



Universidad
Zaragoza



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Ingeniería y Arquitectura

PROYECTO FIN DE CARRERA
INGENIERÍA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DETERMINACIÓN DE PLATA EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN
ELECTROTÉRMICA Y SOLUBILIZACIÓN CON
HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMONIO**

AUTOR: ANORO LÓPEZ, SILVIA

DIRECTOR: FERNÁNDEZ CASTEL, ANGÉLICA

ZARAGOZA, SEPTIEMBRE DE 2013

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Angélica Fernández Castel, directora de este proyecto, por el tiempo dedicado en la realización del mismo y por brindarme la posibilidad de repetir junto a ella la experiencia de un Proyecto Fin de Carrera.

A todos los compañeros que han estado a mi lado estos años, "IQ's" y "peritos". Sin vosotros esto no habría sido lo mismo.

Al grupo GEAS (Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores), por hacerme sentir como en casa desde el primer día.

A mi familia y amigos, por su paciencia y comprensión durante todos estos maravillosos años.

DETERMINACIÓN DE PLATA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA Y SOLUBILIZACIÓN CON HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMONIO

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto es la determinación de plata en tejidos procedentes de ratas, a las que se les ha suministrado nanopartículas de plata por vía oral, con una ingesta controlada. En dicho estudio hay grupos control y grupos a los que se les ha proporcionado una dosis, durante diferentes periodos de tiempo.

La instrumentación que se va a utilizar es la espectrometría de absorción atómica electrotérmica, que proporciona la sensibilidad necesaria para la determinación del orden de 0,1 a 1,5 mg/kg de plata, consiguiendo con ello los bajos límites de detección requeridos para poder determinar la concentración de plata en algunas de las muestras.

Se trabajará con tubos de grafito pirolizados con plataforma e inyector automático para la introducción de todas las disoluciones en el espectrómetro Perkin-Elmer AAnalyst 300 con HGA 800. Se pondrá a punto el equipo, que lleva varios años sin ser utilizado y se optimizarán los parámetros instrumentales y analíticos para la determinación de plata en dichas muestras.

Para validar el método, se llevará a cabo todo el procedimiento con una muestra certificada, que ponga de manifiesto la fiabilidad de los resultados obtenidos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA	2
Programa de calentamiento de la cámara	3
Modificantes de matriz	4
Interferencias	4
Lámparas de cátodo hueco	5
OBJETIVOS	6
EXPERIMENTAL	8
MATERIALES	9
EQUIPOS	9
REACTIVOS Y DISOLUCIONES	9
PUESTA EN FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO	10
OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES Y ANALÍTICOS DEL EQUIPO	12
TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	16
RESULTADOS EXPERIMENTALES	16
Análisis de muestras	19
Heces	21
Muestras certificadas	25
Hígados y riñones	28
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	34
ÍNDICE DE TABLAS	36
ÍNDICE DE FIGURAS	38
ANEXOS	40
ANEXO A.	41
ANEXO B.	47

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto se enmarca dentro de la investigación realizada por el grupo GEAS (Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores), que a su vez se encuentra integrado en el IUCA (Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón).

En la investigación previa a la realización de este Proyecto Fin de Carrera, en colaboración con la Universidad de Montpellier (Francia) [1], se analizaron muestras procedentes de ratas a las que se les había suministrado colargol (polvo granulado formado por proteínas y nanopartículas de plata) con una ingesta controlada. En dicho estudio hay grupos control (T) y grupos a los que se les ha proporcionado una dosis durante diferentes periodos de tiempo (C). El análisis se realizó mediante digestión ácida y posterior determinación con ICP-MS siendo para ello necesario un tratamiento con ácido nítrico y clorhídrico, en varias etapas, que incluyen evaporación a sequedad, redisolución, centrifugación y disolución final con ácido clorhídrico o la utilización de horno microondas. Todo ello supone un largo procedimiento que conlleva riesgos de pérdidas y contaminación o la preparación de un pequeño número de muestras cada vez.

Para subsanar estos problemas se propone la utilización de hidróxido de tetrametilamonio y cisteína (estabilizante de Ag(I) por formación de complejos) con el fin de solubilizar la muestra y tras agitar 24 horas llevarla a volumen final con Triton X-100. Con ello se pretende reducir de manera sustancial, la manipulación de la muestra y los problemas derivados, pudiendo llevar a cabo el procedimiento con un mayor número de muestras.

La instrumentación que se va a utilizar es la espectrometría de absorción atómica electrotérmica.

ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA

La espectrometría de absorción atómica electrotérmica o en cámara de grafito (GFAAS), se ha convertido en los últimos años en una técnica reconocida, principalmente por su elevada sensibilidad la cual permite tomar medidas en el orden de picogramos (10^{-12} g). Sin embargo, también ha adquirido cierta reputación por tratarse de una técnica que presenta cierto nivel de dificultad. Como resultado de su elevada sensibilidad, se presentan ciertos problemas tales como la contaminación por elementos externos. Los contaminantes pueden introducirse en las muestras desde distintas fuentes, como los propios modificantes empleados en el análisis, los distintos reactivos o incluso el material de laboratorio contaminado. Todo esto hace que esta técnica sea, en algunas ocasiones, poco recomendable en comparación con otras técnicas analíticas.

PROGRAMA DE CALENTAMIENTO DE LA CÁMARA

La elección tanto de las temperaturas como de las rampas y tiempos de calentamiento constituyen un paso crítico en el análisis. El programa de calentamiento de la cámara se divide normalmente en cuatro etapas las cuales se describen a continuación:

- **Etapa de secado:** en esta etapa tiene lugar la evaporación del disolvente de tal manera que sólo quede la materia sólida en la plataforma del tubo. Si el líquido alcanza la temperatura de ebullición, salpicará las paredes del tubo dando lugar a resultados erróneos. La duración de esta etapa se elige en función del volumen de muestra introducido (se suelen tomar valores típicos de 30 segundos).
- **Etapa de calcinación:** el objetivo de la etapa de calcinación es el de eliminar los componentes que forman la matriz de tal forma que sólo quede el analito en la superficie de la plataforma. La eliminación de estos componentes minimizará las posibles interferencias químicas que puedan tener lugar en la medida. Se suelen tomar temperaturas elevadas que se encuentren por debajo de la temperatura de volatilización del analito y tiempos en un rango de 10 a 60 segundos para esta etapa en función de la naturaleza de los componentes de la matriz. La etapa de calcinación es la más crítica en el programa de calentamiento de la cámara por tanto debe optimizarse con especial cuidado.
- **Etapa de atomización:** una vez completada la fase de calcinación, lo único que queda en la plataforma del tubo es el analito normalmente en forma de óxido junto con otros óxidos tales como óxidos de calcio y magnesio los cuales no se han eliminado en la etapa anterior. Se calienta el tubo a la temperatura necesaria para atomizar el analito y el espectrómetro registra la señal de absorbancia. Esto constituye la etapa de atomización. Es importante que el tubo alcance la temperatura en el menor tiempo posible consiguiendo así la rápida atomización del analito generando una nube de átomos que maximiza la sensibilidad analítica. Esta etapa suele durar en torno a 2 segundos siendo raro encontrar tiempos superiores a 6 segundos cuando se utilizan medidas de áreas de pico.
- **Etapa de limpieza:** en la última etapa del programa de calentamiento de la cámara se eliminan los residuos que puedan quedar en el tubo. La temperatura y el tiempo de esta etapa dependen de la naturaleza de la muestra aunque normalmente se suele escoger una

temperatura de 2500°C o 100°C mayor que la temperatura de atomización. Las temperaturas superiores a 2800°C podrían dañar el tubo y disminuir su tiempo de vida.

MODIFICANTES DE MATRIZ

El término “modificante de matriz” se refiere al proceso de adición de un determinado reactivo a la muestra con el fin de modificar el comportamiento térmico de la matriz, o en algunos casos, el del propio analito. Existen distintos tipos de modificantes de matriz con funciones específicas tales como:

- Estabilizar el analito en la etapa de calcinación permitiendo el uso de una temperatura de calcinación más elevada.
- Convertir la matriz en compuestos más volátiles que permitan su fácil eliminación en la etapa de calcinación.
- Retardantes del proceso de atomización del analito permitiendo la estabilización de las condiciones isotérmicas dentro del tubo de grafito, las cuales, en el caso de utilizar un tubo con plataforma, podrían dar lugar a interferencias en la fase vapor [2].

INTERFERENCIAS

Existen dos tipos de interferencias en los métodos de absorción atómica:

1. Interferencias espectrales: se producen cuando la absorción de una especie que interfiere se solapa o aparece muy próxima a la absorción del analito, siendo imposible su resolución por parte del monocromador o por la presencia de partículas procedentes de la atomización que dispersan la radiación incidente de la fuente.
2. Interferencias químicas: se deben a diversos procesos químicos que pueden ocurrir durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. Algunos ejemplos son la formación de compuestos de baja volatilidad, reacciones de disociación, reacciones de ionización, etc [3].

LÁMPARAS DE CÁTODO HUECO

Consisten en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico, cerrados herméticamente en un tubo de vidrio, lleno de neón o argón a baja presión. El cátodo está constituido por el metal a determinar, siempre que sea fácilmente mecanizable y de temperatura de fusión alta o sirva de soporte para una capa de dicho metal. La lámpara utilizada en este proyecto para medir plata era marca Perkin-Elmer.



Figura 1. Espectrómetro



Figura 2. Lámpara de cátodo hueco

OBJETIVOS

Los objetivos de este proyecto se describen a continuación:

- **Puesta a punto del espectrómetro Perkin-Elmer AAnalyst 300 con HGA 800.**
- **Optimización de los parámetros instrumentales y analíticos del equipo.**
- **Determinación de plata en muestras biológicas (riñones, hígados y heces) mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica.**
- **Validación del método mediante la utilización de una muestra certificada.**

EXPERIMENTAL

MATERIALES

- Matraces aforados de 10 mL.
- Vasos de precipitados.
- Vidrios de reloj.
- Cuentagotas.
- Micropipetas.
- Tubos de plástico de 10 mL con tapón roscado para el almacenaje de las muestras.

EQUIPOS

- Espectrómetro modelo AAnalyst 300 con HGA 800 (Marca: PERKIN-ELMER).
- Automuestreador modelo AS-72 (Marca: PERKIN-ELMER).
- Sistema de generación de agua ultrapura (Marca: MILLIPORE).
- Agitador mecánico REAX 2 (Marca: HEIDOLPH)
- Sonda de ultrasonidos (Marca: PERKIN-ELMER y SONICS MATERIALS).
- Balanza analítica de doble rango AG 245 (Marca: METTLER TOLEDO).

REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Disoluciones y reactivos utilizados en la preparación de rectas de calibrado y de las muestras.

- **TRITON X-100**
Marca: SIGMA-ALDRICH
Lote: 52C0350
CAS: 59030-15-8
 - **L-CISTEÍNA**
Marca: SIGMA-ALDRICH
Lote: 58H0441
CAS: 52-90-4
-

- **Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% (w/w)**

Marca: ALFA AESAR

Lote: B24W007

CAS: 75-59-2

- **Disolución patrón de Pd de 10000 mg/L**

$c(\text{Pd}) = 10,0 \pm 0,2 \text{ g/L (Pd(NO}_3)_2 / \text{HNO}_3 \text{ ca. 15\%)}$

Marca: MERCK

Lote: B240089 413

- **HNO₃ concentrado**

Marca: PROLABO

Lote: 09G160524

- **Disolución patrón de Ag de 1000 mg/L**

Marca: PANREAC

PUESTA EN FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO

Para realizar las medidas de absorbancia de las muestras se utilizó un espectrómetro de emisión-absorción atómica modelo Perkin-Elmer AAnalyst 300 con HGA 800 con un automuestreador acoplado modelo Perkin-Elmer AS-72.

