



MINISTERIO  
DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA  
SUBDIRECCION GENERAL DE CONTROL DE LA CALIDAD  
ALIMENTARIA Y LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

*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)

**ANÁLISIS DE ELEMENTOS PARA CATEGORIAS DE ENSAYO NT18 O ALCANCES  
ABIERTOS PARA MATRICES MEDIANTE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA O  
DE MASAS**

**PROTOCOLO DE VALIDACIONES PARA ANÁLISIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS.**

## INDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS</b>	<b>4</b>
2.1 Espectrometría Atómica	4
2.1.1 Espectrometría Absorción Atómica	4
2.1.1.1 Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (F-AAS)	5
2.1.1.2 Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ET-AAS)	5
2.1.1.3 Espectrometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros (HG-AAS)	5
2.1.1.4 Espectrometría de Absorción Atómica con Vapor Frío (CV-AAS)	5
2.1.1.5 Analizador elemental de Hg mediante descomposición térmica, amalgamación y detección por Espectrometría de Absorción Atómica.	5
2.1.2 Espectrometría de Emisión Atómica	5
2.1.2.1 Espectrometría de Emisión con Llama (F-AES)	5
2.1.2.2 Espectrometría Atómica de Emisión con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)	5
2.1.2.3 Espectrometría de Fluorescencia (AFS)	6
2.2 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)	6
<b>3. ACREDITACIÓN PARA ALCANCES ABIERTOS MEDIANTE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA O DE MASAS</b>	<b>7</b>
3.1 Definición de la LEBA en grupos de matrices	8
<b>4. PROCESO DE VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD</b>	<b>8</b>
4.1 Validación de los métodos analíticos.	8
4.2 Evaluación de la calidad de los ensayos	9
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>12</b>
<b>ANEXO: EJEMPLOS DE VALIDACIÓN PARA ALCANCES ABIERTOS</b>	
Elementos químicos en alimentos y piensos mediante técnicas de espectrometría atómica o de masas según nt-18. EJEMPLO 1	
Elementos químicos en alimentos y piensos mediante técnicas de espectrometría atómica o de masas según nt-18. EJEMPLO 2	
Análisis de elementos en alimentos mediante ICP-MS. Alcance cerrado a elementos y abierto a matrices. EJEMPLO 3	
Notas generales para la validación de elementos mayoritarios	

## 1. INTRODUCCIÓN

El artículo 101 del Reglamento (UE) 2017/2017 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, establece las funciones y responsabilidades de los laboratorios nacionales de referencia (LNR), 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), destaca la contribución de los LNR 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 LNR 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, en lo posible, asegurar la disponibilidad de materiales de referencia, 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 LNR de cualquier Estado Miembro o el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) 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 EURL respectivo, salvo indicación expresa en la legislación al respecto.

El Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) de la Subdirección General de Control de la Calidad Alimentaria y Laboratorios Agroalimentarios de la Dirección General de la Industria Alimentaria, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, ha sido designado LNR para la determinación de residuos de elementos químicos (Grupo B3c) según la Decisión de la Comisión 2016/1365/UE de 9 de agosto de 2016, y también para la detección de metales pesados en alimentos de origen vegetal y piensos, conforme al listado de LNR de SANTE de la Comisión Europea.

El presente trabajo tiene por objeto presentar un protocolo o procedimiento sencillo de preparación de muestras para determinación de elementos químicos en alimentos para categorías de ensayo según Nota Técnica NT-18 de ENAC aplicados a las técnicas de espectrometría atómica o espectrometría de masas, así como proporcionar unas pautas para establecer las validaciones necesarias.

Este documento ha sido consensuado en el Grupo de Trabajo de Análisis de Metales Pesados en alimentos, coordinado por el LAA y tiene como fin facilitar la implantación de los alcances

flexibles para la determinación de estos elementos en los laboratorios españoles que intervienen en el control oficial de alimentos.

Este documento se considera una **guía orientativa** que pretende facilitar el trabajo de validación de los laboratorios de control de elementos químicos en alimentos, pero en ningún caso implica que otras agrupaciones de matrices o procedimientos de validación no sean válidos.

## 2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

**2.1. Espectrometría Atómica:** técnica que mide la luz absorbida o emitida por un átomo al pasar del estado fundamental al estado excitado y viceversa. En función de ello, se clasifica en:

*Espectrometría de Absorción Atómica:* 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

*Espectrometría de Emisión Atómica:* 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  
Espectrometría de Fluorescencia Atómica AFS

### 2.1.1. Espectrometría de Absorción Atómica:

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

Es una técnica monoelemental. Está sujeta a muchas interferencias 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)

Es una técnica monoelemental. Su sensibilidad es muy superior a las F-AAS. Está sujeta a las interferencias de matriz descritas anteriormente, pero agudizadas ya que se volatiliza una gran cantidad de muestra en un espacio pequeño, por lo que las moléculas presentes pueden absorber la radiación en la región del analito. Presentan, además, mucho efecto memoria. Hay

distintos procedimientos para intentar evitar dichos problemas como utilizar tubo de grafito con plataforma o una curva de adición.

#### 2.1.1.3. Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HG- AAS)

Técnica monoelemental limitada a elementos refractarios que utiliza un agente reductor (borohidruro sódico o cloruro de estaño) que reduce las especies del elemento a su estado elemental, el cual es volátil y es arrastrado por argón hasta la celda de medida. Presenta una alta sensibilidad, pero, en presencia de altas concentraciones de los metales de transición, está sometida a interferencias químicas. Estas interferencias se pueden minimizar controlando la acidez del medio y la concentración del reductor.

#### 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 que reduce el mercurio a su estado elemental, el cual es volátil y es arrastrado por argón hasta la celda de medida. A diferencia de la generación de hidruros, debido a la alta volatilidad de Hg, la reacción no necesita aumentar la temperatura.

#### 2.1.1.5. Analizador elemental de Hg mediante descomposición térmica, amalgamación y detección por Espectrometría de Absorción Atómica.

Con esta técnica, las muestras se pesan directamente en recipientes adecuados, sin un tratamiento previo excepto la homogeneización de la muestra, y se descomponen térmicamente en el sistema en una atmósfera de oxígeno o aire comprimido a unos 700 °C (combustión o descomposición). Los gases de reacción resultantes se limpian catalíticamente junto con el vapor de Hg, y el Hg se concentra, posteriormente, en una amalgama de oro. Seguidamente, el Hg se libera mediante el calentamiento rápido de la amalgama, se transfiere a un sistema de cubetas de medición y se cuantifica por absorción a 253,7 nm. Este sistema permite eliminar, en gran medida, las interferencias de la matriz, ya que el mercurio, al unirse a la amalgama, se separa selectivamente de otros productos de descomposición.

### **2.1.2. Espectrometría de Emisión Atómica:**

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

Presenta la ventaja de que la llama actúa como fuente de excitación, no necesitando 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 presenta muchas interferencias químicas.

#### 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:

- Aplicable a un gran número de elementos.

- Una reproducibilidad de hasta 0,3% en los mejores casos.

- Buena exactitud.

- Técnica multielemental.

- Pocos efectos de matriz o químicos.

- Amplio rango lineal de concentración, cubriendo varios órdenes de magnitud.

Las técnicas de plasma son muy robustas porque el plasma se mantiene muy estable frente a los cambios en la matriz. Esto significa que la temperatura, la densidad electrónica y la distribución espacial de las diferentes especies no se ven, en general, alteradas.

