



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)

**VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE METALES
PESADOS CON ICP-MS e ICP-AES: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS
ESPECTRALES**

Madrid, a 23 de mayo de 2013

<u>INDICE</u>	
	Página
1. INTRODUCCIÓN	3
2. INTERFERENCIAS ESPECTRALES	3
3. MÉTODO ICP-MS	4
3.1 Selección de los isótopos a cuantificar	4
3.2 Verificación de las interferencias	5
3.3 Ejemplo	5
3.3.1 Masas seleccionadas	5
3.3.2 Identificar los elementos mayoritarios que pueden formar interferencias poliatómicas	6
3.3.3. Con la ayuda de las tablas de composición de alimentos, estudiar las concentraciones de los elementos que forman el compuesto interferente en muestras alimentarias	6
3.4 Verificar que estas interferencias están siendo eliminadas eficazmente	7
3.5 Cuantificar las soluciones con el equipo ICP-MS	7
3.6 Estudio del criterio de aceptación para el %R obtenido	7
4. MÉTODO ICP-AES	8
4.1 Selección de la línea analítica	8
4.2 Verificación de las interferencias	8
4.3 Ejemplo	9

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 Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), ha publicado la “*Nota Técnica NT-55: Laboratorios de Referencia en el sector agroalimentario: política sobre participación en el sistema de acreditación*”, en la que se especifica que, esta Entidad, 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 de la Unión Europea o del propio Laboratorio Europeo de Referencia.

Asimismo, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario, ha sido designado LNR para la detección de residuos de elementos químicos -Grupo B3c-, según Decisión de Ejecución de la Comisión 2011/717/UE, de 27 de febrero de 2011 y para la detección de metales pesados en alimentos de origen vegetal y piensos, de acuerdo a la lista SANCO de la Comisión Europea sobre los LNR.

Por ello, este Laboratorio, como LNR, ha considerado oportuno estudiar algunas de las posibles causas instrumentales que pueden influir en los resultados analíticos, entre las que se encuentran las interferencias espectrales. Por ello, ha elaborado este documento, en el que se intenta clarificar dichas interferencias, a la vez que se presentan algunas propuestas para eliminarlas y/o minimizar su impacto.

2.- Interferencias Espectrales

En la *Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)*, las interferencias espectrales se deben a la existencia de elementos o compuestos con la misma relación masa/carga que el isótopo de interés. Las interferencias debidas a iones atómicos se denominan interferencias isobáricas o monoatómicas y las interferencias debidas a iones moleculares se denominan interferencias poliatómicas.

Las interferencias poliatómicas, en los primeros equipos de ICP-MS, eran corregidas mediante ecuaciones de corrección, introducidas por el usuario en el software del equipo. En la actualidad, la mayoría de los equipos de ICP-MS cuentan con sistemas para la eliminación de estas interferencias, como son las celdas de colisión/reacción.

Independientemente de la solución adoptada, hay que verificar que estas interferencias están siendo eficazmente eliminadas (mediante celda de reacción/colisión) o corregidas (mediante ecuaciones).

En la Espectrometría de Emisión Atómica con un Plasma de Acoplamiento Inductivo ICP-AES, la principal desventaja, es la posibilidad de solapamiento espectral y la influencia de la radiación de fondo de otros elementos y del propio gas plasmógeno.

Aunque la mayoría de los instrumentos de ICP-AES utilizan una óptica de alta resolución y corrección de fondo para minimizar estas interferencias, los análisis de trazas de metales en presencia de un gran exceso de un determinado metal revisten dificultades.

Las *interferencias espectrales* pueden ser originadas por:

1. Solapamiento de una línea espectral de otro elemento.
2. Solapamiento con un espectro molecular.
3. Señal de fondo originada por la recombinación de iones y electrones del gas plasmógeno.
4. Luz dispersa de las líneas de emisión de elementos presentes a elevadas concentraciones.

A este respecto, el solapamiento espectral puede compensarse por corrección de los datos dudosos con un programa de filtrado de señales después de monitorizar y medir el elemento interferente, en algunos casos puede elegirse otra longitud de onda para la medida.

La contribución de la señal de fondo y la radiación dispersa puede compensarse utilizando una corrección de fondo adyacente a la línea del analito.

A continuación, se presentan propuestas para llevar a cabo estas verificaciones.

3.- Método ICP-MS

3.1 Selección de los isótopos a cuantificar.

En la puesta a punto de un método en ICP-MS se suelen seleccionar los isótopos atendiendo a los siguientes criterios:

- Mayor abundancia isotópica.
- Evitar, en la medida de lo posible, las interferencias espectrales isobáricas relevantes.
- Mínimas interferencias poliatómicas.