La puesta en marcha de este equipo requiere una serie de pasos ordenados. En primer lugar se enciende la campana de aspiración y se coloca la lámpara de cátodo hueco correspondiente al elemento que se va a medir, en este caso plata. Posteriormente se abre paso de las corrientes de agua de refrigeración al equipo y de argón. Se enciende la cámara de grafito, el programador y el ordenador. Desde el programa correspondiente en el ordenador (AA WinLab) se abre la cámara de grafito para la colocación del tubo pirolizado. Se ajusta el tubo con la pieza adecuada y se cierra el horno desde el ordenador. Se procede al acondicionamiento del tubo y posteriormente se enciende la lámpara de cátodo hueco todo ello desde el programa del ordenador. Se comprueba la energía e intensidad de la lámpara y se alinea el capilar del automuestreador. La altura a la que se deposita la muestra es determinante para obtener linealidad y reproducibilidad en los resultados. Las figuras que aparecen a continuación muestran la diferencia entre un capilar correctamente alineado y uno mal alineado.



Figura 3. Capilar mal alineado



Figura 4. Capilar mal alineado



Figura 5. Capilar correctamente alineado

En la figura 3 el capilar está demasiado elevado, la muestra no se depositará correctamente en el tubo. En la figura 4 el capilar está demasiado bajo, la muestra no se depositará correctamente en el tubo. La figura 5 muestra la correcta alineación del capilar.

Posteriormente se carga el método de análisis desde la biblioteca que proporciona el programa. Se rellenan los datos requeridos correspondientes al elemento a analizar (longitud de onda, rendija, volumen de muestra a introducir, programa de temperaturas, concentración de los patrones para las rectas de calibrado, etc.) y por último se colocan los viales con las disoluciones en el carro móvil del automuestreador, teniendo siempre en cuenta la numeración, ya que habrá que indicarla en el programa.

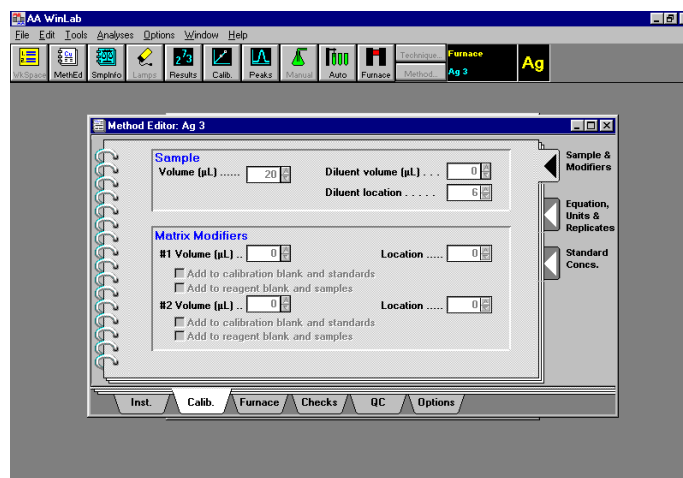


Figura 6. Interfaz del programa AA WinLAB

Todas las medidas de absorbancia obtenidas en este proyecto se expresan en área de pico obtenida del valor medio de tres medidas consecutivas restando el valor del blanco y con corrección de ruido de fondo empleando una lámpara de deuterio.

OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES Y ANALÍTICOS DEL EQUIPO

Como paso previo a la primera optimización del programa de calentamiento de la cámara, se realizaron varias medidas de absorbancia de una disolución de ácido nítrico al 0,2% con el fin de eliminar posibles impurezas internas en el equipo ya que llevaba varios años sin ser utilizado. Una vez realizada esta etapa, se preparó una disolución de 100 µg/L de plata (a partir de la disolución patrón de 1000 mg/L de Ag) en ácido nítrico al 0,2% para llevar a cabo la optimización del programa de calentamiento.

Se seleccionaron los siguientes parámetros instrumentales y temperaturas iniciales una vez consultadas distintas fuentes bibliográficas [4-7].

Tabla 1. Parámetros instrumentales

Intensidad de la lámpara (mA)	10
Longitud de onda (nm)	328,1
Rendija (nm)	0,7
Tipo de tubo	Pirolizado sin plataforma
Volumen de inyección (µL)	20

Tabla 2. Programa de calentamiento inicial

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Medida (*)
1	150	15	20	N
2	1000	15	30	N
3	1800	0	3	S
4	2500	1	3	N

(*) La medida de absorbancia no se realiza en las etapas 1,2 y 4 (N). Solamente en la etapa de atomización interrumpiendo el paso de argón (S).

Fijando las temperaturas de las etapas 2, 3 y 4, se probaron distintas temperaturas para la etapa 1. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados en función de la variación de la temperatura de calentamiento.

Temperatura (°C)	Absorbancia
130	0,154
150	0,196
180	0,137
200	0,141
210	0,133
230	0,129

Tomando como temperatura de calentamiento óptima 150°C y fijando los valores de temperaturas de las etapas 3 y 4, se optimizó la temperatura de la etapa 2. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados en función de la temperatura de calcinación

Temperatura (°C)	Absorbancia
800	0,265
900	0,276
1000	0,254
1100	0,031

Tomando como temperatura óptima de calcinación 900°C y fijando el valor de la temperatura de la etapa 4, se optimizó la temperatura de la etapa 3. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados en función de la variación de la temperatura de atomización

Temperatura (°C)	Absorbancia
1800	0,276
1900	0,295
2000	0,347
2100	0,275

La temperatura de la etapa de limpieza se mantuvo en 2500°C al no observar interferencias en las medidas posteriores. La tabla 6 muestra los resultados finales obtenidos.

Tabla 6. Programa de calentamiento con temperaturas optimizadas

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Medida
1	150	15	20	N
2	900	15	30	N
3	2000	0	3	S
4	2500	1	3	N

Una vez optimizadas las temperaturas del programa de calentamiento, al día siguiente se optimizaron las rampas y tiempos de las distintas etapas con el objetivo de reducir la duración del tiempo de análisis de cada muestra. Las tablas 7-11 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Resultados obtenidos en función de la variación del tiempo de la etapa 1

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Absorbancia
1	150	15	15	0,278
		15	20	0,295
2	900	15	30	
3	2000	0	3	
4	2500	1	3	

Tabla 8. Resultados obtenidos en función de la variación de la rampa de la etapa 1

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Absorbancia
1	150	10	20	0,277
		15	20	0,295
		20	20	0,245
2	900	15	30	
3	2000	0	3	
4	2500	1	3	

Tabla 9. Resultados obtenidos en función de la variación del tiempo de la etapa 2

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Absorbancia
1	150	15	20	
2	900	10	30	0,253
		15	30	0,295
3	2000	0	3	
4	2500	1	3	

Tabla 10. Resultados obtenidos en función de la variación de la rampa de la etapa 2

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Absorbancia
1	150	15	20	
2	900	15	25	0,275
		15	30	0,295
3	2000	0	3	
4	2500	1	3	

Los tiempos y rampas de las etapas 3 y 4 se mantuvieron con los valores iniciales al no observarse variaciones significativas en las medidas de absorbancia.

Una vez introducidos los componentes que forman la matriz de la muestra, se sustituyó el tubo de grafito pirolizado por uno nuevo con plataforma y se llevó a cabo una segunda optimización del programa de calentamiento con una disolución de 10 µg/L de plata, que se encuentra dentro del rango lineal para este elemento, al observarse interferencias junto al pico característico de la señal de absorbancia en el análisis de muestras control como muestra la siguiente figura:

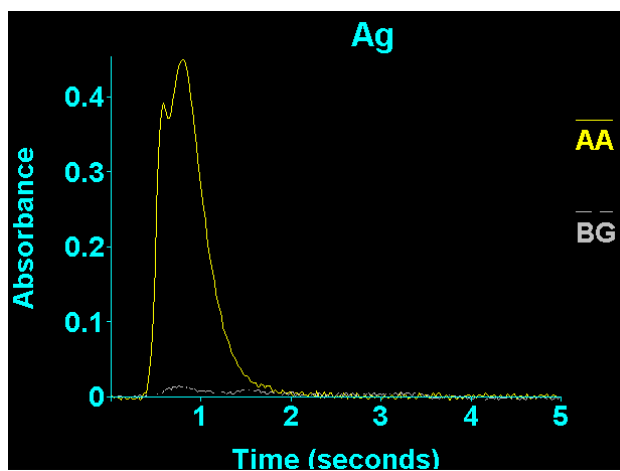


Figura 7. Interferencia obtenida en el análisis de muestras control

Se elevó la temperatura de atomización a 2200°C, temperatura a la cual el segundo pico desaparecía.

Durante el análisis de las muestras certificadas se comprobó con una tercera optimización que no existían cambios significativos en las señales de absorbancia obtenidas, por tanto se mantuvo el programa de calentamiento anteriormente seleccionado con una temperatura de atomización de 2200°C. A continuación se muestra el programa optimizado en la tabla 11.

Tabla 11. Programa de calentamiento optimizado

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Medida
1	150	15	20	N
2	900	15	30	N
3	2200	0	3	S
4	2500	1	3	N

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para el tratamiento de la muestra se preparan dos disoluciones:

- Disolución de cisteína al 0,5% (w/w): disolviendo 0,25 g de cisteína en agua ultrapura hasta una masa total de disolución de 50 g.
- Disolución de Tritón X-100 al 10% (w/w): disolviendo 5 g de Tritón X-100 en agua ultrapura hasta una masa total de disolución de 50 g.

Se pesan aproximadamente 100 mg de muestra en un tubo de plástico y se añaden 2 mL de TMAH comercial al 25% (w/w) y 500 μ L de disolución de cisteína. Se mantiene en agitación durante 24 horas y se añaden 50 μ L de disolución de Tritón X-100 y 20 μ L de disolución patrón de Pd de 10000 mg/L (modificante de matriz recomendado en bibliografía [8]). Finalmente se añade agua ultrapura hasta una masa total de 10 g [9-10].

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Una vez optimizado el programa de calentamiento de la cámara se preparó una recta de calibrado de concentraciones comprendidas entre 1 y 20 μ g/L de plata en ácido nítrico al 0,2% (sin introducir el medio en el que se encuentra la muestra). Con los valores de las concentraciones de los patrones introducidos en el programa AA WinLab, se calculan de forma automática los volúmenes necesarios para la preparación de los distintos patrones a partir de la disolución del blanco y de una disolución de 20 μ g/L de plata.

La disolución del blanco está compuesta por una disolución de ácido nítrico al 0,2% y para la preparación de la disolución de 20 μ g/L de plata se prepara una disolución intermedia de 1 mg/L de plata en un matraz de 10 mL a partir de la disolución patrón de 1000 mg/L de plata. El volumen que se toma de la disolución patrón de 1000 mg/L de plata se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Concentración} \times \text{Volumen} = \text{Concentración} \times \text{Volumen}$$

$$1000\text{mg/L} \times \text{Volumen}(\mu\text{L}) = 1\text{mg/L} \times 10000\mu\text{L}$$

$$V(\mu\text{L}) = 10\mu\text{L}$$

El volumen que habrá que tomar de dicha disolución para preparar la disolución de 20 µg/L de plata en un matraz de 10 mL se calcula de la siguiente forma:

$$1000\mu\text{g/L} \times \text{Volumen}(\mu\text{L}) = 20\mu\text{g/L} \times 10000\mu\text{L}$$

$$V(\mu\text{L}) = 200\mu\text{L}$$

A la disolución de 20 µg/L se le adicionan 20 µL de HNO₃ concentrado. Finalmente se enrasa con agua ultrapura.