Por esta razón, se considera que el ICP-AES es una técnica en la que el efecto matriz es mucho menor que en la técnica de AAS. El efecto matriz dependerá, además, del tipo de nebulizador utilizado y del tipo de plasma (vista radial o axial). Si se observan efectos de matriz, se recomienda el uso de un patrón interno adecuado para minimizarlos.

Sin embargo, el ICP-AES presenta espectros de emisión complejos sujetos a interferencias espectrales, por lo que es importante tener equipos con una alta resolución y seleccionar adecuadamente las longitudes de onda no interferidas.

### 2.1.2.3 Espectrometría de Fluorescencia (AFS)

Es una técnica de emisión con gran sensibilidad en la región ultravioleta. La fluorescencia atómica es la emisión óptica de átomos en la fase de gas que, previamente, han sido excitados a niveles más altos de energía por absorción de radiación electromagnética. La AFS es una técnica que cuantifica a nivel de trazas. Su mayor sensibilidad es para el mercurio, el zinc y el selenio.

Las técnicas de determinación de mercurio con AFS previa generación del vapor frío (CV-AFS) se vienen utilizando extensamente para la cuantificación de mercurio total. Esta técnica presenta detección muy bajas y amplio rango dinámico lineal. Esto hace que el CV-AFS sea una poderosa herramienta analítica y la instrumentación requerida es mucho más simple que la necesaria para las técnicas de espectrometría de masas

## 2.2 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)

Mediante ICP-MS los átomos presentes en la muestra se ionizan en un plasma de argón y se separan en un espectrómetro de masas según su relación masa/carga.

Las características del ICP-MS hacen que tenga menos interferencias de matriz que el resto de técnicas. Además, se corrigen más fácilmente, principalmente, debido a que se puede trabajar añadiendo varios patrones internos que se seleccionan teniendo en cuenta tanto la masa como el potencial de ionización del analito que se va medir.

También existen otros factores que explican el menor efecto matriz para el ICP-MS, como el uso de micro-nebulizadores, o de sistemas de auto-dilución con gases inertes (según qué marca comercial, puede ser conocido como introducción de muestras con alta matriz).

Finalmente, los métodos de análisis que utilizan ICP-MS presentan también pocas interferencias espectrales por lo que es la técnica con menos interferencias. Hay diferentes sistemas para la corrección o disminución de las interferencias espectrales, como pueden ser las celdas de colisión y reacción.

### 3. ACREDITACIÓN PARA ALCANCES ABIERTOS MEDIANTE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA O DE MASAS.

Este apartado incluye la acreditación para:

- Alcances abiertos a elementos y matrices según la nota técnica 18 (NT 18) de ENAC.
- Alcances abiertos a matrices (considerando el alcance cerrado alimentos y/o piensos como un alcance abierto a matrices), pero cerrados a elementos. En el análisis de elementos químicos en alimentos y piensos, a menudo, los laboratorios de control oficial LCO pueden agilizar mucho su trabajo planteando un alcance cerrado a los elementos químicos que contempla la legislación, pero abierto para matrices. Este enfoque es especialmente recomendable cuando se utiliza la técnica ICP-MS combinada con digestiones en microondas, que hace que las matrices se comporten de manera muy similar, haciendo innecesario llevar a cabo validaciones exhaustivas en lo que se refiere al número de matrices. Por este motivo, en este documento se plantea la posibilidad de adoptar alcances flexibles basados en las definiciones de la NT-18, pero cerrando los analitos o parámetros.

En la NT 18 de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) *Laboratorios de Ensayo: Acreditación para Categorías de Ensayo*, se especifica:

En el punto 4.- Definiciones

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

Producto o material a ensayar (p.ej. agua residual, acero, etc.)

Parámetro a determinar (p.ej. cobre, pH, etc.)

Técnicas o método de medida (p.ej. absorción atómica, polarimetría, etc.)

Los intervalos o capacidades de ensayo.

**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 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).

Por tanto, para definir la LEBA, Se seguirán los siguientes pasos:

- Se establecerá la familia de parámetros o analitos (p.ej. elementos químicos o metales). En el caso de optar por un alcance cerrado a elementos, se detallarán los que están incluidos en el alcance.
- Se definirá la familia de matrices que forma la categoría de ensayo, que puede ser de una manera amplia (p. ej. alimentos, aguas de consumo y continentales, piensos y sus materias primas, etc.) o más acotada (como familias de alimentos como por ejemplo Frutas y Hortalizas, o incluso matrices concretas). La decisión para necesitar acotar más o menos la

familia de matrices puede depender en gran medida de la técnica instrumental y modo de cuantificación.

- Será necesario definir la técnica empleada, que puede ser cualquiera de las técnicas descritas anteriormente. La definición de la técnica también puede ser más o menos concreta en función de si dicha categoría de ensayo está formada por métodos analíticos de un único tipo de instrumento (ejemplo: Análisis de elementos en alimentos por ICP-MS), o bien por varios tipos diferentes que tengan un mismo principio instrumental (ejemplo: Análisis de elementos en alimentos y piensos mediante técnicas de espectrometría atómica).
- Finalmente, se elaboraran y desarrollarán procedimientos normalizados de trabajo (PNT) que contemplen todo el desarrollo de esta categoría.

### **3.1 Definición de la LEBA en grupos de matrices**

Una vez establecida la LEBA, en el apartado de productos que definen la categoría, se puede dividir este alcance (p.ej. alimentos o alimentos y piensos) estableciendo grupos. Es importante indicar que la clasificación de grupos va a depender, especialmente, de la técnica instrumental utilizada y del modo de cuantificación. Tal y como se ha indicado anteriormente, las diferentes técnicas pueden presentar características distintas y se ven afectadas por interferencias de matriz y espectrales en distintos grados.

En el punto 5, se exponen diferentes ejemplos orientativos de organización de la LEBA, que puede variar según la técnica utilizada en la cuantificación.

## **4. PROCESO DE VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD**

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

Se consideran tres grupos de características:

De fiabilidad: mantener los criterios de validación a lo largo del tiempo.

De practicabilidad: si es fácilmente realizable en la práctica.

De idoneidad: si en el momento del análisis responde a los requisitos fijados en la validación.

Estas características se demuestran durante el proceso de validación y mediante las actividades de evaluación de la calidad de los ensayos.

### **4.1 Validación de los métodos analíticos.**

Se emplea para establecer unos parámetros de calidad de un método y demostrar que es adecuado a un propósito analítico particular.

Hay cuatro criterios de calidad 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 en condiciones de repetibilidad (r) y de reproducibilidad (R)).



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. En el punto 5 se exponen ejemplos de validación para alcances abiertos.

#### **4.2. Evaluación de la calidad de los ensayos**

Es el conjunto de actividades que permiten garantizar que el laboratorio sigue dando resultados correctos (de acuerdo a los parámetros de calidad obtenidos en la validación) a lo largo del tiempo.

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, coherentes con los resultados obtenidos en la validación.

La norma ISO 17025 (punto 7.7) describe algunas de las actividades posibles para el aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos:

- a) uso de materiales de referencia o materiales de control de calidad;
- b) uso de instrumentos alternativos que han sido calibrados para obtener resultados trazables;
- c) comprobaciones funcionales del equipamiento de ensayo y de medición;
- d) uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control, cuando sea aplicable;
- e) comprobaciones intermedias en los equipos de medición;
- f) repetición del ensayo o calibración utilizando los mismos métodos o métodos diferentes;
- g) reensayo o recalibración de los ítems conservados;
- h) correlación de resultados para diferentes características de un ítem;
- i) revisión de los resultados informados;
- j) comparaciones intralaboratorio;
- k) ensayos de muestras ciegas.

