Sal
			Pescado	Harina	
			Vegetal		

Validación de estas familias o matrices representativas con la obtención de los parámetros de calidad de repetibilidad (r), reproducibilidad (R), recuperación (R%) y LoQ .

Definición de familias:

1. Una familia se define como: “conjunto de matrices que se comportan igual en el proceso de validación”.
2. Cada familia tendrá unos parámetros (r, R, R % y LoQ) que servirán para caracterizarlas.
3. Dos familias se consideran diferentes cuando sus parámetros estadísticos \pm error son significativamente diferentes.
4. Las diferencias en composiciones de las matrices, sobre todo en cuanto al contenido de aniones y cationes, son las principales fuentes que producirían discrepancias en cuanto a los parámetros estadísticos originando familias diferentes.

El aplicar este protocolo a las diferentes técnicas instrumentales de espectrometría estudiadas anteriormente y que los tipos de familias seleccionados anteriormente sean suficientes para la validación de la categoría es posible, en función de la mayor o menor facilidad disponible para detectar los diferentes tipos de interferencias a que están sometidos estos métodos de cuantificación y que nos podrían llevar a la obtención de resultados erróneos.

Pero:

- Las **interferencias de matriz** se detectan fácilmente estudiando las **recuperaciones**. (F-AAS, ET-AAS, CV-AAS).
- Las **interferencias espectrales** se detectan haciendo previamente un estudio de las posibles líneas espectrales cercanas a la longitud de onda seleccionada para el elemento estudiado. (ICP-AES). Para ello, en el estudio previo de optimización del método analítico, se comprueban la existencia de estas posibles interferencias espectrales, mediante un control de interferencias a un nivel de concentración próximo al nivel de cuantificación del elemento interferido y adicionando diferentes niveles de concentración del elemento que forma el compuesto interferente, de tal forma que abarquen el contenido habitual de estos elementos en las matrices agroalimentarias.

El LAA opina que las matrices representativas seleccionadas dentro de los grupos anteriores para realizar una validación completa, en principio, es suficiente para abordar este alcance de acreditación, ya que si en los procedimientos normalizados de trabajo se establecen unos controles de calidad suficientes para analizar matrices nuevas, de manera que estudiando dos adiciones a diferentes concentraciones, siendo una de ellas a nivel próximo del LoQ, y obteniendo resultados correctos, de acuerdo a los criterios establecidos previamente, para la recuperación (80- 120%), repetibilidad y reproducibilidad (Horwitz), no sería necesario realizar una nueva validación completa, pues no serían familias diferentes de las previamente validadas.

Solo en el caso que la respuesta del control de calidad no fuera correcta, sería necesaria una validación completa de una familia diferente.

6.1 Protocolo de validaciones

A continuación se indican las diferentes opciones de validación propuestas:

6.1.1 Validación de un nuevo elemento (Opción 1):

- a) Se procederá a obtener la linealidad de la recta de calibrado y que cumpla con los criterios establecidos previamente por el laboratorio, si es un procedimiento con calibración externa y lineal.
- b) Si existe material de referencia certificado (MRC) de este elemento en la matriz requerida u otra matriz, se procederá a estudiar su veracidad. Se estudiarán las muestras adicionando patrón a tres niveles diferentes de concentración (bajo, medio y alto) para establecer el rango de trabajo. Se analizarán por duplicado, en

cinco días diferentes, y se estudiarán las recuperaciones obtenidas, que deben cumplir con los criterios previamente establecidos.

- c) Obtención del Coeficiente de Variación de la Reproducibilidad (CV_R %) y de la reproducibilidad (CV_r %) de los análisis de las muestras realizados en cinco días diferentes y a tres niveles de adición.