Con ambas disoluciones ya colocadas en los viales del carro móvil y el espectrómetro en funcionamiento, se realiza la medida de absorbancia de los distintos patrones. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 12. Datos de la recta de calibrado

Concentración (µg/L)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,003	5x10 ⁻⁴	14,14
5,00	0,016	0,002	13,50
10,00	0,032	0,006	17,55
15,00	0,046	0,009	20,42
20,00	0,072	0,004	6,00
Blanco	0,000	0,001	103,07

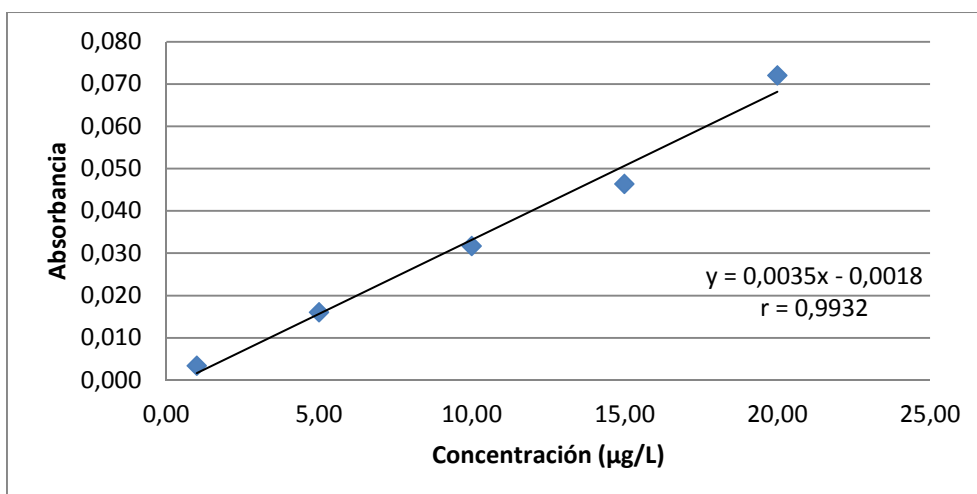


Figura 8. Recta de calibrado

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,001}{0,0035} = 0,857 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,001

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0035 L/μg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,001}{0,0035} = 2,857 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,001

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0035 L/μg

Se preparó una segunda recta de calibrado, de forma análoga a la explicada anteriormente, como paso previo al análisis de muestras control para comprobar el correcto alineamiento del capilar del automuestreador tras sustituirse el antiguo por uno nuevo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 13. Datos de la recta de calibrado

Concentración (μg/L)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,006	0,001	22,01
5,00	0,035	0,005	12,99
10,00	0,086	0,005	5,50
15,00	0,132	0,006	4,33
20,00	0,169	0,003	1,96
Blanco	0,005	9x10 ⁻⁴	18,86

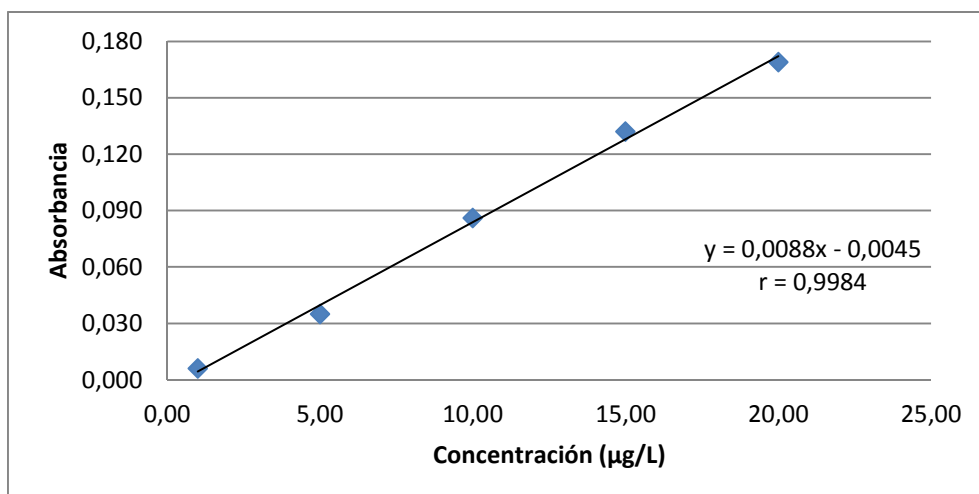


Figura 9. Recta de calibrado

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,0009}{0,0088} = 0,307 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,0009

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0088 L/µg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,0009}{0,0088} = 1,023 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,0009

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0088 L/µg

ANÁLISIS DE MUESTRAS

En este apartado se presentarán los resultados obtenidos de los análisis de muestras certificadas y muestras procedentes de heces, riñones e hígados de ratas control y experimentales especificando las fechas de análisis.

Las rectas de calibrado para el análisis de las muestras se prepararon a partir de una disolución de blanco y una disolución de 20 µg/L de plata.

Para la preparación de la disolución de 20 µg/L de plata se prepara una disolución intermedia de 1 mg/L de plata en un matraz de 10 mL a partir de la disolución patrón de 1000 mg/L de plata. El volumen que se toma de la disolución patrón de 1000 mg/L de plata se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Concentración} \times \text{Volumen} = \text{Concentración} \times \text{Volumen}$$

$$1000\text{mg/L} \times \text{Volumen}(\mu\text{L}) = 1\text{mg/L} \times 10000\mu\text{L} \qquad V(\mu\text{L}) = 10\mu\text{L}$$

El volumen que habrá que tomar de dicha disolución para preparar la disolución de 20 µg/L de plata en un tubo de plástico graduado de 10 mL se calcula de la siguiente forma:

$$1000\mu\text{g/L} \times \text{Volumen}(\mu\text{L}) = 20\mu\text{g/L} \times 10000\mu\text{L} \qquad V(\mu\text{L}) = 200\mu\text{L}$$

A la disolución de 20 µg/L de plata y a la disolución del blanco se les adicionan 2 mL de disolución comercial de TMAH (25% w/w), 500 µL de disolución de cisteína al 0,5%, 50 µL de disolución de Tritón X-100 al 10% y 20 µL de disolución de Pd de 10000 mg/L para que se encuentren en el mismo medio que la muestra. Finalmente se añade agua ultrapura hasta un peso de disolución de 10 g.

Una vez tratada la muestra se observó un residuo en el fondo del tubo (mayor para el caso de las heces) por lo que resultó necesaria la utilización de un equipo de ultrasonidos para la medida directa de la suspensión. Con el espectrómetro en funcionamiento, se colocan las disoluciones del blanco y la disolución de 20 µg/L de plata (preparadas siempre el día del análisis) junto con la muestra en los viales del carro móvil del automuestreador.

Las muestras se agitan durante 5 segundos utilizando la sonda de ultrasonidos antes de ser introducidas al tubo de grafito y se realizan las medidas de absorbancia.



Figura 10. Equipo de ultrasonidos



Figura 11. Equipo de ultrasonidos



Figura 12. Sonda de ultrasonidos

Heces

En la investigación previa a la realización del presente proyecto se analizaron dos tipos de muestras de heces:

- T' 30 1': heces procedentes de ratas a las que se les suministró agua por sonda durante 30 días.
- C' 30 1': heces procedentes de ratas a las que se les suministró colargol por sonda en una concentración de 500 mg/kg de animal durante 30 días ajustando la dosis diariamente en función del peso de animal. La disolución de colargol se preparó disolviendo colargol en polvo en agua ultrapura empleando un equipo de ultrasonidos durante 60 segundos.

En dicho estudio no se pudo determinar la concentración de las heces procedentes de ratas control (T) al encontrarse por debajo del límite de detección de la técnica utilizada, espectrometría de absorción atómica con llama, mientras que para las muestras de heces procedentes de ratas experimentales (C) se obtuvo una concentración de plata de $16,13 \pm 1,33$ g/kg mediante digestión ácida.

En las figuras y tablas que se muestran a continuación aparecen los resultados obtenidos en este proyecto del análisis de muestras control de heces (T).

Tabla 14. Datos de la recta de calibrado del día 13/12/2012

Recta de calibrado			
Concentración (µg/L)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,068	0,005	7,87
5,00	0,254	0,001	0,37
10,00	0,472	0,004	0,79
15,00	0,576	0,055	9,63
20,00	0,687	0,006	0,87
Blanco	0,066	0,002	3,03

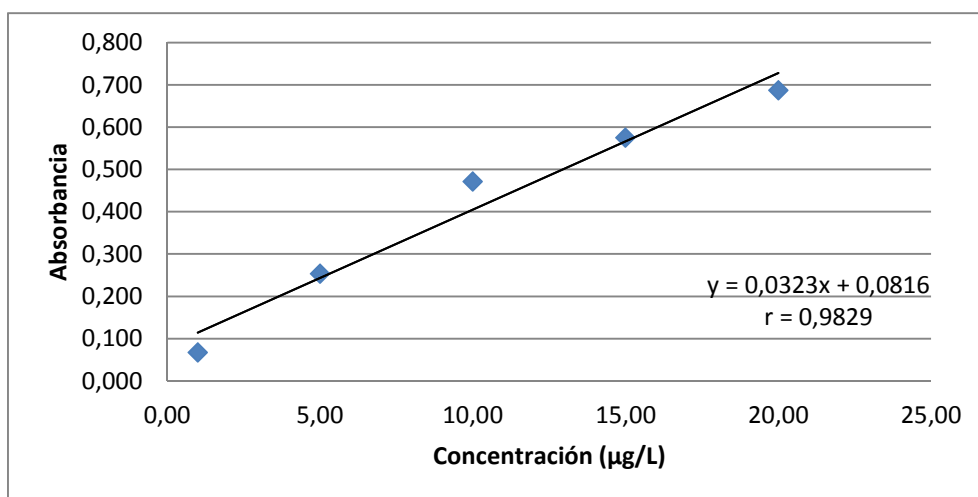


Figura 13. Recta de calibrado del día 13/12/2012

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,002}{0,0323} = 0,186 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0323 L / µg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,002}{0,0323} = 0,619 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0323 L/ μg

La recta de calibrado no presenta buena linealidad debido posiblemente a un alineamiento incorrecto del capilar.

Las medidas de absorbancia obtenidas a partir de los distintos patrones presentan valores más altos comparados con el resto de resultados obtenidos en las distintas rectas de calibrado posiblemente debido a la introducción del medio en el que se encuentra la muestra.

Tabla 15. Resultado de la medida de la muestra 1 preparada el día 12/12/2012

Muestra	Peso de muestra (g)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1 (T' 30 1')	0,1019	0,431	0,045	10,38

Tabla 16. Resultado de la concentración de la muestra 1 preparada el día 12/12/2012

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	SD	RSD (%)	Concentración original ($\mu\text{g/g}$)
1 (T' 30 1')(*)	10,82	1,385	12,80	0,080 \pm 0,138

(*) A la muestra 1 se le adicionó una concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ de plata.

Se repitió el procedimiento con una segunda alícuota de la misma muestra consiguiendo una mejora sustancial en la linealidad. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 17. Datos de la recta de calibrado del día 8/2/2013

Recta de calibrado			
Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,027	0,003	10,9
3,00	0,077	0,006	7,99
5,00	0,147	0,013	9,05
10,00	0,272	0,002	0,92
13,00	0,350	0,010	2,85
Blanco	0,011	0,002	2,95

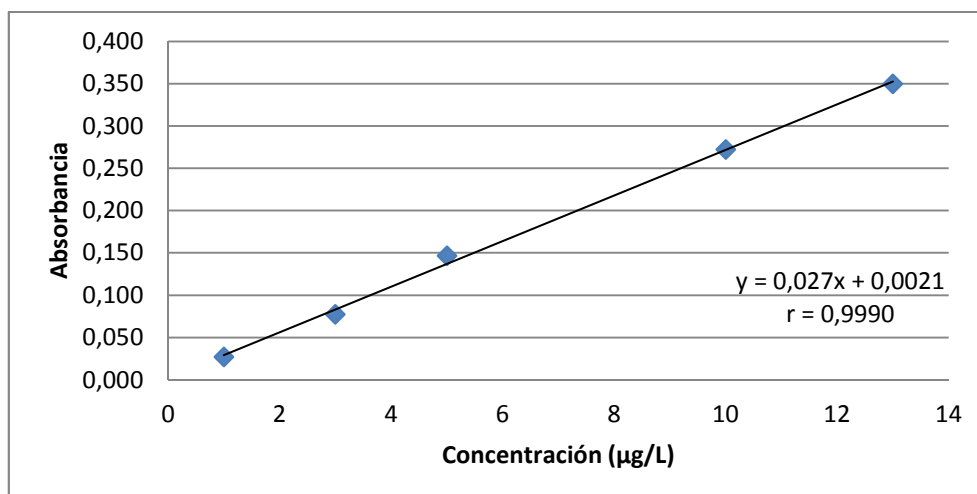


Figura 14. Recta de calibrado del día 8/2/2013

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,002}{0,027} = 0,222 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,027 L/µg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,002}{0,027} = 0,741 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,027 L/µg

Tabla 18. Resultado de la medida de la muestra 2 preparada el día 7/2/2013

Muestra	Peso de muestra (g)	Absorbancia	SD	RSD (%)
2 (T' 30 1')	0,1043	0,150	0,010	6,63

Tabla 19. Resultado de la concentración de la muestra 2 preparada el día 7/2/2013

Muestra	Concentración (µg/L)	SD	RSD (%)	Concentración original (µg/g)
2 (T' 30 1')(*)	5,460	0,367	6,72	0,044 ± 0,037

(*)A la muestra 2 se le adicionó una concentración de 5 µg/L de plata.