Debido a la posible carencia de materiales de referencia certificados, se puede comprobar la veracidad y exactitud mediante la técnica de adición/recuperación, utilizando muestras sobrantes de ensayos de intercomparación o comparando el resultado frente al obtenido con un método de referencia normalizado.

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

1. Hacer 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. El

valor del blanco debería ser despreciable frente a la concentración medida en la muestra. Un criterio de aceptación para el blanco puede ser que la señal sea inferior o igual a un tercio del patrón de calibración de menor concentración o correspondiente al Límite de cuantificación (LoQ). No obstante, cuando los elementos analizados están en una concentración elevada, no es necesario poner un requisito tan estricto, de modo que los blancos se podrán considerar adecuados cuando, por ejemplo, su concentración sea inferior a un 2% de la concentración del elemento en la solución de muestra analizada.

En caso de reutilizar material (por ejemplos, vasos de digestión de microondas), el vaso del blanco deberá ser aleatorio de entre los usados habitualmente para las muestras.

2. Preparar y analizar muestras por duplicado para verificar la repetibilidad de los ensayos, al menos una dentro de cada serie analítica. Si el contenido del analito en la muestra analizada por duplicado es inferior al límite de cuantificación, el requisito de aceptación sería que los dos resultados estén por debajo del límite de cuantificación. Si para determinadas combinaciones analito-matriz, los elementos están, en la mayoría de los casos, por debajo del LoQ del método, para poder evaluar la repetibilidad del método se pueden hacer adiciones por duplicado, alternando niveles de adición altos y bajos en las distintas series analíticas.

3. Utilizar una muestra con una adición de concentración conocida del elemento o elementos que se estén analizando. La adición se debe efectuar antes de preparar o digerir las muestras para controlar, además del efecto matriz, pérdidas de analito por precipitaciones o evaporaciones. La recuperación (R%) obtenida nos permite saber si la matriz está interfiriendo en la lectura de algún elemento o si ha habido pérdidas del analito. Se recomienda alternar adiciones con concentraciones bajas (cercasas al LoQ) o, si la muestra tiene un contenido del elemento superior al LoQ, la concentración añadida será, como mínimo, similar al contenido del elemento en la muestra) y adiciones con concentraciones altas. El criterio de aceptación para la recuperación en las muestras con adición debe ser coherente con la incertidumbre declarada y con los requisitos legales. Este criterio dependerá de los resultados obtenidos en la validación, pero, en general, un error de  $\pm 15\%$  en valores superiores a 0.1 ppm y  $\pm 20\%$  en valores inferiores a 0.1ppm puede considerarse aceptable.

Para elementos mayoritarios, como pueden ser Ca, Na, K, Mg y P, en general, las adiciones serán lo más cercanas posibles a su contenido natural en la muestra analizada. En determinados productos, su alta concentración en la muestra puede dificultar poner adiciones antes de la preparación o digestión de la muestra, ya que esto supondría añadir volúmenes excesivos de patrón. En estos casos, si se trata de productos para los que ya se ha demostrado en la validación que el método es adecuado, se puede hacer adiciones en la solución de muestra ya preparada y diluida, lo que servirá para controlar efectos de matriz o precipitaciones.

4. El laboratorio debe comprobar la ausencia de efecto memoria. Esto es particularmente importante en elementos como por ejemplo mercurio, boro, bromo, arsénico, iodo o

fósforo, que son más susceptibles de adherirse a las superficies de los materiales en contacto con las disoluciones de las muestras y patrones, como son los tubos de entrada de muestra. Una forma de controlar el efecto memoria es poner un blanco de reactivos después de la solución más alta de calibración, que sería la concentración más alta que debería tener una disolución de muestra para estar dentro del rango de trabajo. Si tras el análisis de la solución más alta de calibración no hay efecto memoria, no debería de haberlo tampoco después del análisis de muestras a esa concentración. Si, por el contrario, se detecta efecto memoria tras la lectura de este patrón, se deberá estudiar a partir de que concentración hay efecto memoria y el tiempo o soluciones de lavado necesarias para eliminarlo.

5. Cada 10 o 20 muestras, tras la calibración y al final de la serie analítica, realizar un control que consiste en leer una solución que es de concentración similar al patrón de concentración media de la curva de calibrado. Este control sirve para comprobar la vigencia de la curva de calibrado durante toda la serie, es decir, que la deriva instrumental no supera unos límites preestablecidos. La desviación de este patrón respecto a su valor teórico no debería ser superior al 10%.

6. Cada vez que se prepararan de nuevo los patrones de la curva de calibración, al comienzo de la serie analítica, realizar un control que consiste en leer una solución ,habitualmente dentro del rango medio de la curva de calibrado, obtenida mediante otra preparación y a partir de otra marca o lote de solución madre de los elementos analizados. Alternativamente se puede analizar un material de referencia líquido o agua de referencia que incluya los mismos elementos que los patrones de calibración. Sirve para comprobar la correcta preparación de los patrones de la curva de calibrado. El valor obtenido para este patrón no debería diferenciarse en más de un 10 % del valor nominal.

7. Siempre que se esté midiendo en concentraciones cercanas al LoQ, se debe asegurar que la medida es correcta en ese rango de concentración. A continuación se proponen algunos de los sistemas para este control:

Incluir 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.

Calcular la concentración equivalente en el primer patrón 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.

Adicionar la muestra al nivel del LoQ.

En todos los casos, el criterio de aceptación debe ser coherente con la incertidumbre establecida para los resultados cercanos al LoQ, pero, en general, un error de  $\pm 20\%$  podría ser aceptable.

## 6. 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 (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 999/2001, (CE) nº 396/2005, (CE) nº 1069/2009, (CE) nº 1107/2009, (UE) nº 1151/2012, (UE) nº 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) nº 1/2005 y (CE) nº 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) nº 854/2004 y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales).
- Decisión de Ejecución (UE) 2016/1365 de la Comisión de 9 de agosto de 2016, por la que se modifica la Decisión 98/536/CE en lo que respecta a la lista de laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuos en animales vivos y sus productos.
- Guía de tratamiento de muestras de alimentos y piensos para análisis de elementos químicos.
- Validación y puesta a punto de métodos de análisis de metales pesados con ICP-MS e ICP-AES: estudio de interferencias espectrales

# **ANEXO**

## **EJEMPLOS DE VALIDACIÓN**

## **EJEMPLOS DE VALIDACIÓN: VALIDACIONES NECESARIAS PARA ALCANCES ABIERTOS Y CRITERIOS A APLICAR.**

Una vez definido el alcance que incluye la familia de parámetros o analitos (abierto a elementos y/o matrices), la familia de matrices que forma la categoría de ensayo, (p. ej. alimentos, aguas de consumo y continentales, piensos y sus materias primas, etc.) y la técnica o grupo de técnicas empleadas, será necesario establecer unos criterios sobre el número de validaciones necesarias, atendiendo a las diferentes matrices existentes en los mismos y a las técnicas de cuantificación empleadas. Para ello, puede ser útil dividir la categoría de ensayo en grupos de matrices con características de validación similares:

1. División de la categoría del ensayo “alimentos” y/o “piensos” en grupos.
2. De manera opcional, división de sub-grupos dentro de cada grupo (para algunos grupos puede no ser necesario).
3. Validaciones por matrices representativas dentro de cada grupo o sub-grupo.