Si se cuenta con un sistema de eliminación de interferencias poliatómicas (celda de colisión/reacción) se suele dar prioridad a evitar las interferencias isobáricas y a elegir el isótopo con mayor abundancia isotópica. En cambio, si las interferencias son corregidas mediante ecuaciones introducidas por el usuario, en ocasiones hay que escoger un isótopo de menor abundancia isotópica para evitar las interferencias poliatómicas, que si son muy importantes, a veces, no se pueden corregir con ecuaciones matemáticas (Ej. ^{57}Fe en lugar de ^{56}Fe).

3.2 Verificación de las interferencias

A partir de bibliografía o información proporcionada por el software del ICP-MS, estudiar las posibles interferencias espectrales que pueden afectar a nuestro análisis. Seguidamente estudiar la concentración de esos elementos interferentes en la preparación final de la muestra teniendo en cuenta la dilución realizada.

Verificar que estas interferencias están siendo eficazmente eliminadas (mediante celda de reacción/colisión) o corregidas (mediante ecuaciones), para las concentraciones de los elementos interferentes mayoritarios presentes en las matrices que se quieren validar.

Hay diferentes posibilidades:

- ✚ Hacer un estudio de interferencias con soluciones sintéticas con concentraciones conocidas de los elementos que forman los compuestos interferentes.
- ✚ Adición del elemento que forma el compuesto interferente sobre una matriz en blanco igual a la muestra estudiada.

Debido a la dificultad de encontrar matrices en blanco en alimentos, se propone la primera opción, para ello, se preparan soluciones con una concentración aproximadamente en el límite de cuantificación (LoQ) del elemento que se está validando y con concentraciones crecientes del elemento que forma el compuesto interferente, teniendo en cuenta la concentración de ese elemento que podemos encontrar en las matrices que analizamos y la dilución que efectuamos a la muestra.

Es recomendable estudiar concentraciones crecientes del elemento que forma el compuesto interferente para ver a qué concentración la interferencia deja de ser corregida/eliminada eficazmente.

Estudiar la recuperación del elemento que se está analizando en estas soluciones y comprobar si cumple con los criterios de aceptación preestablecidos para el % de recuperación (% R).

3.3. Ejemplo

Validación de As, Cu, Fe y Cr en alimentos mediante ICP-MS con celda de reacción/colisión.

3.3.1 Masas seleccionadas

- ⁷⁵As: monoisotópico
- ⁶³Cu: isótopo mayoritario (69,17%), sin interferencias isobáricas
- ⁵⁶Fe: isótopo mayoritario (91,72%), sin interferencias isobáricas
- ⁵²Cr: isótopo mayoritario (83,79%), sin interferencias isobáricas

3.3.2 Identificar los elementos mayoritarios que pueden formar interferencias poliatómicas.

En las matrices de alimentos, los principales elementos mayoritarios que pueden formar intereferencias poliatómicas son: **Ca, Cl, C, Na, P, S, K.**

Identificar las interferencias poliatómicas más importantes para las masas seleccionadas.

Isótopo	Compuesto interferente
⁵⁶ Fe	⁴⁰ Ca ¹⁶ O
⁷⁵ As	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl
⁵² Cr	⁴⁰ Ar ¹² C
⁶³ Cu	⁴⁰ Ar ²³ Na, ³¹ P ¹⁶ O ₂

3.3.3. Estudiar las concentraciones de los elementos que forman el compuesto interferente en muestras alimentarias, con la ayuda de tablas de composición de alimentos*¹.

Se buscan aquellas matrices que pueden tener una concentración mayor para cada elemento.

Ejemplo de matrices seleccionadas:

Elemento	Concentración	Dilución de la muestra	Concentración en la dilución
Ca	1% (algunos quesos)	1 a 50 g	200 ppm
Cl	10% (salazones)	1 a 50 g	0.2 %
¹² C	20% de C (Aguardiente)	1 a 20 g	1%
Na	7% (salazón)	1 a 50 g	0.2 %
P	0.8% (algunos quesos)	1 a 50 g	160 ppm

*¹ Por ejemplo, tablas de la AESAN publicadas en la base de datos <http://www.bedca.net/>

*² Cuando la matriz sufre un proceso de mineralización previa al análisis en el ICP-MS, la materia orgánica se transforma en CO₂ y H₂O, quedando en la solución el carbono residual en una concentración relativamente baja. En el caso de las bebidas alcohólicas, si se preparan por dilución sin que haya una mineralización de la muestra, el carbono presente en la muestra diluida será el que forma parte del etanol y su concentración será mucho mayor que en un digerido, por esa razón tomamos el aguardiente como matriz de referencia para concentraciones altas de carbono.