En el anexo A se muestran algunas de las señales obtenidas a partir del análisis de las muestras control de heces (figuras 18 -21).

El día 21 de febrero de 2013 se sustituyó el tubo de grafito pirolizado por un tubo nuevo al observarse poca reproducibilidad en las medidas obtenidas. Una vez desbloqueado el horno, se retiró el tubo en mal estado y se colocó el nuevo. El acondicionamiento del tubo nuevo se realizó de forma automática con el correspondiente comando desde el programa AA WinLab.

Muestras certificadas

Para la validación del método se analizaron muestras de material certificado DOLT-4 procedente de hígado de pez de la variedad *Squalus acanthias* con una concentración de plata de $0,93 \pm 0,07$ mg/kg [Nota: ver Anexo B].

Se realizaron medidas en diferentes días de las muestras agitadas y sin agitar midiendo sólo el sobrenadante para determinar si existían diferencias de concentración entre las mismas. Las muestras se mantuvieron refrigeradas en nevera en el periodo de tiempo transcurrido desde su preparación hasta la fecha de análisis. En las figuras y tablas que se muestran a continuación aparecen los resultados obtenidos.

Tabla 20. Datos de la recta de calibrado del día 11/3/2013

Recta de calibrado			
Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,027	0,002	6,37
3,00	0,079	0,004	4,74
5,00	0,132	0,001	0,76
10,00	0,255	0,001	0,49
15,00	0,386	0,003	0,65
Blanco	0,010	0,002	16,26

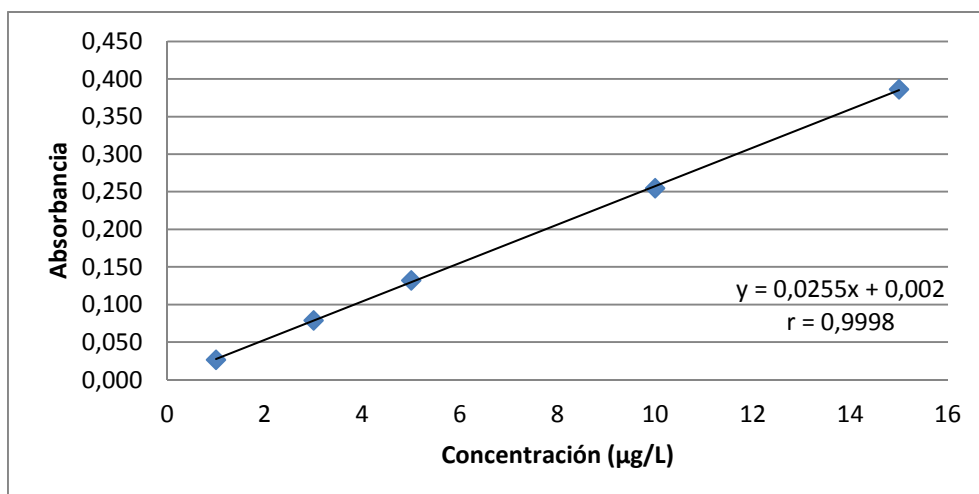


Figura 15. Recta de calibrado del día 11/3/2013

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,002}{0,0255} = 0,235 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0255 L/µg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,002}{0,0255} = 0,784 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0255 L/µg

Tabla 21. Resultados de las medidas de las muestras 3 y 4 preparadas el día 21/2/2013 y 5 y 6 preparadas el día 27/2/2013

Muestra	Peso de muestra (g)	Absorbancia	SD	RSD (%)
3 (DOLT-4)	0,1010	0,236	0,004	1,91
4 (DOLT-4)	0,1019	0,218	0,003	1,21
5 (DOLT-4)	0,1133	0,255	0,006	2,50
6 (DOLT-4)	0,1012	0,218	0,003	1,35

Tabla 22. Resultados de las concentraciones de las muestras 3 y 4 preparadas el día 21/2/2013 y 5 y 6 preparadas el día 27/2/2013

Muestra	Concentración (µg/L)	SD	RSD (%)	Concentración (µg/g)
3 (DOLT-4) (*)	9,16	0,176	1,92	0,907 ± 0,018
4 (DOLT-4) (*)	8,46	0,103	1,22	0,830 ± 0,010
5 (DOLT-4) (*)	9,92	0,250	2,52	0,875 ± 0,025
6 (DOLT-4) (*)	8,47	0,115	1,36	0,839 ± 0,011

(*)Muestras agitadas.

Tabla 23. Datos de la recta de calibrado del día 22/3/2013

Recta de calibrado			
Concentración (µg/L)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,026	0,001	3,14
3,00	0,071	0,001	1,33
5,00	0,117	0,005	4,10
10,00	0,225	0,004	2,00
15,00	0,332	0,002	0,75
Blanco	0,008	5x10 ⁻⁴	5,66

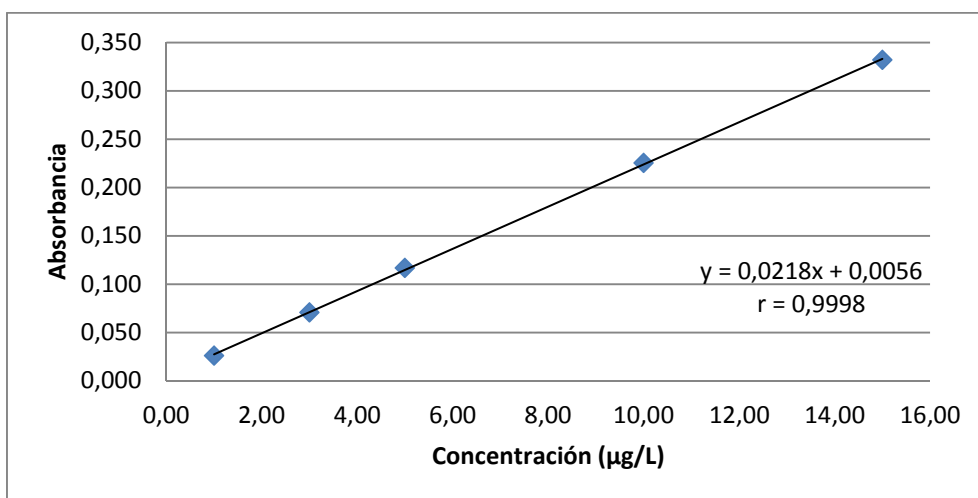


Figura 16. Recta de calibrado del día 22/3/2013

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,0005}{0,0218} = 0,069 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,0005

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0218 L / µg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,0005}{0,0218} = 0,229 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,0005

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0218 L/ μg

Tabla 24. Resultados de las medidas de las muestras 7 y 8 preparadas el día 20/3/2013

Muestra	Peso de muestra (g)	Absorbancia	SD	RSD (%)
7 (DOLT-4)	0,1044	0,211	0,002	1,02
7 (DOLT-4)	0,1044	0,204	0,001	0,49
7 (DOLT-4)	0,1044	0,214	0,002	0,88
8 (DOLT-4)	0,1011	0,205	0,002	1,00

Tabla 25. Resultados de las concentraciones de las muestras 7 y 8 preparadas el día 20/3/2013

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	SD	RSD (%)	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
7 (DOLT-4)(*)	9,42	0,099	1,05	0,905 \pm 0,010
7 (DOLT-4)(**)	9,10	0,046	0,50	0,874 \pm 0,005
7 (DOLT-4)(***)	9,54	0,086	0,91	0,917 \pm 0,009
8 (DOLT-4)	9,16	0,094	1,03	0,906 \pm 0,009

(*)Sobrenadante de la muestra sin agitación.

(**)Muestra agitada una vez eliminado el sobrenadante.

(***) Muestra completa agitada.

En el anexo A se muestran algunas de las señales obtenidas a partir del análisis de muestras certificadas (figuras 22-25).

Hígados y riñones

El tratamiento de las muestras de hígados y riñones es el mismo que para las heces encontrando en este caso un menor residuo. Las medidas se realizaron por duplicado siempre que la cantidad de muestra lo permitía.

En las tablas y figuras que aparecen a continuación se muestran los resultados del análisis de muestras de hígados y riñones procedentes de ratas control (T) y ratas experimentales (C).

Tabla 26. Datos de la recta de calibrado del día 17/4/2013

Recta de calibrado			
Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	SD	RSD (%)
1,00	0,023	0,001	3,55
3,00	0,072	0,002	2,35
5,00	0,126	0,001	0,75
10,00	0,269	0,006	2,20
15,00	0,392	0,004	0,94
Blanco	0,005	0,002	44,03

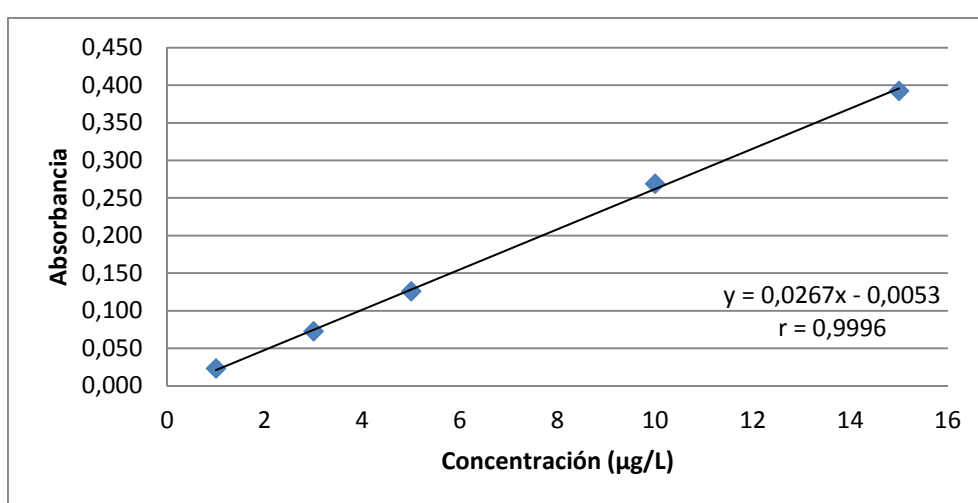


Figura 17. Recta de calibrado del día 17/4/2013

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times s}{m} = \frac{3 \times 0,002}{0,0267} = 0,225 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0267 L/ μg

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times s}{m} = \frac{10 \times 0,002}{0,0267} = 0,750 \mu\text{g/L}$$

Donde:

s = desviación estándar del blanco = 0,002

m = sensibilidad = pendiente de la recta de calibrado = 0,0267 L/ μg

Tabla 27. Resultados de las medidas de las muestras 9-15 preparadas el día 16/4/2013

Muestra	Peso de muestra (g)	Absorbancia	SD	RSD (%)	
Hígados	9 (T45 2L)	0,1026	0,008	0,001	17,68
	10 (T45 2L)	0,1039	0,003	0,002	77,06
	11 (C45 5L)	0,1007	0,293	0,011	3,90
	12 (C45 5L)	0,1018	0,266	0,029	10,80
Riñones	13 (T45 2L)	0,0600	0,004	0,001	34,02
	14 (C45 4L)	0,0672	0,159	0,004	2,35
	15 (C45 5L)	0,0659	0,152	0,002	1,55

Tabla 28. Resultados de las concentraciones de las muestras 9-15 preparadas el día 16/4/2013

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	SD	RSD (%)	Concentración ($\mu\text{g/g}$)	
Hígados	9 (T45 2L)(*)	0,498	0,053	10,63	0,033 \pm 0,005
	10 (T45 2L) (*)	0,298	0,077	25,79	0,029 \pm 0,008
	11 (C45 5L)	11,18	0,428	3,83	1,112 \pm 0,043
	12 (C45 5L)	10,17	1,077	10,59	1,002 \pm 0,108
Riñones	13 (T45 2L) (*)	0,336	0,047	13,91	0,056 \pm 0,005
	14 (C45 4L)	6,154	0,140	2,28	0,918 \pm 0,014
	15 (C45 5L)	5,879	0,088	1,50	0,893 \pm 0,009

(*)Las concentraciones obtenidas de las muestras 9, 10 y 13 se encuentran por debajo del límite de cuantificación.