El número de matrices representativas a validar dentro de cada grupo dependerá del tipo de preparación muestra y de las interferencias de matriz o espectrales que pueden afectar a la técnica de cuantificación empleada. En general, cuantas más interferencias presenta una técnica, mayor será el número de matrices que se deberán validar dentro de cada grupo.

Para facilitar la implantación de alcances flexibles (a elementos y matrices o cerrados a elementos) para categorías de ensayo en alimentos y/o piensos para estas técnicas instrumentales, se propone:

1. Establecer grupos de matrices de alimentos y/o piensos basados en las diferentes sistemáticas de preparación de las muestras y/o en su composición (contenido en grasas, azúcares, sal, humedad, minerales etc...)
2. Obtener los parámetros de validación (mediante una validación completa) para las matrices más representativas dentro de cada grupo.
3. Aplicar diferentes opciones de validaciones, para incluir elementos nuevos y/o matrices en la LEBA.

Como una propuesta orientativa de clasificación, se describen 7 grupos que abarcarían el total de las matrices de alimentos y piensos. En este ejemplo se propone que los grupos estén basados en las diferentes sistemáticas de preparación de las muestras (ver *guía de tratamiento de muestras de alimentos y piensos para análisis de elementos químicos*), necesaria para poner los elementos químicos en disolución y posterior cuantificación según las técnicas anteriormente mencionadas. Los grupos propuestos son orientativos y pueden variar según los equipos utilizados tanto para la preparación de muestra como para su cuantificación. Por ejemplo, para técnicas en las que el efecto matriz es menor, como puede ser métodos que combinan la mineralización por microondas o en placa calefactora con la cuantificación por ICP-

MS, pueden unirse los grupos 3 y 4 dejando un solo grupo, que sería alimentos. Incluso puede englobarse en esta agrupación global el grupo 2, si también se le aplica el mismo proceso de digestión. Por el contrario, para algunas técnicas en las que los efectos de matriz son más relevantes (como ET-AAS) y, especialmente, si las digestiones son por vía seca, puede ser necesario validar un mayor número de matrices con distinta composición, que aseguren la representatividad de los efectos matriz posibles dentro del grupo al que pertenecen. Lo mismo puede ocurrir con otras técnicas como el ICP-AES, que aun no siendo tan matriz dependiente como el ET-AAS, los efectos de matriz son más relevantes si se utiliza un único patrón interno para todos los elementos, o bien algún nebulizador más matriz dependiente (como el ultrasónico (US) para llegar a mejores límites de sensibilidad).

Tabla 1: Grupos basados en la guía de tratamiento de muestras de alimentos y piensos para análisis de elementos químicos publicada por el LAA y elaborada por el GT de metales en piensos y alimentos.

<i>Grupo (G1)</i>	1	<b>Aguas de consumo y aguas continentales</b>
<i>Grupo (G2):</i>	2	<b>Bebidas alcohólicas de baja graduación y derivados.</b> Por ejemplo: vinos, vinagres, cervezas, sidras, etc. <b>Bebidas alcohólicas de alta graduación.</b> Por ejemplo: ron, vodka, ginebra, brandy, licores, alcoholes, etc. <b>Bebidas refrescantes.</b> Por ejemplo bebidas de cola, refrescos gasificados, bebidas isotónicas, etc.
<i>Grupo (G3):</i>	3	<b>Alimentos de alto contenido en humedad*(&gt;50%)</b> Por ejemplo: cárnicos, pescados, hortalizas, frutas, zumos, conservas, leche, yogur, etc.
<i>Grupo (G4):</i>	4	<b>Alimentos de bajo contenido en humedad *(≤50%)</b> queso, cacao, mermelada, especias secas, aceites y grasas, frutos secos, cereales, legumbres, embutidos, té y similares, harinas, materias primas para piensos (como cereales, semillas, leguminosas...), etc.
<i>Grupo (G5):</i>	5	<b>Sal</b>
<i>Grupo (G6):</i>	6	<b>Piensos.</b> Piensos completos o complementarios.
<i>Grupo (G7):</i>	7	<b>Premezclas minerales, piensos minerales y aditivos minerales para piensos</b>

\*Según la base de datos española de composición de alimentos (BEDCA) publicadas por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

NOTA: En la **cuantificación de Hg mediante analizadores directo de mercurio con combustión previa de la muestra**, al ser una técnica independiente de matriz, no es necesario dividir los productos incluidos en el alcance en grupos.

Una vez establecidos los grupos, se procederá a la validación de estas familias o matrices representativas con la obtención de los parámetros de calidad de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, incertidumbre y LoQ.

Definición de grupos:

1. Un grupo se define como: “conjunto de matrices que se comportan igual en el proceso de validación”.
2. Cada grupo tendrá unos parámetros ( $r$ ,  $R$ ,  $R\%$ ,  $U$  y  $LoQ$ ) que servirán para caracterizarlo.
3. Dos grupos se consideran diferentes cuando sus parámetros estadísticos son significativamente distintos (teniendo en cuenta el error estadístico).

Es imprescindible que en los procedimientos normalizados de trabajo se establezcan unos controles de calidad suficientes para que, al analizar matrices nuevas en un grupo, se demuestre que se comportan igual que las matrices validadas en el mismo. Estos controles deberían incluir estudios de recuperación en muestras adicionadas. Los criterios de aceptación de estos controles deben ser coherentes con los establecidos en la validación. Si estos controles de calidad son correctos, no sería necesario realizar una nueva validación completa para las nuevas matrices, pues no serían grupos diferentes de los previamente validados. Sólo en el caso que la respuesta del control de calidad no fuera correcta, sería necesaria una validación completa de un grupo diferente.

Las validaciones iniciales dentro de los grupos, que nos permitirán establecer unos parámetros de validación que lo caractericen, incluirán:

- a) Linealidad: Si es un procedimiento con calibración externa y lineal, para cada elemento, se procederá a obtener la linealidad de la recta de calibrado y que cumpla con los criterios establecidos previamente por el laboratorio.
- b) Veracidad: Si existe material certificado de referencia (MCR) (o en su defecto una muestra control, como puede ser un sobrante de un ensayo de intercomparación) en la matriz requerida u otra matriz equiparable, se procederá a estudiar la veracidad. Como normalmente no existen materiales de referencia que cubran todo el rango de trabajo en cuanto a tipos de matriz y a concentración, se estudiará la recuperación del elemento en las muestras reales, adicionando un patrón a distintos niveles de concentración. Normalmente, se harán adiciones a tres niveles diferentes de concentración (incluyendo el LoQ, una concentración cercana al LM y una concentración superior al LM, excepto en macroelementos, donde se podrá excluir el LoQ. Se pueden alternar distintos niveles de adición en distintas matrices sin que sea necesario adicionar todas las matrices a los tres niveles de concentración. Este estudio se hará en días distintos, no consecutivos. Las recuperaciones obtenidas deben cumplir con los criterios previamente establecidos.



Seguidamente se presentan los distintos modos para estudiar la veracidad:

-Comparando el valor de referencia del MR con el valor medio de las medidas obtenidas en el laboratorio, teniendo en cuenta la incertidumbre de ambos valores;

$$\frac{|VR - VL|}{\sqrt{U_R^2 + U_L^2}} \leq 1$$

Siendo;

VR: valor de referencia del MCR o asignado a la muestra control.

VL: valor medio de las medidas hechas en el laboratorio.

UR: Incertidumbre expandida del valor de referencia o del valor asignado.

UL: Incertidumbre expandida de las medidas hechas en el laboratorio, calculada como;

$$UL = 2 \times \frac{S_{pi}}{\sqrt{n}}$$

Siendo;

S<sub>pi</sub>: desviación estándar de las medidas en condiciones de precisión intermedia.