3.4. Verificar que estas interferencias están siendo eliminadas eficazmente, para la concentración de los elementos mayoritarios presentes en las matrices que se quieren validar

Para ello hacemos un estudio de las interferencias utilizando soluciones sintéticas, preparando soluciones con adiciones del elemento que forma el compuesto interferente a 3 ó 4 niveles que abarquen la concentración presente en los alimentos, añadiendo una concentración próxima al LoQ del analito que se va a validar. Se comprueba sólo en el LoQ porque, al ser la interferencia constante, cuanto mayor sea la concentración del analito de interés menos se verá afectado.

Ejemplo de preparación de soluciones:

Elemento	Adiciones del analito (LoQ)	Adiciones del elemento que forma el compuesto interferente			
		Solución 1	Solución 2	Solución 3	Solución 4
⁵⁶ Fe	10 ppb Fe	+50 ppm de Ca	+100 ppm de Ca	+200 ppm de Ca	+1000 ppm Ca
⁷⁵ As	0,4 ppb As	+120 ppm Cl	+0.12 % Cl	+0.6 % Cl	+1.2 % Cl
⁵² Cr	0.5 ppb Cr	+0.1 % C	+0.5 % C	+1 % C	+3 % C
⁶³ Cu	1 ppb Cu	+100 ppm de Na	+500 ppm de Na	+0,1% de Na	+0.5% Na
⁶³ Cu	1 ppb Cu	+50 ppm de P	+100 ppm de P	+200 ppm de P	+1000 ppm P

3.5 Cuantificar las soluciones con el equipo ICP-MS

Las soluciones preparadas tal y como se describen en el apartado 3, se cuantifican en el equipo y posteriormente se estudia la recuperación del elemento de interés obtenida en estas soluciones. Comprobar que cumple con los criterios de aceptación preestablecidos para el %R.

Ejemplo de %R obtenidos para el estudio de la interferencia cloruro de argón (ArCl) en el As:

			Concentración leída				
Isótopo	adición		0% Cl	120 ppm Cl	0,12% Cl	0,6% Cl	1,2 % Cl
As	75	0,4	0,41	0,40	0,37	0,45	0,62
			Recuperación				
Isótopo		0,4	0% Cl	120 ppm Cl	0,12% Cl	0,6% Cl	1,2 % Cl
As	75	0,4	102,25	98,96	91,50	109,44	150,73

3.6 Estudio del criterio de aceptación para el %R obtenido

Si el criterio de %R es entre 90-110%, consideramos que nuestro método es apto para medir As en muestras con concentraciones próximas al LoQ de 0,4 ppb en matrices con una concentración de Cl de hasta del 0,6%.

4.- Método ICP-AES

4.1. Selección de la línea analítica

Principalmente se selecciona la línea analítica del elemento en función de su sensibilidad, eligiendo la de mayor intensidad de emisión.

4.2. Verificación de las interferencias

A continuación, se indican diferentes procedimientos para verificar que esa línea seleccionada es apropiada:

1. Escanear la línea de una solución de concentración del analito seleccionado conteniendo otros elementos en el rango de concentración de la muestra de interés.
2. Una buena forma de controlar las interferencias espectrales en una muestra objeto de análisis es introducir un programa en el equipo que cuantifique el elemento a distintas longitudes de onda, usando las soluciones patrones de calibración del elemento. Si el resultado analítico difiere significativamente de una línea a otra, se debe seleccionar la que indica menor concentración.

Las interferencias espectrales solamente producen un aumento de la respuesta del equipo, por eso una línea sujeta a interferencias produce un error de exceso de concentración del elemento.

Principales Longitudes de onda recomendadas e interferencias espectrales en ICP-AES:

Elemento longitud de onda (nm)	Interferencia
Arsénico 193.696	Al, Cr, V
Cadmio 226.502	Fe, Ni
Cromo 267.716	Mn, V
Cobre 324.754	Tl, V
Plomo 220.353	Al
Níquel 231.604	Co
Zinc 213.856	Cu, Ni

4.3. Ejemplo

Determinación de Cd 226.502 nm

Se calibró el equipo de ICP-AES para ese analito de interés, usando estándar monoelemental y se analizó la siguiente secuencia:

- a) Analito de interés a un nivel de concentración próximo al LoQ.
- b) Analito de interés en presencia de un solo elemento interferente (Fe).
- c) Analito de interés a dos niveles de concentración en presencia de varios elementos interferentes (Fe y Ni).
- d) Estudiar las recuperaciones obtenidas siguiendo el mismo procedimiento del ICP-MS.