En el anexo A se muestran las señales obtenidas de algunas de las muestras procedentes de hígados y riñones (figuras 26-29).

En un estudio anterior llevado a cabo con cerebro y bazo de las mismas ratas y mediante ICP-MS, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 29. Resultados del análisis de muestras de cerebros y bazos mediante ICP-MS

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/g}$)	
Cerebros	T45 2L	0,041 \pm 0,000
	C45 4L	2,258 \pm 0,007
	C45 5L	2,875 \pm 0,009
Bazos	T45 2L	0,020 \pm 0,001
	C45 4L	2,757 \pm 0,136
	C45 5L	4,439 \pm 0,184

CONCLUSIONES

En este proyecto se pretende determinar la concentración de plata en muestras biológicas mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica y solubilización en hidróxido de tetrametilamonio.

A continuación se detallan las conclusiones obtenidas:

- La puesta a punto realizada del espectrómetro Perkin-Elmer AAnalyst 300 con HGA 800 permite en un futuro el análisis de muestras siguiendo la misma metodología empleada en este proyecto.
- El tratamiento de la muestra llevado a cabo es disolución de 100 mg de muestra en 2 mL de TMAH comercial al 25% (w/w) y 500 μ L de disolución de cisteína manteniendo agitación durante 24 horas y posterior adición de 50 μ L de disolución de Tritón X-100 y 20 μ L de disolución patrón de Pd de 10000 mg/L añadiendo finalmente agua ultrapura hasta una masa total de 10 g. Con ello se ha conseguido determinar directamente la plata de la suspensión obtenida, sin separar previamente el residuo, introduciendo en el tubo de grafito la muestra agitada.
- Los resultados obtenidos del análisis de muestras control de heces adicionando distintas concentraciones de plata muestran la presencia de plata en la muestra original en una concentración de $0,044 \pm 0,037 \mu\text{g/g}$.
- Los resultados obtenidos del análisis de muestras certificadas con una concentración de plata de $0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$, ponen de manifiesto la validez del método empleado para el análisis de muestras habiéndose obtenido una concentración media de $0,911 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$.
- En las medidas realizadas a partir del sobrenadante no se observan variaciones de concentración significativas en comparación con los resultados obtenidos del análisis de la muestra completa obteniéndose una variación de $0,012 \pm 0,007 \mu\text{g/g}$ en una concentración inicial de $0,917 \pm 0,009$. Sin embargo, se recomienda para futuros análisis mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica la utilización de un sistema de agitación de muestra mediante ultrasonidos como paso previo a la medida de absorbancia de la misma.
- Del estudio realizado respecto a la variación de concentración de plata frente al tiempo en las muestras certificadas se observa una disminución de concentración respecto a una

concentración inicial de $0,911 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$ sin observarse una variación significativa entre 12 y 18 días.

- Para finalizar, destacar la importancia de poder medir la suspensión que se obtiene al agitar la muestra tratada e introducida directamente en la cámara de grafito con los resultados avalados por la muestra certificada.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos, donde aparecen los valores medios y la desviación estándar calculada como la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones estándar al cuadrado, dividido por el número de réplicas.

Tabla 30. Tabla resumen de resultados de muestras control de heces

HECES				
Muestra	Fecha de preparación	Fecha de análisis	Concentración original ($\mu\text{g/L}$)	Concentración original ($\mu\text{g/g}$)
T' 30 1'	7/2/2013	8/2/2013	0,460	$0,044 \pm 0,037$

Tabla 31. Tabla resumen de resultados de muestras certificadas

MUESTRAS CERTIFICADAS	
Muestra	Concentración experimental ($\mu\text{g/g}$)
DOLT-4	$0,911 \pm 0,009$

Tabla 32. Tabla resumen de resultados de muestras certificadas (concentración en función del tiempo)

Muestra	Concentración inicial	Concentración t=12 días ($\mu\text{g/g}$)	Variación ($\mu\text{g/g}$)
5 DOLT-4	$0,911 \pm 0,009$	$0,857 \pm 0,020$	$0,054 \pm 0,016$
6 DOLT-4			
Muestra	Concentración inicial	Concentración t=18 días ($\mu\text{g/g}$)	Variación ($\mu\text{g/g}$)
3 DOLT-4	$0,911 \pm 0,009$	$0,868 \pm 0,015$	$0,043 \pm 0,012$
4 DOLT-4			

Tabla 33. Tabla resumen de resultados de muestras de hígados y riñones

HÍGADOS Y RIÑONES		
	Muestra	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Hígados	(T45 2L)	$0,031 \pm 0,007$
	(C45 5L)	$1,057 \pm 0,082$
Riñones	(T45 2L)	$0,056 \pm 0,005$
	(C45 4L)	$0,918 \pm 0,014$
	(C45 5L)	$0,893 \pm 0,009$

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] R. Ebabe Elle; S. Gaillet; J. Vidé; C. Romain; C. Lauret; N. Rugani; J.P. Cristol; J.M. Rouanet. **“Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley Rats: silver distribution, effects on oxidative stress and inflammation”**. *Food and chemical toxicology journal*. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933361>>[Última consulta: 4 de septiembre de 2013]
- [2] Thermo Electron Corporation. <www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_1141.pdf>. [Última consulta: 4 de septiembre de 2013].
- [3] C. Harris, Daniel. *Análisis químico cuantitativo*. 6ª ed. Editorial Reverté. Capítulo 21. Interferencias químicas y EAA.
- [4] Manual del espectrofotómetro modelo Perkin-Elmer AAnalyst 300 con HGA 800.
- [5] Kanchana Songsilawat; Juwadee Shiowatana; Atitaya Siripinyanod. **“Flow field-flow fractionation with off-line electrothermal atomic absorption spectrometry for size characterization of silver nanoparticles”**. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), pp. 4213-4218.
- [6] Jamshid L. Manzoori; Hossein Abdolmohammad-Zadeh; Mohammad Amjadi. **“Ultra-trace determination of silver in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry after preconcentration with ligand-less cloud point extraction methodology”**. *Journal of Hazardous Materials* 144 (2007), pp. 458-463.
- [7] Ignacio López-García; Natalia Campillo; Isabel Arnau-Jerez; Manuel Hernández-Córdoba. **“Slurry sampling for the determination of silver and gold in soils and sediments using electrothermal atomic absorption spectrometry”**. *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003), pp. 1715-1721.
- [8] P. Bermejo-Barrera; J. Moreda-Piñeiro; A. Moreda-Piñeiro; A. Bermejo-Barrera. **“Study of chemical modifiers for direct determination of silver in sea water by ETA-AAS with deuterium background correction”**. *Talanta* 43 (1996), pp.35-44.
- [9] Bruno Lemos Batista; Denise Grotto; Jairo Lisboa Rodrigues; Vanessa Cristina de Oliveira Souza; Fernando Barbosa Jr. **“Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature”**. *Analytica Chimica Acta* 646 (2009), pp.23-29.
- [10] Joaquim A. Nóbrega; Mirian C. Santos; Rafael A. de Sousa; Solange Cadore; Ramon M. Barnes; Mark Tatro. **“Sample preparation in alkaline media”**. *Spectrochimica Acta Part B* 61 (2006), pp. 465-495.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros instrumentales	12
Tabla 2. Programa de calentamiento inicial	12
Tabla 3. Resultados en función de la variación de la temperatura de calentamiento	13
Tabla 4. Resultados en función de la temperatura de calcinación.....	13
Tabla 5. Resultados en función de la variación de la temperatura de atomización.....	13
Tabla 6. Programa de calentamiento con temperaturas optimizadas	14
Tabla 7. Resultados obtenidos en función de la variación del tiempo de la etapa 1	14
Tabla 8. Resultados obtenidos en función de la variación de la rampa de la etapa 1.....	14
Tabla 9. Resultados obtenidos en función de la variación del tiempo de la etapa 2	14
Tabla 10. Resultados obtenidos en función de la variación de la rampa de la etapa 2.....	15
Tabla 11. Programa de calentamiento optimizado	16
Tabla 12. Datos de la recta de calibrado	17
Tabla 13. Datos de la recta de calibrado	18
Tabla 14. Datos de la recta de calibrado del día 13/12/2012.....	22
Tabla 15. Resultado de la medida de la muestra 1 preparada el día 12/12/2012	23
Tabla 16. Resultado de la concentración de la muestra 1 preparada el día 12/12/2012	23
Tabla 17. Datos de la recta de calibrado del día 8/2/2013.....	23
Tabla 18. Resultado de la medida de la muestra 2 preparada el día 7/2/2013	24
Tabla 19. Resultado de la concentración de la muestra 2 preparada el día 7/2/2013	24
Tabla 20. Datos de la recta de calibrado del día 11/3/2013.....	25
Tabla 21. Resultados de las medidas de las muestras 3 y 4 preparadas el día 21/2/2013 y 5 y 6 preparadas el día 27/2/2013	26
Tabla 22. Resultados de las concentraciones de las muestras 3 y 4 preparadas el día 21/2/2013 y 5 y 6 preparadas el día 27/2/2013	27
Tabla 23. Datos de la recta de calibrado del día 22/3/2013.....	27
Tabla 24. Resultados de las medidas de las muestras 7 y 8 preparadas el día 20/3/2013	28
Tabla 25. Resultados de las concentraciones de las muestras 7 y 8 preparadas el día 20/3/2013.....	28
Tabla 26. Datos de la recta de calibrado del día 17/4/2013.....	29
Tabla 27. Resultados de las medidas de las muestras 9-15 preparadas el día 16/4/2013.....	30
Tabla 28. Resultados de las concentraciones de las muestras 9-15 preparadas el día 16/4/2013	30
Tabla 29. Resultados del análisis de muestras de cerebros y bazos mediante ICP-MS.....	30
Tabla 30. Tabla resumen de resultados de muestras control de heces	33
Tabla 31. Tabla resumen de resultados de muestras certificadas	33
Tabla 32. Tabla resumen de resultados de muestras certificadas (concentración en función del tiempo).....	33
Tabla 33. Tabla resumen de resultados de muestras de hígados y riñones.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectrómetro	5
Figura 2. Lámpara de cátodo hueco	5
Figura 3. Capilar mal alineado	11
Figura 4. Capilar mal alineado	11
Figura 5. Capilar correctamente alineado	11
Figura 6. Interfaz del programa AA WinLAB	11
Figura 7. Interferencia obtenida en el análisis de muestras control	15
Figura 8. Recta de calibrado	17
Figura 9. Recta de calibrado	19
Figura 10. Equipo de ultrasonidos	20
Figura 11. Equipo de ultrasonidos	21
Figura 12. Sonda de ultrasonidos	21
Figura 13. Recta de calibrado del día 13/12/2012	22
Figura 14. Recta de calibrado del día 8/2/2013	24
Figura 15. Recta de calibrado del día 11/3/2013	26
Figura 16. Recta de calibrado del día 22/3/2013	27
Figura 17. Recta de calibrado del día 17/4/2013.....	29
Figura 18. Señal obtenida para el patrón de 10 µg/L de la recta de calibrado del día 13/12/2012	41
Figura 19. Señal obtenida para el patrón de 15 µg/L de la recta de calibrado del día 13/12/2012	41
Figura 20. Señal obtenida para el patrón de 20 µg/L de la recta de calibrado del día 13/12/2012	42
Figura 21. Señal obtenida para la muestra 1 preparada el día 12/12/2012.....	42
Figura 22. Señal obtenida de la muestra certificada 3 preparada el día 21/2/2013	43
Figura 23. Señal obtenida de la muestra certificada 4 preparada el día 21/2/2013	43
Figura 24. Señal obtenida de la muestra certificada 5 preparada el día 27/2/2013	44
Figura 25. Señal obtenida de la muestra certificada 6 preparada el día 27/2/2013	44
Figura 26. Señal obtenida para la muestra 10 (hígado T45 2L)	45
Figura 27. Señal obtenida para la muestra 11 (hígado C45 5L)	45
Figura 28. Señal obtenida para la muestra 14 (riñón C45 4L)	46
Figura 29. Señal obtenida para la muestra 15 (riñón C45 5L)	46

ANEXOS

ANEXO A.