N: número de medidas hechas en días distintos.

-Estudiando las recuperaciones obtenidas, que deben cumplir con los criterios previamente establecidos, siendo la recuperación;

En MCR o muestras sobrantes de ensayos;

$$\%R = (VL / V_R) * 100$$

Siendo;

VL= media de resultados obtenidos en días distintos.

V<sub>R</sub>= valor certificado o asignado

En muestras con adición;

$$\%R = \left( \frac{C_{m ad} - C_m}{C ad} \right) \times 100$$

Siendo;

C. m ad: concentración media de las lecturas de la muestra con adición realizadas en días distintos.

C<sub>m</sub>: concentración media de las lecturas de la muestra original realizadas en días distintos.

C ad: concentración de la adición realizada sobre la muestra.

c) Precisión: Obtención de la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (expresada como Coeficiente de Variación de la Reproducibilidad (CV<sub>R</sub> %) y de la

repetibilidad ( $CV_r$  %), como repetibilidad y reproducibilidad, o como desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad) de los análisis de las muestras realizados en días diferentes y a diferentes niveles de adición. El número de niveles necesario dependerá del analito y la matriz. Para contaminantes es recomendable validar 3 niveles (LoQ, Límite máximo (LM) y 2 ó 3 veces el LM)), mientras que para algunos nutrientes, como calcio en leche o sodio en la mayoría de los alimentos, sería suficiente con validar 2 niveles y no es posible incluir el LoQ. La repetibilidad se puede obtener mediante duplicados o triplicados de los ensayos en los distintos días de validación o repitiendo el mismo ensayo, por ejemplo 10 veces, en un mismo día.

- d) Especificidad: La ausencia de interferencias de matriz se demuestra en los estudios de veracidad (MCR y muestras con adición). Además deberán estudiarse las posibles interferencias espectrales. Se pueden encontrar ejemplos de cómo abordar estos estudios en el documento publicado por el GT de metales en piensos y alimentos *Validación y puesta a punto de métodos de análisis de metales pesados con ICP-MS e ICP-AES: estudio de interferencias espectrales*.
- e) Incertidumbre: la incertidumbre de los métodos se establecerá, o bien a partir de los resultados de la validación, o bien a partir de los criterios de aceptación de los controles de calidad. Dependiendo de los resultados obtenidos en la validación, se podrá establecer una incertidumbre global para todo el rango de concentraciones validado para una determinada combinación elemento-grupo de matrices, o establecer una incertidumbre distinta para los distintos niveles de concentración validados.

**A continuación, se exponen una serie de ejemplos que incluyen distintas formas de agrupar las matrices, distintos alcances (abiertos a matrices y elementos o sólo a matrices) y distintas estrategias de validación.**

### EJEMPLO 1:

**Elementos químicos en alimentos y piensos mediante técnicas de espectrometría atómica o de masas según nt-18**

#### CATEGORIA DE ENSAYO "ALIMENTOS Y PIENSOS"

En primer lugar, se establecen grupos de validación basados en la tabla 1:

<u>División en grupos según su preparación de muestras</u>						
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
<u>Clasificación inicial de matrices representativas dentro de cada grupo</u>						
Agua	Vino y Ginebra	Carne	Aceite	Sal	Pienso completo	Premezcla

		Pescado	Harina			Pienso mineral
		Vegetal				Aditivo mineral (Ej. Sulfato de Cu)

El cuadro anterior se presenta a modo de ejemplo. En principio, las matrices representativas seleccionadas dentro de los grupos anteriores, u otras similares en cuanto a complejidad, serían suficientes para realizar una validación completa y poder abordar este alcance de acreditación. Es importante señalar que, si los aceites y grasas se van a contemplar dentro del grupo 4, debido a la complejidad de estos productos, es imprescindible introducir alguna matriz de este tipo en la validación. Como se ha comentado anteriormente, para técnicas o preparaciones de muestra en las que el efecto matriz es mayor (ET-AAS, vía seca, ICP-AES con nebulizador ultrasónico) serán necesarias un mayor número de matrices en la validación.

Las validaciones iniciales se harán según la opción 1 descrita en el apartado siguiente (protocolo de validaciones).

### PROTOCOLO DE VALIDACIONES

A continuación se indican las diferentes opciones de validación ante la petición de nuevos análisis no incluidos en la LEBA:

#### 1. **Opción 1:** Validación de un nuevo elemento (Ver esquema al final del ejemplo):

Se llevará a cabo una validación completa, que incluirá:

**Linealidad:** 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.

**Veracidad:** Para el estudio de la veracidad se utilizarán MCR y/o muestras control sobrantes de ensayos de intercomparación. Normalmente no existen MR que cubran todo el rango de trabajo (concentraciones y matrices) a validar. Para solventar este problema y poder validar todo el rango de trabajo, se utilizarán muestras reales adicionando un patrón a tres niveles diferentes de concentración (incluyendo el LoQ, una concentración cercana al LM y una concentración superior al LM, excepto en macroelementos, donde se podrá excluir el LoQ). Ya sean muestra con adición o MR, las muestras se analizarán por duplicado, por ejemplo, en cinco días diferentes, no consecutivos. La veracidad se puede estudiar de las maneras descritas anteriormente en este documento (páginas 16 y 17, apartado b).

**Precisión:** Obtención de la precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (expresada como Coeficiente de Variación de la Reproducibilidad ( $CV_R$  %) y de la repetibilidad ( $CV_r$  %), como  $r$  y  $R$ , o como  $S_r$  y  $S_R$ ) de los resultados de los análisis de las muestras realizados en cinco días diferentes y a diferentes niveles de adición (para el estudio de la precisión se

pueden utilizar los mismos datos y experimentos utilizados en el estudio de la veracidad en muestras con adición). El número de niveles necesario dependerá del analito y la matriz. Para contaminantes es recomendable validar 3 niveles (LoQ, Límite máximo (LM) y 2 ó 3 veces el LM)), mientras que para algunos nutrientes, como calcio en leche o sodio en la mayoría de los alimentos, sería suficiente con validar 2 niveles y no es posible incluir el LoQ. Una posible solución para la validación del LoQ en macroelementos (por ejemplo calcio en leche) es, si el alcance es alimentos, buscar una matriz alternativa dentro del alcance, que no tenga el elemento a validar para poder adiccionarla en el LoQ.

Incertidumbre: obtenida a partir de la precisión en condiciones de reproducibilidad y la recuperación, si el método presenta un sesgo.