6.1.2. Validación de una matriz en un grupo no validado de un elemento incluido en la LEBA (Opción 2):

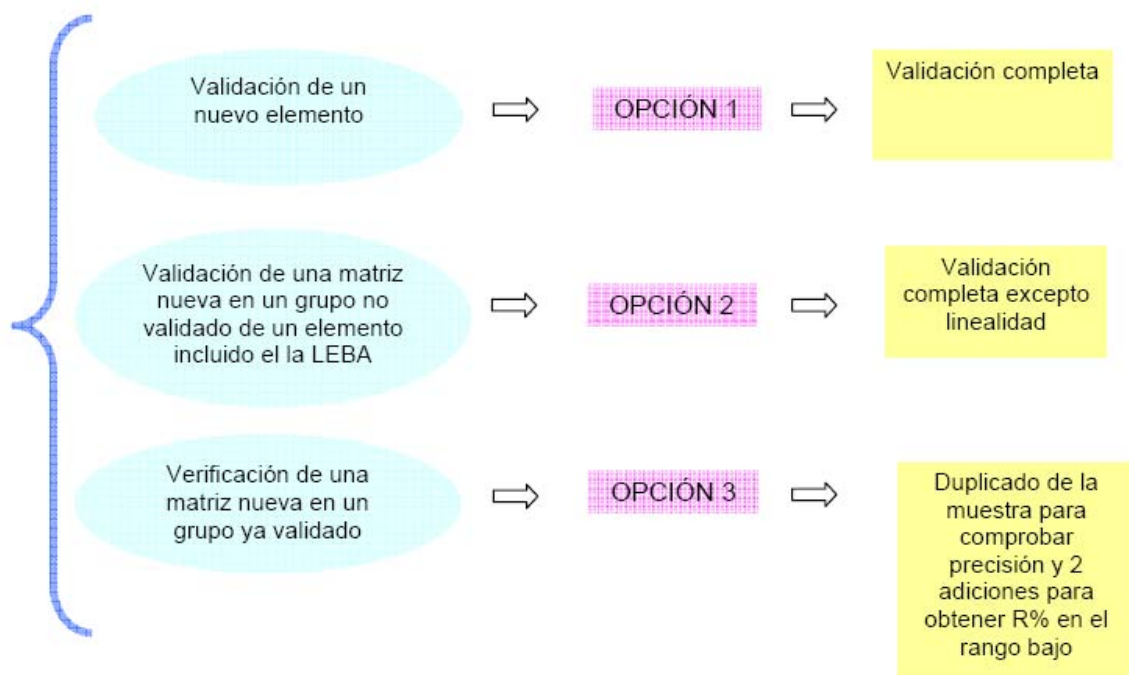
Para validar una matriz incluida en un grupo no validado, se debe obtener el CV_R %, CV_r % y la recuperación en el rango de trabajo a tres niveles diferentes en cinco series en días diferentes.

Si se dispone de los datos anteriores en tres grupos ya validados sólo será necesario realizar 3 series, siempre y cuando entre estos grupos ya validados se encuentren el 4 o el 5.

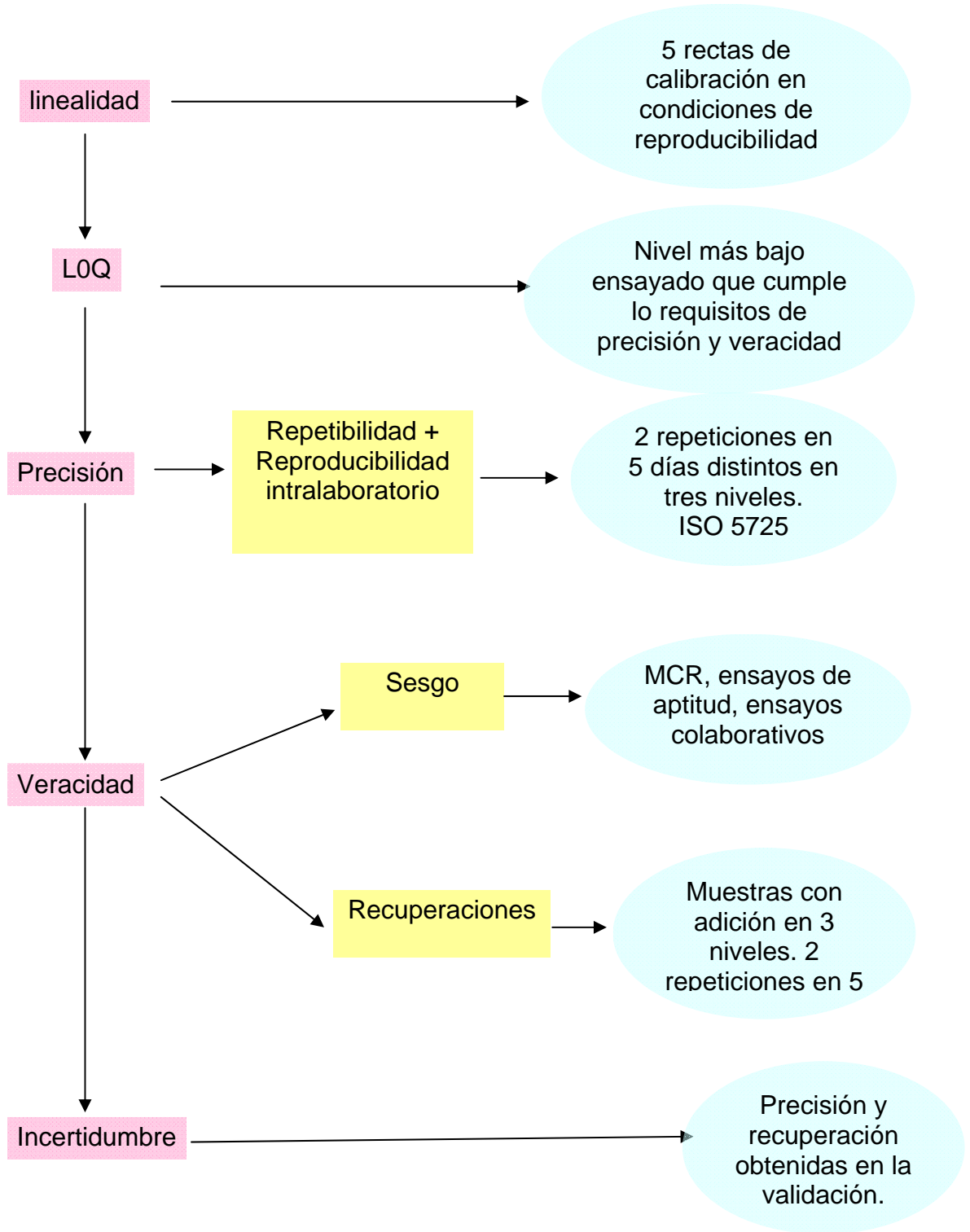
6.1.3. Verificación de una matriz nueva en un grupo ya validado (Opción 3):