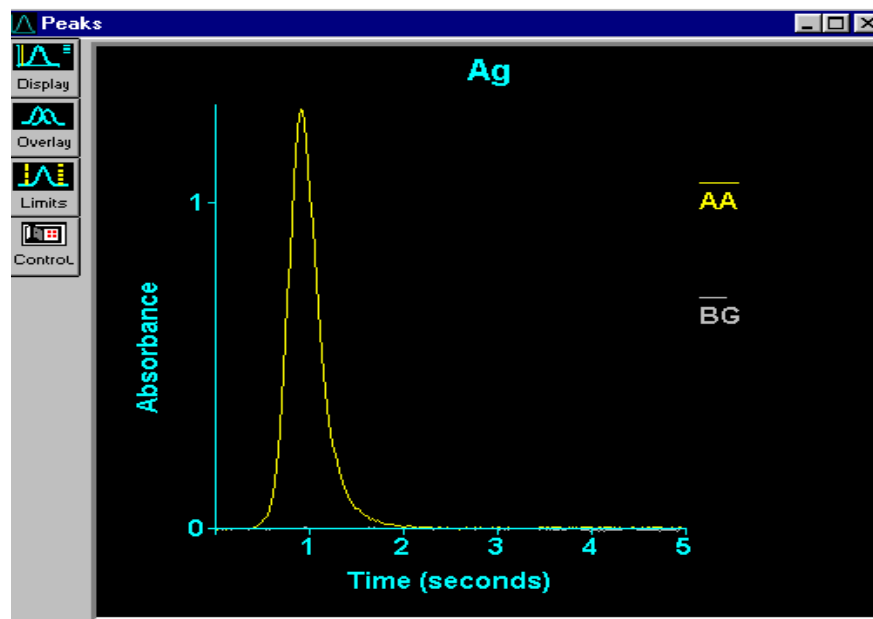


Figura 18. Señal obtenida para el patrón de $10 \mu\text{g/L}$ de la recta de calibrado del día 13/12/2012

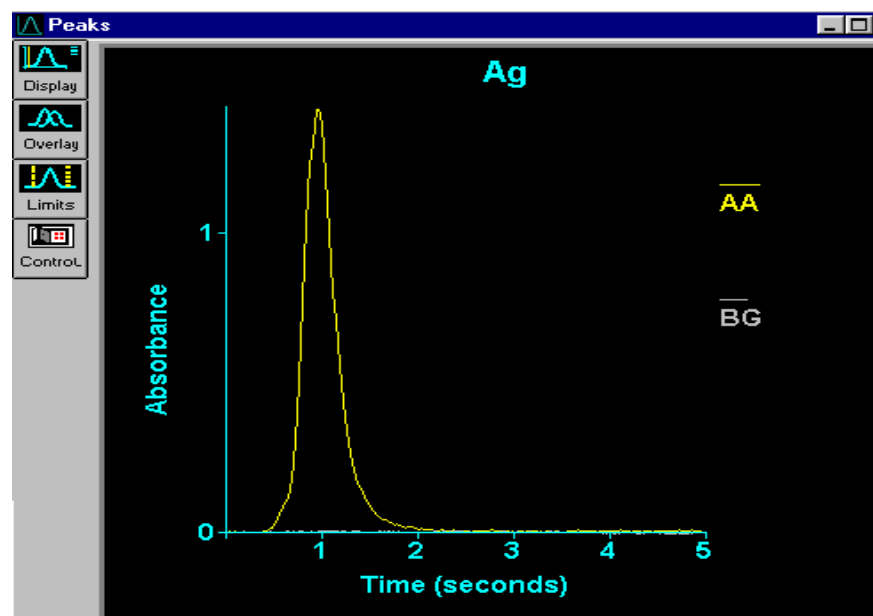


Figura 19. Señal obtenida para el patrón de $15 \mu\text{g/L}$ de la recta de calibrado del día 13/12/2012

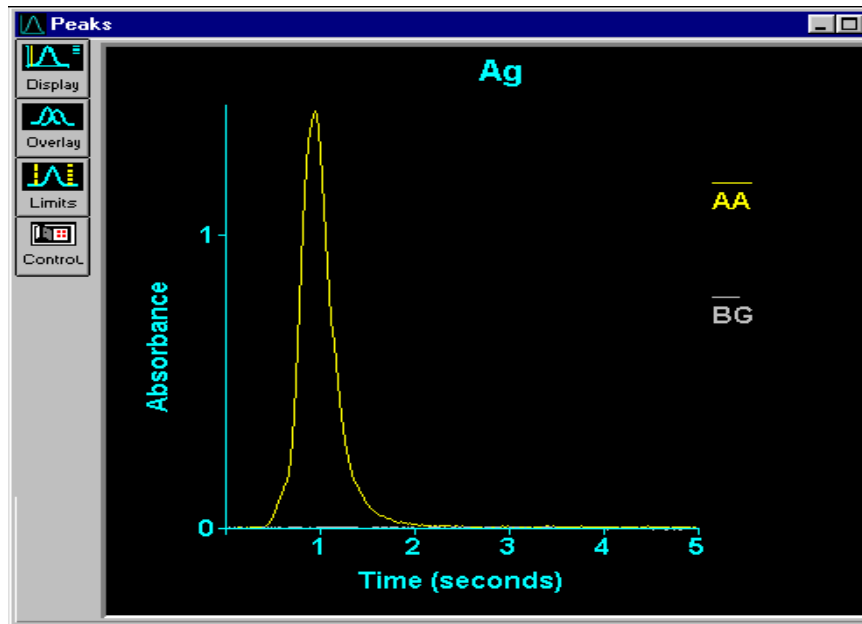


Figura 20. Señal obtenida para el patrón de 20 µg/L de la recta de calibrado del día 13/12/2012