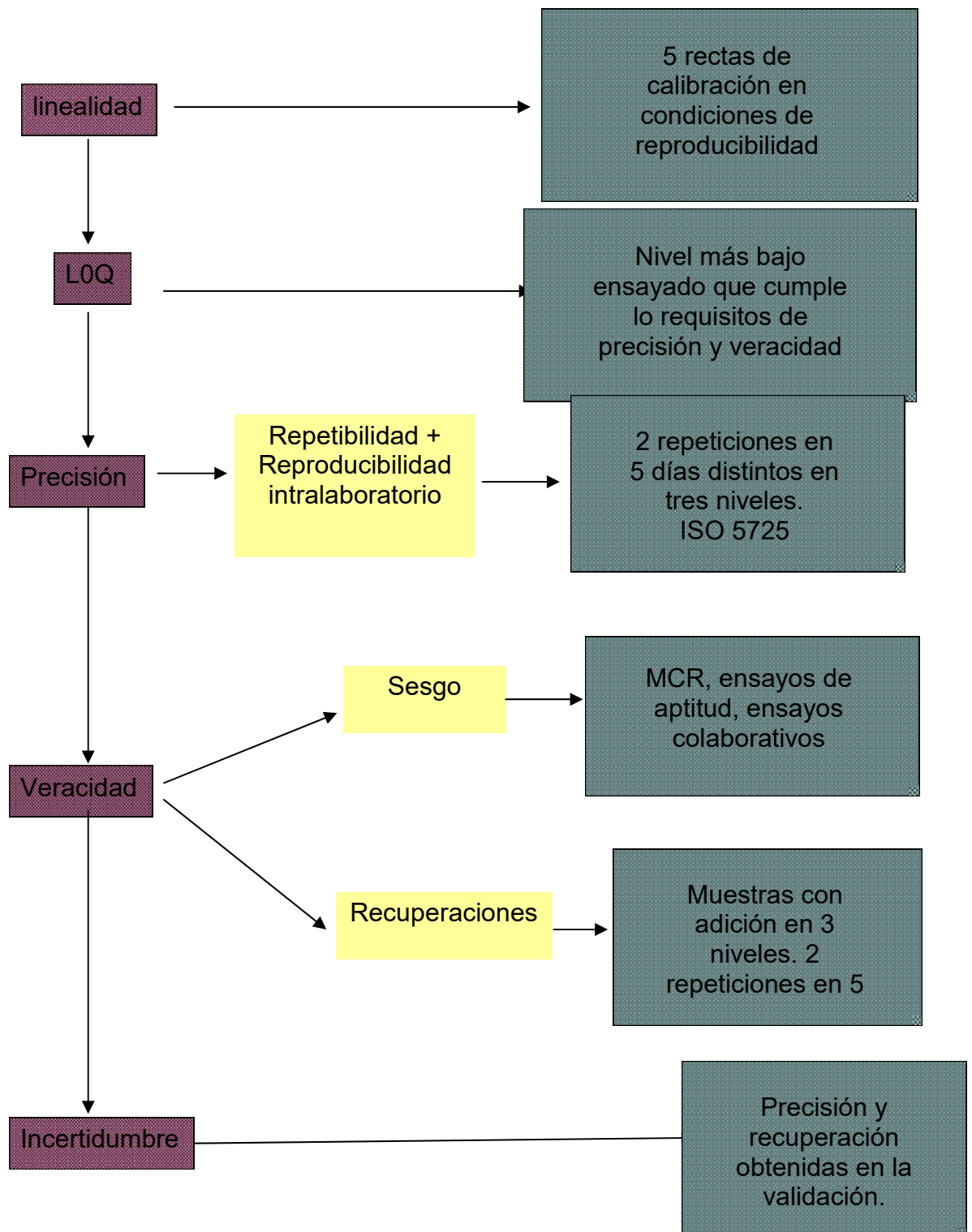
2. **Opción 2:** Validación de una matriz en un **grupo no validado** de un elemento incluido en la LEBA (Ver esquema al final del ejemplo):

Para validar una matriz incluida en un grupo no validado, el proceso será el mismo que el descrito en la opción 1, excluyendo el estudio de linealidad.

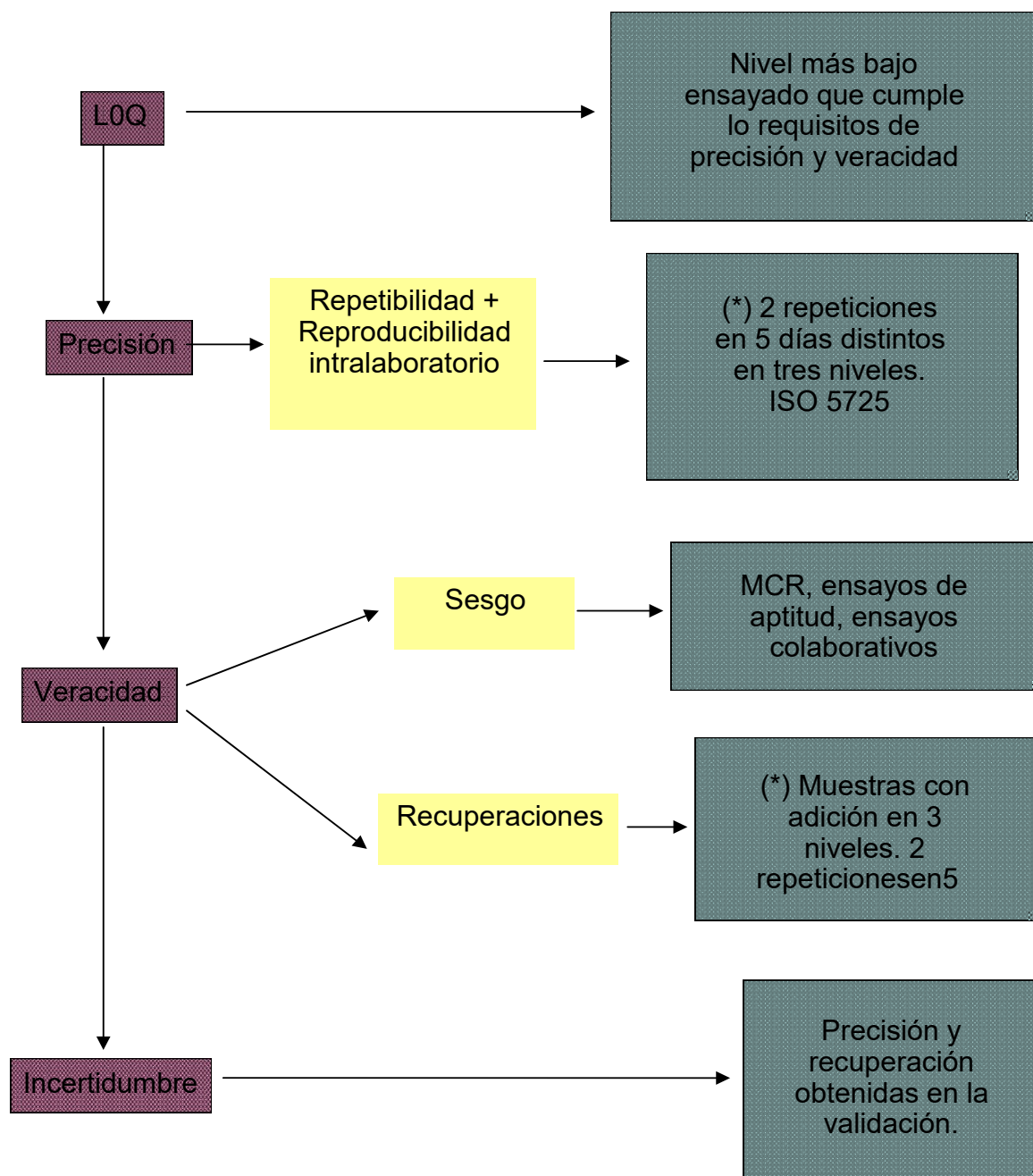
3. Verificación de una matriz nueva en un grupo ya validado (Opción 3):

Se verificará la matriz mediante la repetición de muestra para comprobar la repetibilidad y adiccionar 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 en el LoQ. Si el contenido natural del elemento no lo permite, será similar al contenido natural del elemento en la muestra.