Proceder a verificar la matriz mediante la repetición de muestra para comprobar la repetibilidad y adicionar dos o más niveles diferentes de concentración, calculando las recuperaciones obtenidas con concentraciones siempre por encima del nivel natural de concentración del elemento en la muestra, para comprobar la exactitud. Una de las adiciones debe ser similar al contenido natural del elemento en la muestra, que será el límite de cuantificación.

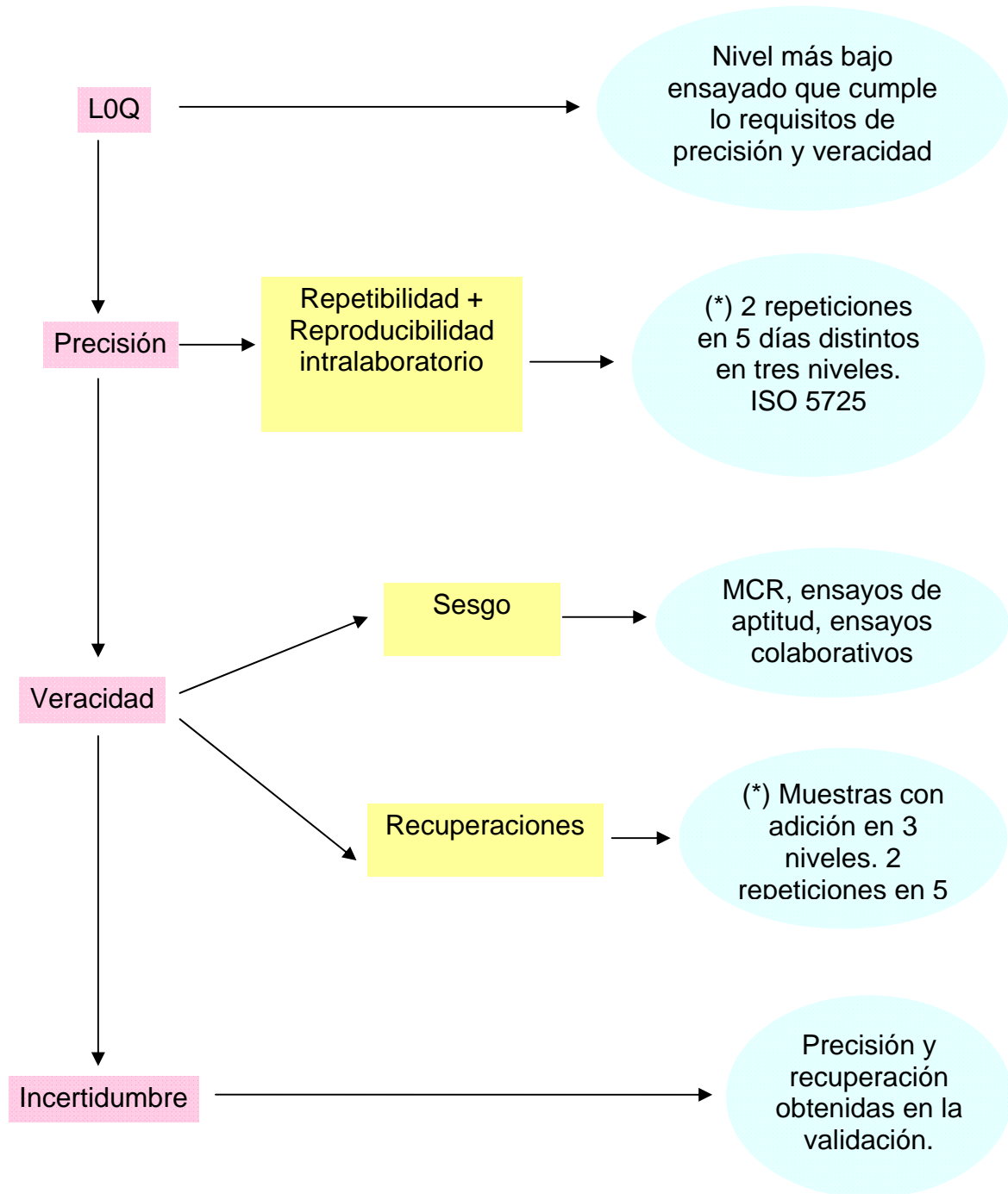
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN NT 18