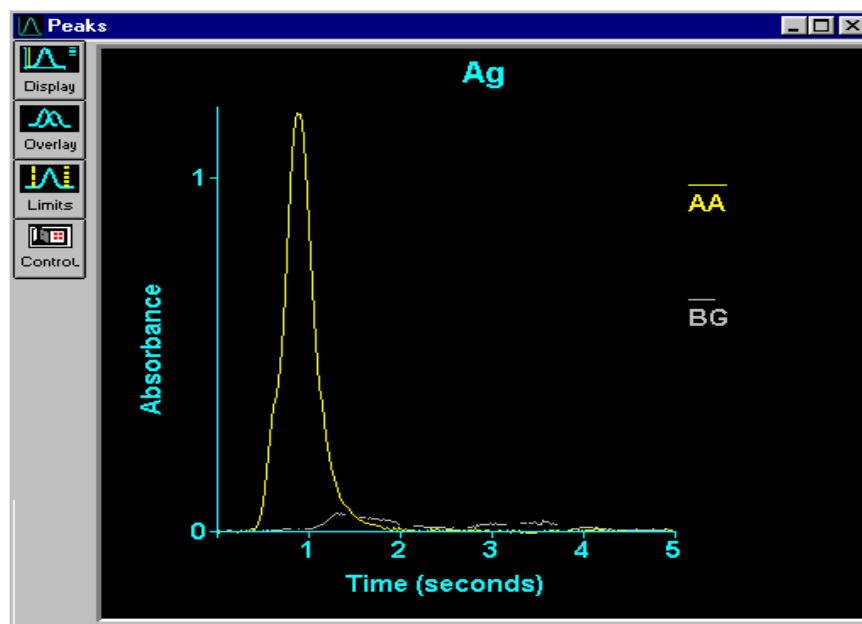


Figura 21. Señal obtenida para la muestra 1 preparada el día 12/12/2012

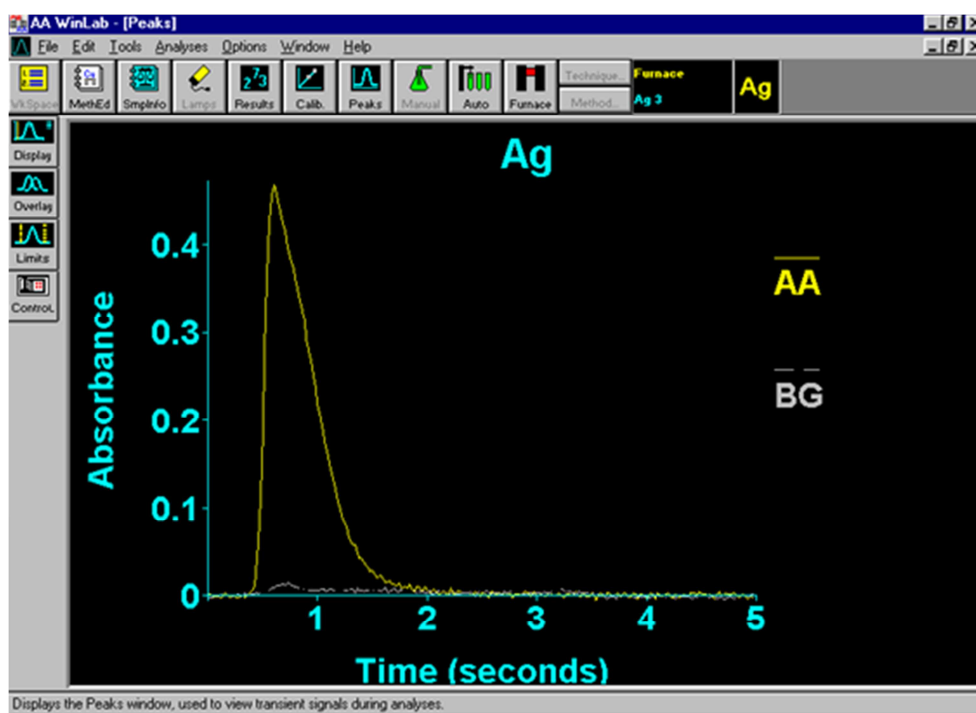


Figura 22. Señal obtenida de la muestra certificada 3 preparada el día 21/2/2013

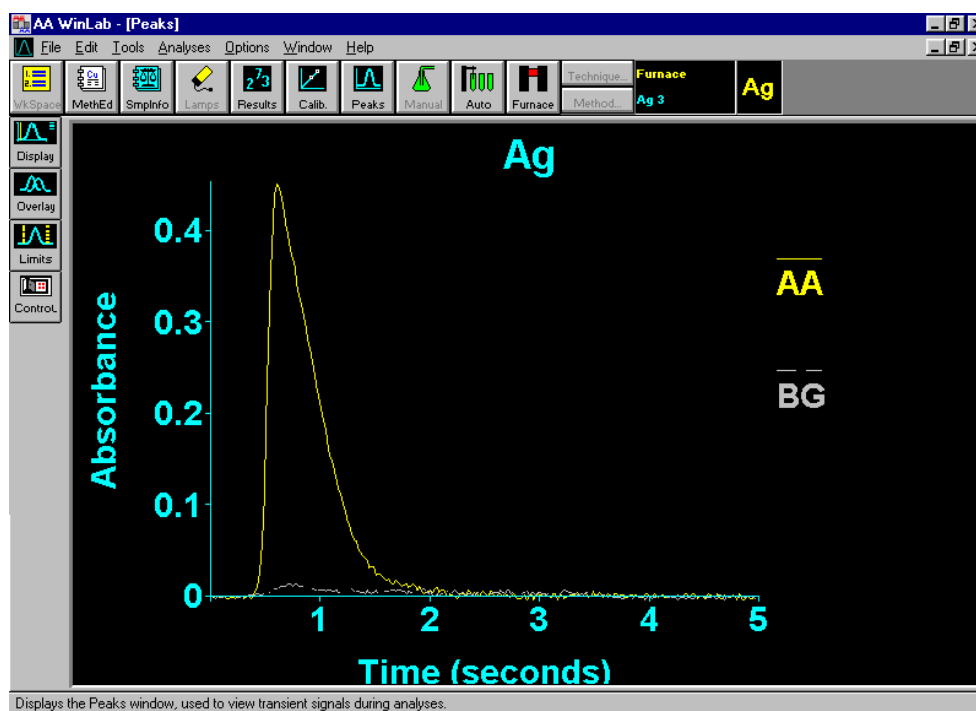


Figura 23. Señal obtenida de la muestra certificada 4 preparada el día 21/2/2013

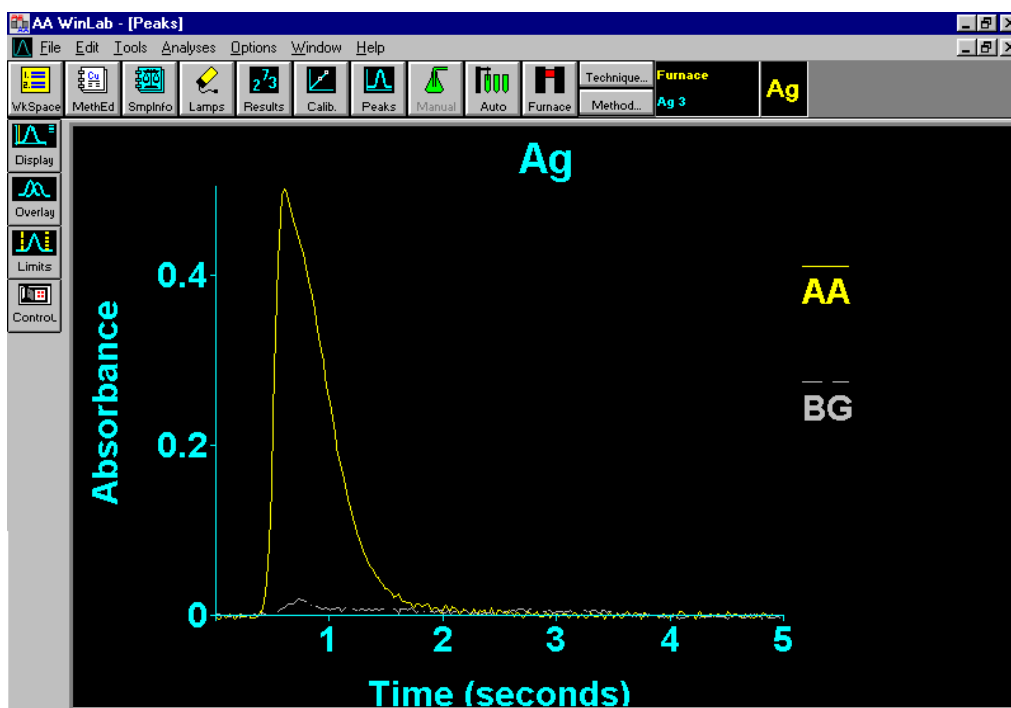


Figura 24. Señal obtenida de la muestra certificada 5 preparada el día 27/2/2013

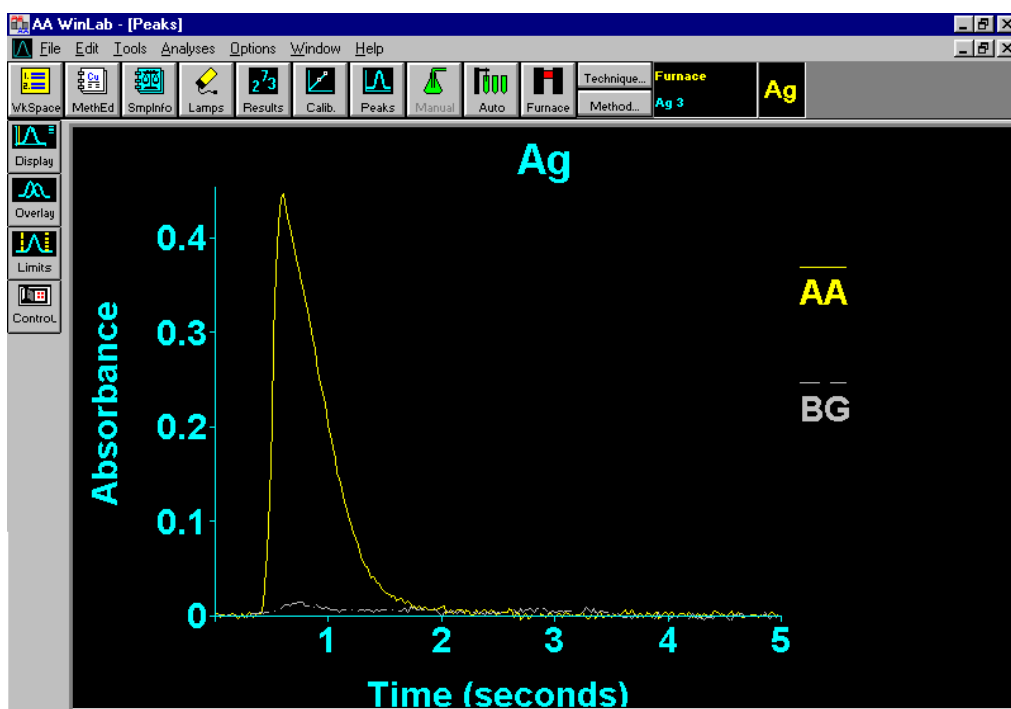


Figura 25. Señal obtenida de la muestra certificada 6 preparada el día 27/2/2013

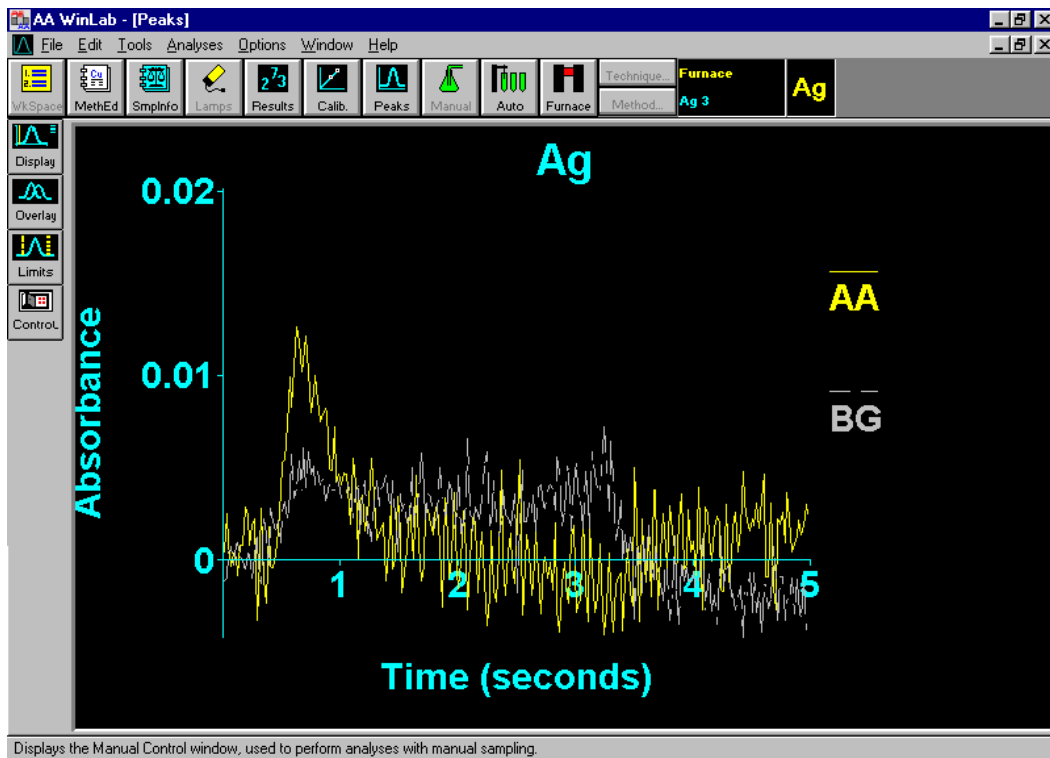


Figura 26. Señal obtenida para la muestra 10 (hígado T45 2L)

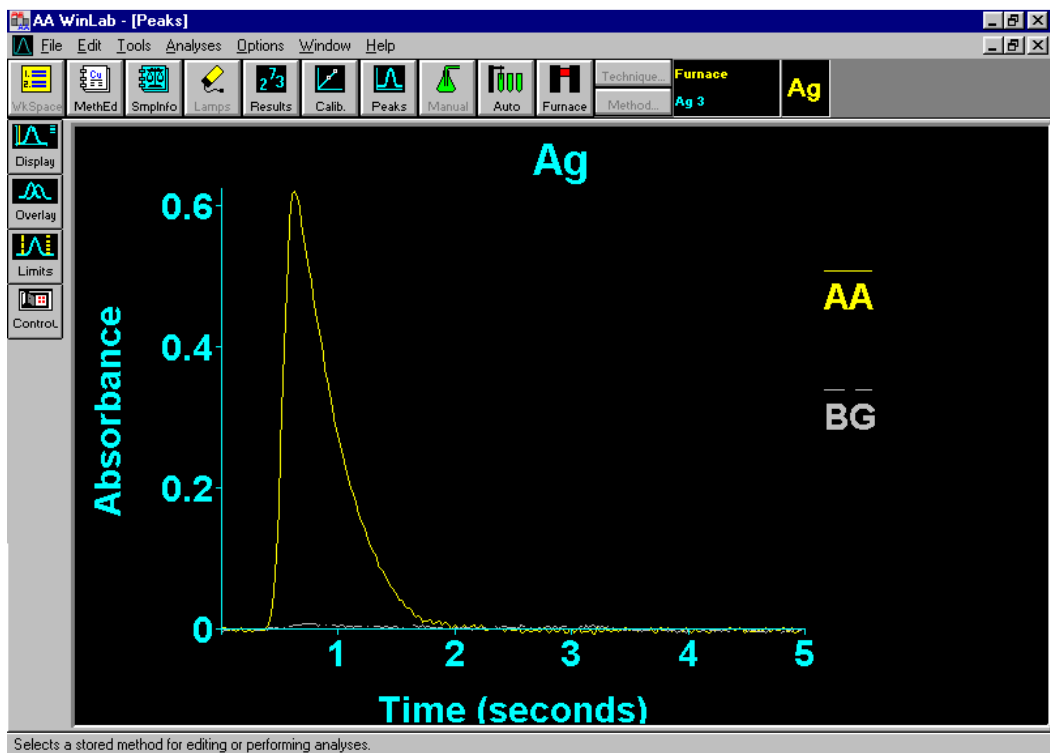


Figura 27. Señal obtenida para la muestra 11 (hígado C45 5L)