**OPCIÓN 1 (elemento no incluido en la LEBA)**

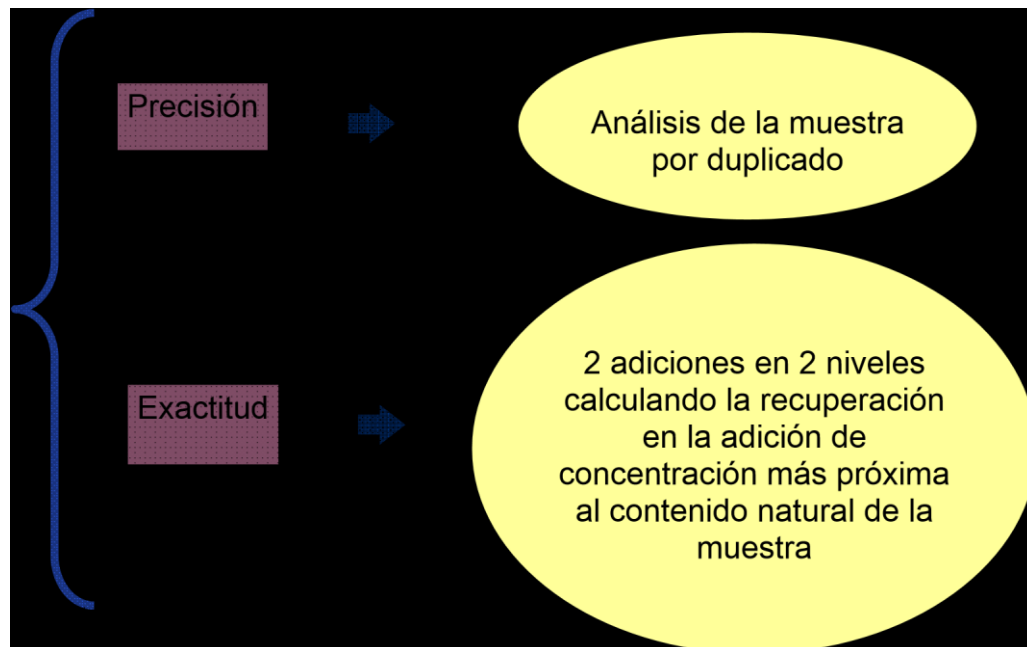


**OPCIÓN 2 (elemento incluido en la LEBA en grupo no validado)**



(\*) 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)**



## Ejemplo 2:

### Elementos químicos en alimentos y piensos mediante técnicas de espectrometría atómica o de masas según nt-18

La estrategia de validación propuesta en este ejemplo consiste en validar diferentes matrices en cada nivel de concentración, de modo que la validación cubra un mayor número de matrices, sin que sea necesario que, en cada matriz, se verifiquen los distintos niveles del rango de trabajo. Por ejemplo, se pueden validar las matrices con una concentración menor del elemento para validar el rango correspondiente al LoQ y utilizar otras, con mayor contenido natural o que sean MR contaminados artificialmente, para los niveles de concentración más altos.

Se proponen los siguientes grupos de validación

G1	G2, G3 y G4	G5	G6	G7
<u>Clasificación inicial de matrices representativas dentro de cada grupo</u>				
agua	Bebidas alcohólicas de alta graduación	Sal	Pienso completo	Premezcla mineral
	Bebidas alcohólicas de baja graduación			Aditivos minerales
	Aceites y grasas			
	Alimentos (vegetales, frutas, cárnicos, productos de la pesca, conservas, lácteos y derivados)			
	Azúcares y derivados			
	Cereales y harinas y derivados			
	Salazones			
	Platos o comidas preparadas			

El cuadro anterior se presenta a modo de ejemplo. Como se ha comentado anteriormente, Para algunas técnicas en las que los efectos de matriz son más relevantes (como ET-AAS, digestiones por vía seca, ICP-AES con nebulizador US) y, puede ser necesario considerar un mayor número de matrices en la validación.

### **PROTOCOLO DE VALIDACIONES**

Se procederá a la validación de estas familias o matrices representativas con la obtención de los parámetros de calidad, reproducibilidad, recuperación, incertidumbre y LoQ.

Se seguirá el siguiente sistema (ICP-MS):

- Se realizarán adiciones a 3 niveles de concentración. Los niveles de concentración deberán cubrir:



- El LoQ, que cumplirá con los requisitos de la legislación aplicable. Para macroelementos, no siempre será necesario validar el LoQ
  - En contaminantes, una concentración próxima al límite máximo legal, cuando proceda.
  - Una concentración que sea igual o superior al doble del máximo legal.
- No es necesario adicionar todas las matrices en los 3 niveles. Se tomarán las muestras con menor contenido natural para la validación del LoQ.
  - Para validar grupos que incluyan un amplio rango de matrices, por ejemplo si se engloban los grupos 2, 3 y 4, se deberá considerar un mínimo de 10 matrices diferentes representativas de los subgrupos englobados.
  - Los análisis se harán en, como mínimo, 3 días diferentes no consecutivos, variando el máximo número de factores como, por ejemplo, analista, patrones, equipos etc...
  - Se estudiará la veracidad en el límite de cuantificación para cada analito, con un mínimo de 30 datos procedentes de diferentes matrices/días (los cuales se utilizarán también para el estudio de precisión).
  - Del mismo modo, se procederá a analizar un mínimo de 10 matrices diferentes (representativas de los subgrupos englobados) adicionadas a otros niveles superiores y que cubran el rango de trabajo hasta al menos 2 ó 3 veces el valor máximo de dicho analito en cualquier alimento. En este caso, deberán haberse recabado un mínimo de 50 datos contemplando diferentes matrices y días (los cuales se utilizan también para el estudio de precisión).
  - En los grupos que, o no incluyan subgrupos o incluyan un número menor de subgrupos, el número de matrices necesarias para validar el grupo será menor. Por ejemplo, en el grupo 5, es suficiente validar una muestra.

### **Análisis de nuevas matrices o elementos:**

#### **Nuevas matrices:**

##### **Recuperación:**

Cuando se analice una matriz no incluida en la LEBA, en general, se considerará que pertenece a un grupo determinado cuando, tras analizarla con el método descrito en el protocolo para ese grupo, el % Recuperación cumpla con el criterio de aceptación establecido en el control interno para ese grupo validado.

Las adiciones en matrices nuevas incluirán una adición en el rango bajo y una en un rango superior. Si la matriz tiene un contenido natural que no permite adicionar en el nivel bajo, o bien se hará una adición lo más próxima posible al contenido presente en la muestra, o bien se buscará una matriz similar con una concentración baja del elemento de interés, que permita estudiar la recuperación en el LoQ.

**Precisión:**

En muestras con una concentración del elemento inferior al LoQ, no se podrá estudiar la precisión a través de duplicados. Opcionalmente, se pueden hacer dos adiciones en el LoQ para estudiar la repetibilidad.

Si se hacen duplicados de las muestras, la diferencia entre los resultados de los duplicados será inferior a:

$2,83 \times S_R$  de validación si los duplicados se analizan en condiciones de precisión intermedia.

$2,83 \times 0,66S_R$  de validación si los duplicados se analizan en condiciones de repetibilidad.

Si estos controles de calidad son correctos, no sería necesario realizar una nueva validación completa para las nuevas matrices, pues no serían grupos diferentes de los previamente validados.

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

**Nuevos elementos:**

Ante la petición de análisis de un nuevo elemento, se llevará a cabo una validación completa siguiendo el sistema descrito en el protocolo de validaciones de este ejemplo.