OPCIÓN 1 (elemento no incluido en la LEBA)

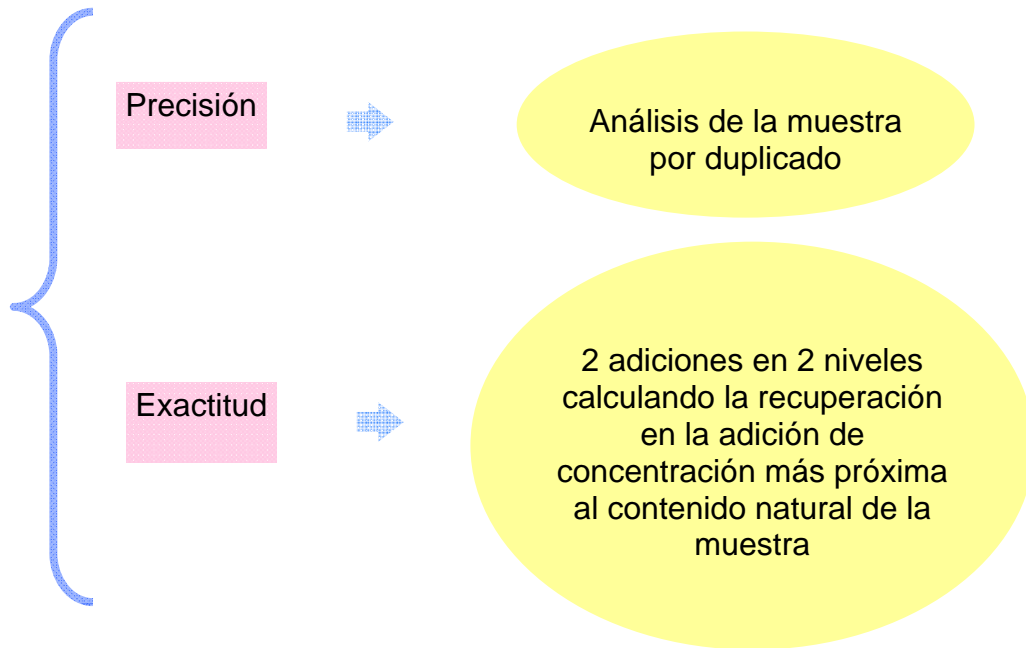


OPCIÓN 2 (elemento incluido en la LEBA en grupo no validado)



(*) Si se trata de un elemento validado previamente en 3 o más grupos el análisis se llevará a cabo en 3 días distintos en lugar de 5

OPCIÓN 3 (matriz nueva en elemento y grupo incluidos en la LEBA)



7. CONCLUSIONES

Para facilitar la implantación de alcances flexibles para categorías de ensayo en alimentos para estas técnicas instrumentales, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario como Laboratorio Nacional de Referencia para la detección de contaminantes metálicos en alimentos y piensos, propone:

1. Establecer grupos de matrices de alimentos basados en las diferentes sistemáticas de preparación de las muestras, según el protocolo anterior de trabajo
2. Obtener los parámetros de validación completa para las matrices más representativas dentro de cada grupo indicado anteriormente.
3. Aplicar las diferentes opciones de validaciones estudiadas anteriormente, para incluir matrices y elementos nuevos en la LEBA.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Entidad Nacional de Acreditación ENAC: NT-55 *“Laboratorios de referencia de la UE y nacionales dentro del sistema de acreditación de laboratorios agroalimentarios”*
- Reglamento (CE) N° 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 *sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.*
- Directiva Comunitaria 96/23/CE de 29 de abril, donde se *especifican las medidas de control y organización relativas a las sustancias o a sus metabolitos y los grupos de residuos.*
- Decisión de la Comisión 2006/130/CE de 10 de febrero de 2006, *que designa los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) para la detección de residuos en animales vivos y sus productos.*
- Lista de Laboratorios Comunitarios de Referencia y Nacionales de Referencia de SANCO de la Comisión Europea de 2011.