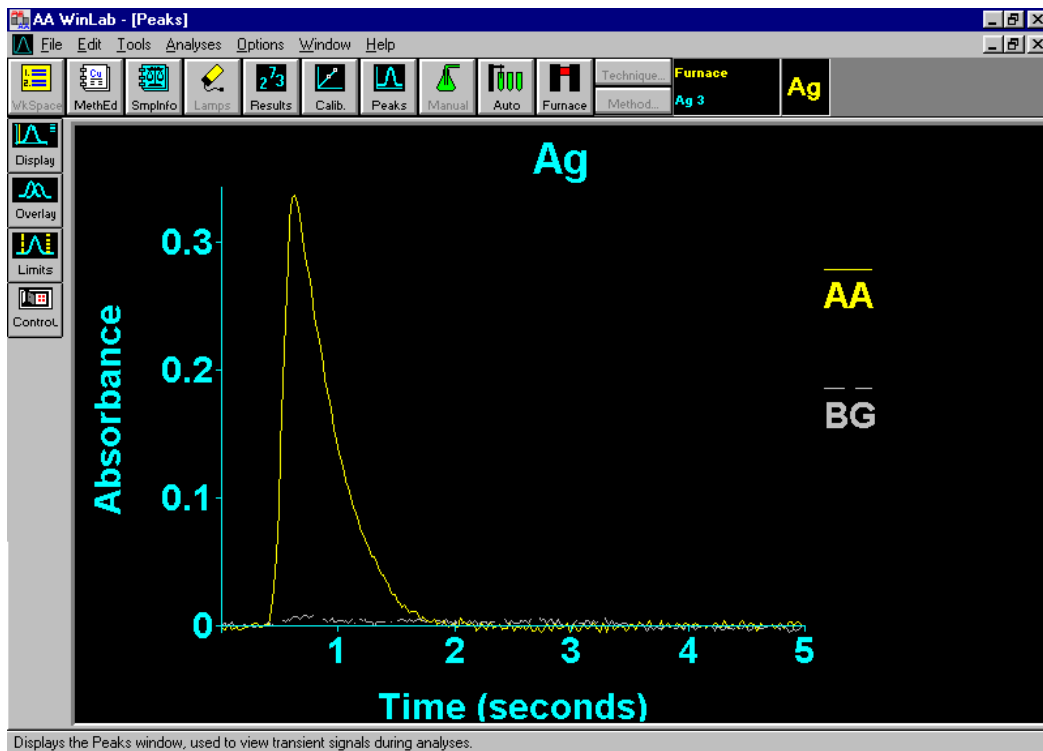


Figura 28. Señal obtenida para la muestra 14 (riñón C45 4L)

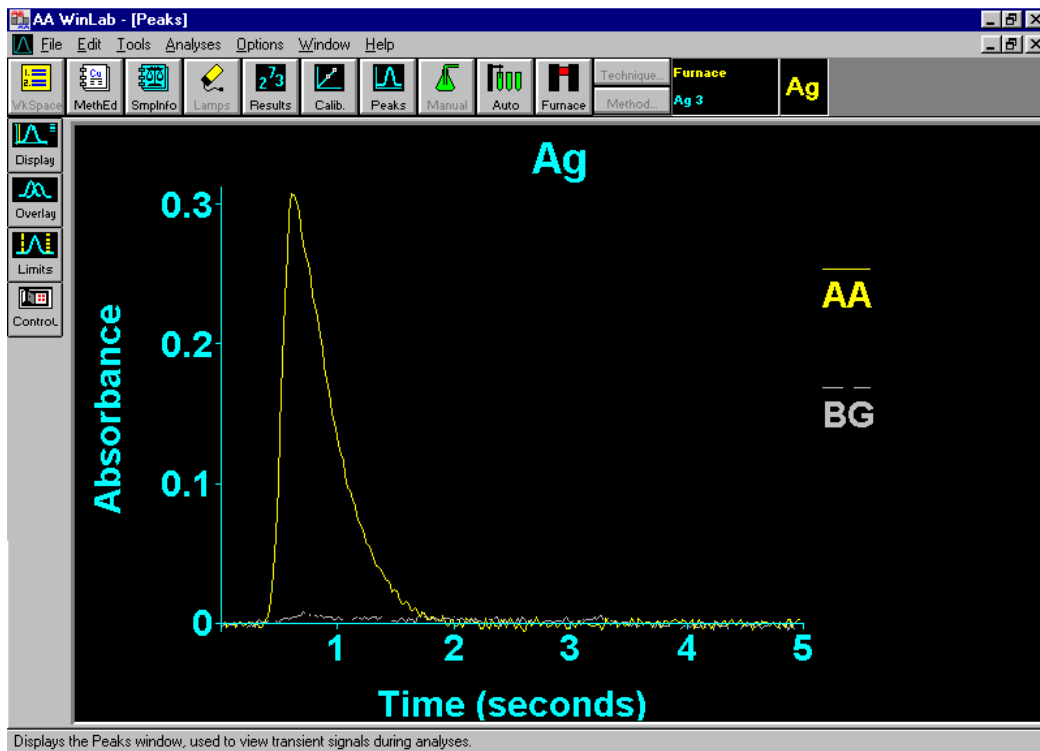


Figura 29. Señal obtenida para la muestra 15 (riñón C45 5L)

ANEXO B.

Certified Reference Material

National Research
Council CanadaConseil national
de recherches Canada**DOLT-4***Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals*

This reference material is primarily intended for use in the calibration of procedures and the development of methods for the analysis of marine fauna and materials with a similar matrix.

Elements for which certified values have been established for this dogfish (*Squalus acanthias*) liver CRM, along with their expanded uncertainty ($U_{CRM} = k u_c$, where u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO Guide [1] and $k=2$ is the coverage factor) are listed in Table 1. It is intended that U_{CRM} encompasses every aspect that reasonably contributes to the uncertainty of the certified mass fraction [2]. Values are based on dry mass.

Table 1. Certified Values for DOLT-4

Element	Mass Fraction (mg/kg)	
Arsenic (d,e,h)	9.66	± 0.62
Cadmium (d,e,i,p)	24.3	± 0.8
Copper (d,e,i,p)	31.2	± 1.1
Iron (d,i)	1833	± 75
Lead (d,e,p)	0.16	± 0.04
Mercury (c,d,p)	2.58	± 0.22
Nickel (d,e,i,p)	0.97	± 0.11
Selenium (e,h)	8.3	± 1.3
Silver (d,e,p)	0.93	± 0.07
Zinc (d,i,p)	116	± 8
CH ₃ Hg (as Hg)(g,s,t)	1.33	± 0.12

Coding

The coding refers only to the instrumental method of determination of the measurand.

- | | |
|---|---|
| c - Cold vapour atomic absorption spectrometry. | i - Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. |
| d - Inductively coupled plasma mass spectrometry. | p - Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICPMS). |
| e - Electrothermal vaporization atomic absorption spectrometry (ETAAS). | s - SPME isotope dilution gas chromatography ICPMS. |
| g - Solid phase microextraction (SPME) isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. | t - Ethylation cold vapor atomic fluorescence spectrometry. |
| h - Hydride generation atomic absorption spectrometry. | |

NRC · CNRC

Preparation of DOLT-4

This reference material was processed at the Guelph Food Technology Center, Guelph Ontario. The preparation sequence is illustrated below.



The material was sterilized by gamma irradiation (minimum dose of 25 kGy) at the Canadian Irradiation Centre, Laval, Québec

Sampling

A sample mass of 250 mg of material (dry mass basis) is the minimum sample intake for which the established uncertainty is valid.

Instructions for Drying

Moisture content should be determined using a separate sub-sample. DOLT-4 can be dried to constant mass by:

(1) drying at reduced pressure (e.g., 50 mm Hg) at room temperature in a vacuum desiccator over magnesium perchlorate for 24 hours;

(2) vacuum drying (about 0.5 mm Hg) at room temperature for 24 hours.

Information Values

Table 2 presents information values for elements which could not be certified because of insufficient information to accurately assess uncertainties.

Table 2. Information Values for DOLT-4

Element	Mass Fraction, (mg/kg)
Na	6800
Mg	1500
Al	200
K	9800
Ca	680
V	0.6
Cr	1.4
Co	0.25
Sr	5.5
Mo	1
Sn	0.17

Storage and Handling

This material should be kept in the original bottle tightly closed and stored in a cool location, away from any significant radiation sources such as ultraviolet lamps and sunlight. The contents should be well mixed by rotation and shaking prior to use, and the bottle tightly closed immediately after sampling.

Calculation of Certified Values

DOLT-4 was provided as an unknown sample to a group of laboratories participating in an annual intercomparison for trace metals in marine samples coordinated by NRCC [3]. Data generated by NRCC were also included in the pool of intercomparison results.

Laboratories were requested to provide triplicate results using an analytical method of choice based on total digestion of the sample. DOLT-3 was provided as a quality control sample.

Data were returned to NRCC for evaluation. Results from a select sub-group of participants were used for the certification of DOLT-4. Such laboratories were selected based on their performance history in previous intercomparisons.

The certified values were calculated from the unweighted means of the results. Data were first examined for outliers using the Dixon and Grubb's Tests. Testing of variances was conducted using the Cochran and Bartlett's Tests.

Included in the overall uncertainty estimate are uncertainties in the batch characterisation (u_{char}) and uncertainties related to possible between-bottle variation (u_{hom}). Expressed as standard uncertainties these components can be combined as:

$$u_{c(CRM)}^2 = u_{char}^2 + u_{hom}^2$$

Based on NRC's experience with similar materials, uncertainty components for long and short term stability were considered negligible and are thus not included in the uncertainty budget.

Results for the various uncertainty components used to calculate the certified values are summarized in Table 3.

Table 3. Statistical Data for DOLT-4

Element	data sets	u_{char} (mg/kg)	u_{hom} (mg/kg)
As	10	0.22	0.21
Cd	12	0.25	0.31
Cu	10	0.31	0.46
Fe	10	22	30
Pb	8	0.016	0.013
Hg	8	0.014	0.11
Ni	9	0.024	0.049
Se	9	0.18	0.63
Ag	8	0.017	0.028
Zn	11	2	2
CH ₃ Hg	3	0.016	0.057

Expiration of Certificate

A predecessor CRM, DOLT-2, has been periodically analyzed for more than nine years and found to be both physically and chemically stable over this time interval. We expect similar characteristics from DOLT-4. The stability of this CRM will continue to be monitored and any significant irregularity will be posted on our web site.

The certified values for DOLT-4 are considered valid until April 2014, provided the CRM is handled and stored in accordance with instructions herein.

References

- [1] Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. ISO, Geneva, Switzerland (1993).
- [2] ISO Guide 35:2006, Reference materials — General and statistical principles for certification Geneva, Switzerland (2006)
- [3] S. Willie, Twentieth Intercomparison for Trace Elements in Marine Sediments and Biological Tissues, NRC No. 50099, October 2007.

Acknowledgements

The following staff members of the National Research Council Canada, participated in the certification: P. Maxwell, C. Brophy, L. Yang and S. Willie.

The cooperation of I. Britt and A. Mannen of the Guelph Food Technology Centre, Guelph, ON, Canada in the preparation of this material is gratefully acknowledged.

The following laboratories participated in the certification of DOLT-4:

ALS Environmental
Vancouver, B.C. V5L 1K5

Australian Institute of Marine Sciences
Queensland, 4810, Australia

Australian Nuclear Science and Technology
Organization, Environmental Science Program
Menai, N.S.W., Australia

Battelle Pacific Northwest
Sequim Bay Road, Sequim, WA 98382

Massachusetts Water Resources Authority
Central Laboratory, Winthrop, MA 02152

NOAA, National Ocean Service,
Hollings Marine Laboratory, Charleston, SC 29412

San Francisco Public Utilities Commission
Southeast Laboratory, San Francisco, CA,

Texas A. & M.
College of Veterinary Medicine
Trace Element Research Laboratory
College Station, TX 77843-4458

Texas Parks and Wildlife
Environmental Contaminants Laboratory
San Marcos, TX 78666

U.S. Customs Laboratory
Savannah, GA 31408

USGS-WRD
3039 Anawiler Road, Atlanta, GA 30380-2824

Updates

Users of this material should ensure that the certificate in their possession is current. Please consult our web site at <http://www.nrc-cnrc.gc.ca> for any new information.

As additional data become available, the certified values may be updated and reliable values assigned to additional measurements.

Certificate issued May 2008.

The results presented in this certificate are traceable to the SI through gravimetrically prepared standards of established purity and international measurement intercomparisons. As such, they serve as suitable reference materials for laboratory quality assurance programs, as outlined in ISO/IEC 17025. NRCC CRM's are registered at the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) in Appendix C of the Comité International des Poids et Mesures database listing Calibration and Measurement Capabilities accepted by signatories to the Mutual Recognition Arrangement of the Metre Convention.

Comments, information and inquiries should be addressed to:

Dr. Zoltan Mester
National Research Council Canada
Measurement Science and Standards
M-12, 1500 Montreal Road
Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6

Telephone (613) 993-2359
Facsimile (613) 993-2451
E-mail crm.inms@nrc.ca

Également disponible en français sur demande.

Canada