**EJEMPLO 3:****Análisis de elementos en alimentos mediante ICP-MS. Alcance cerrado a elementos y abierto a matrices.**

El análisis por ICP-MS se considera que es una técnica con escaso efecto matriz, por ello, se tiene sentido abordar un alcance de acreditación abierto a matrices y cerrado a elementos, que será especialmente útil para LCO que analicen siempre los elementos incluidos en la legislación.

Los grupos están basados en su naturaleza y en los tratamientos previos al análisis por ICP-MS.

**ESTRATEGIA**

En la siguiente tabla se muestran ejemplos de los grupos de matrices o familias más comunes dentro de cada grupo

Grupo 1	Aguas**
Grupos 2 y 3	<u>*Alimentos de alto contenido en humedad (&gt; 50%):</u> Por ejemplo: Productos vegetales Productos cárnicos Productos de la pesca Productos lácteos

	Huevos Bebidas alcohólicas de baja graduación y bebidas refrescantes Bebidas alcohólicas alta graduación y bajo contenido en azúcares (< 50 g/L)
Grupo 4	<u>*Alimentos de bajo contenido en humedad (≤ 50%):</u> Por ejemplo: Productos vegetales Productos cárnicos Productos de la pesca Derivados lácteos Aceites y grasas Azúcar y derivados
Grupo 5	Sal, salmuera

(\*) Se hará conforme a las tablas españolas de composición de alimentos publicadas por el Ministerio de Sanidad y Consumo (Base de datos BEDCA).

(\*\*) Se procede como en aguas de consumo

Opcionalmente, se pueden unir los grupos 3 y 4 creando un único grupo que englobe a todos los alimentos.

#### PROTOCOLO DE VALIDACIONES

- En la validación inicial se validan los grupos y los elementos que, según el trabajo habitual del laboratorio, interese tener en el alcance desde un primer momento. Dentro de cada grupo, se seleccionarán para la validación una serie de matrices representativas de las distintas familias por su diferente naturaleza y usando el criterio de alimentos más solicitados al laboratorio o que se presuma que puedan tener más efecto matriz. Al ser un alcance abierto para matrices, no es necesario cubrir todas las familias en la validación, ya que, cuando el laboratorio reciba una matriz de una familia no validada, hará las comprobaciones descritas en el siguiente punto.
- Se realizan un mínimo de 5 tandas por duplicado de cada matriz seleccionada para cada elemento, a 3 niveles (LQ, valor intermedio y ámbito máximo). **Alternativamente, tal y como se explica en el ejemplo 2, se pueden validar diferentes matrices en cada nivel, de modo que la validación cubre un mayor número de matrices, sin que sea necesario que, en cada matriz, se validen los 3 niveles.**
- Se obtienen unos resultados de recuperación (%R) y desviación estándar relativa (%CVR) de cada nivel, y, siempre que no difieran significativamente, se unifican obteniendo una %R y %CVR para todo el grupo y posteriormente por el mismo motivo se unifican los grupos obteniendo un único gráfico de control: Alimentos para cada elemento.

- Se crea una Lista de Ensayos Validados (LEV), donde se incluyen grupo, familia, alimento y elementos que se han validado o verificado.

#### **Validación nuevas matrices:**

Cuando se solicita el análisis de un alimento en una matriz que no se incluyó en la validación inicial, es decir, no se encuentra en el listado, previamente a su análisis se realiza una verificación.

Para la Verificación se estudian como mínimo 2 niveles para cada elemento (LQ, contenido máximo si existe, o nivel intermedio) por duplicado. Si la muestra a analizar presenta un contenido natural elevado del elemento a analizar, se sustituirá el nivel de LQ por otro superior.

Los resultados son estadísticamente similares cuando cumplen los criterios de calidad establecidos a priori por el laboratorio, por ejemplo, si al introducirlos individualmente en el gráfico de control quedan dentro del límite de aviso ( $\%R \pm 2 \times \%CVR$ ), en este caso se realiza el análisis de la muestra y se emite el resultado. Estos criterios de validación deberán ser coherentes con los establecidos en la validación inicial para cada grupo.

Si los resultados obtenidos no entran en los límites de aviso del gráfico de control existente, se realiza una validación completa para constatar las características propias de la matriz. Puede ser precisa una modificación del método. Los resultados de la validación deben cumplir los criterios definidos a priori. Se valorará si los resultados obtenidos en la nueva validación pueden asimilarse a los resultados existentes de la validación previa o si debe considerarse esa familia por separado.

#### **Control de calidad interno:**

En el control de calidad interno, se deben rotar los grupos incluidos en la LEV/LEBA. La inscripción en los ejercicios intercomparativos alternará las matrices del listado.

Los criterios de aceptación de los controles internos deben ser coherentes con los resultados de la validación y, especialmente, con la incertidumbre establecida para el método.

Si la incertidumbre del método se ha establecido a partir de los criterios de aceptación de los parámetros de validación, se aplicarán estos mismos criterios de aceptación para los controles de calidad internos. Alternativamente, se puede calcular la incertidumbre del método a partir de los criterios de aceptación de los controles de calidad internos.

Si la incertidumbre del método se ha calculado a partir de los resultados obtenidos en la validación:

Para el control interno consistente en el análisis de muestras con adición, la recuperación obtenida deberá estar dentro del intervalo calculado como:

$\% R$  media de la validación  $\pm 2 CV_{R \text{ validación}}$

Si se hace un análisis duplicado de una muestra cuantificable en condiciones de repetibilidad, la diferencia de ambos resultados deberá ser inferior o igual a la  $r$  de la validación, que se calcula como  $2,83 \times S_r$  de la validación o, en su defecto, como  $2,83 \times 0,66 S_R$  de la validación.

Si se hace un análisis duplicado de una muestra cuantificable en condiciones de precisión intermedia, la diferencia de ambos resultados deberá ser inferior o igual a la  $R$  de la validación, que se calcula como  $2,83 \times S_R$  de la validación.

#### **NOTAS GENERALES PARA LA VALIDACIÓN DE ELEMENTOS MAYORITARIOS**

Cuando se validan elementos mayoritarios, como pueden ser el Ca, Na, K, Mg y P en alimentos y piensos, la validación en el nivel bajo o LoQ puede ser complicada por la dificultad de encontrar matrices blanco. En estos casos, el LoQ validado, normalmente, será muy superior al LoQ real del método. En general, se buscará validar un LoQ adecuado al uso que se va a dar al método. Se proponen 2 opciones:

Opción 1: por la alta concentración natural de estos elementos, puede no ser posible utilizar adiciones para la validación del rango bajo, siendo más práctico utilizar MCR o muestras sobrantes de ensayos de intercomparación con una concentración cercana al LoQ requerido.

Opción 2: de no encontrar MCR o muestras control con concentraciones cercanas al LoQ que necesitamos validar, se pueden utilizar muestras reales que tengan una concentración de estos elementos en el LoQ deseado y utilizarlas para verificar la precisión del método en el rango bajo. La veracidad se comprobará en niveles más altos, para los que dispongamos MCR y/o podamos hacer adiciones. Consideramos que, al ser el LoQ validado muy superior al LoQ real, no es imprescindible comprobar la veracidad en el rango bajo validado.

Opción 3: En muchos casos, será muy difícil encontrar MCR, muestras sobrantes de ensayo o muestras reales con concentraciones cercanas al LoQ. En este caso se puede, o bien, si el alcance es abierto para matrices, buscar una matriz alternativa con una concentración baja del elemento que estamos validando, o prescindir de estimar el LoQ para ese elemento, dado que su alta concentración en las muestras hace que no sea necesario.

Madrid, 01 de abril de 2022