

Desarrollo de Métodos de Digestión para la Medición de Minerales en Leche Fluida por ICP-AES y Cromatografía Iónica

Laura Regalado Contreras, Alicia Guevara Hernández, Flora Mercader Trejo, Mariana Arce Osuna

Centro Nacional de Metrología
km 4,5 Carretera a Los Cués, 76246, Querétaro, México.
lregalad@cenam.mx

RESUMEN

Dentro del proyecto FEMCIDI-OEA (Fondo Especial Multilateral del Consejo Interamericano para el Desarrollo Integral de la Organización de Estados Americanos) se planeó el desarrollo de un material de referencia de leche fluida, la cual se mediría en parámetros bromatológicos y minerales. Este trabajo muestra los resultados obtenidos para los minerales sodio, potasio, magnesio y calcio en un candidato a material de referencia de leche fluida, empleando dos métodos de análisis. En el primero se usó digestión por microondas para la preparación de la muestra e ICP-AES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) para el análisis de sodio y potasio. En el segundo método se empleó para la preparación de la muestra un método de digestión desarrollado en CENAM utilizando un digestor para proteína BÜCHI con tubos de cuarzo fabricados en CENAM y CI (Cromatografía Iónica) para la medición de sodio, potasio, magnesio y calcio. En ambos métodos se empleó el SRM 8435 como control obteniendo, en ambos casos, resultados de acuerdo con los valores certificados. Para sodio y potasio que son los mensurandos analizados por ambos métodos se obtuvo muy buena concordancia entre los resultados.

1. INTRODUCCIÓN

Apoyados por la Organización de Estados Americanos (OEA), México, a través del CENAM ha iniciado el proyecto multilateral 1201 FEMCIDI-OEA: "Colaboración para Soportar con Metrología Química la Evaluación de la Calidad e Inocuidad de los Productos del Sector Agroalimentario" en el que participan los siguientes países de Latinoamérica: Jamaica, Bolivia, Brasil, Argentina, Uruguay, Perú y México. Este proyecto incluye cuatro años para desarrollar de manera conjunta materiales de referencia que sean de utilidad para los países participantes. La primera etapa del proyecto, consistió en producir un material de referencia de leche fluida en el que se evaluaron los parámetros grasa, proteína, sólidos totales, lactosa, sodio, potasio y densidad. El lote de leche fue proporcionado por la empresa Liconsa de Querétaro y envasado en la división de materiales orgánicos del CENAM, este material se almacenó en congelación a -80°C para su posterior liofilización, con el fin de prolongar su vida de anaquel, facilitar su transporte y conservar las características propias de la leche fluida.

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en la medición de los minerales en leche fluida liofilizada reconstituida, empleando dos métodos de medición; en el primero se usó digestión por microondas para la preparación de la muestra e ICP-AES para el análisis de sodio y

potasio. En el segundo método se empleó para la preparación de muestra un método de digestión desarrollado en CENAM utilizando un digestor para proteína BÜCHI con tubos de cuarzo fabricados en CENAM y CI para la medición de sodio, potasio, magnesio y calcio. Para ambos casos se empleó el método de cuantificación por estándar interno utilizando itrio y litio, respectivamente. Todas las disoluciones utilizadas se prepararon gravimétricamente. Para ambos métodos se empleó el SRM 8435 como control obteniendo en ambos, resultados concordantes con los valores certificados. El objetivo de este trabajo es presentar los resultados obtenidos para los minerales sodio y potasio por ICP-AES y los obtenidos para sodio, potasio, magnesio y calcio por CI en el material de leche fluida.

2. METODOLOGÍA

2.1. Reactivos empleados

Hidróxido de litio.
Cloruro de sodio.
Cloruro de potasio.
Cloruro de magnesio.
Nitrato de Calcio.
Ácido nítrico grado Ultrex.
Ácido nítrico grado reactivo.
Peróxido de hidrógeno grado reactivo.
Peróxido de hidrógeno grado Ultrex.
Agua libre de sales con una resistividad de 18 m Ω .
EDTA.

Leche fluida liofilizada, el número total de unidades producidas fue de 1498, del cual se realizó un muestreo aleatorio estratificado para seleccionar las muestras que se medirían por cada método; el número de unidades seleccionadas fue de diez para cada método.

2.2. Materiales y equipos empleados

Tubos de cuarzo.

Matraces de polietileno de 50 mL, 100 mL y 1 000 mL de capacidad.

Balanza analítica con resolución de 0,1 mg.

Módulo de flujo laminar.

Espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

Sistema digestor por microondas.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de conductividad.

Digestor BÜCHI.

Campana de extracción para ácidos.

2.3. Protocolo de reconstitución de la leche

El proceso de reconstitución de la leche liofilizada se lleva a cabo con base en la cantidad de agua perdida durante el proceso de liofilización. Para cada muestra se proporciona una botella que contiene la muestra liofilizada y un tubo que contiene la cantidad de agua necesaria para su reconstitución, la cual se realiza de la siguiente manera:

1. Seleccionar la botella con la muestra liofilizada que va a ser reconstituida y su respectivo tubo con agua.
2. Preparar un baño de agua a 50°C.
3. Agregar a la botella toda el agua que contiene el tubo, colocar la tapa a la botella y cerrar herméticamente.
4. Colocar la botella dentro del baño de agua durante 6 min. Durante el periodo de calentamiento, la botella debe agitarse con un vortex en la posición 6 (en una escala de 0 a 10) para lograr la homogeneización de la muestra. Debe agitarse cada minuto por 30 s.
5. Tomar la cantidad de muestra necesaria para la medición.

2.4. Método espectrométrico

Se empleó un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), las condiciones del método se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones del método empleado por ICP-AES.

Parámetro	Especificación
Longitud de onda nm	Na 589,5 K 766,4 Y 324,2
Velocidad de la bomba (enjuague), rpm	100
Velocidad de la bomba (análisis), rpm	100
Potencia de RF, W	1350
Flujo del gas de nebulización, Lpm	0.5
Flujo del gas auxiliar, Lpm	0.5

2.5. Método cromatográfico

El sistema cromatográfico estuvo integrado por un módulo de separación Bio-Alliance 2695 inerte, acoplado a un detector de conductividad modelo 432, las condiciones del método cromatográfico se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones del método cromatográfico empleado.

Parámetro	Especificación
Fase móvil	EDTA 0,5 mM/3,8 mM de HNO ₃
Columna	IC-Pak C M/D de 3,6 x 150 mm (Waters, S.A).
Temperatura de medición	25 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	40 µL
Intervalo de base	2000
Sensibilidad	0,01

Tabla 3. Programa de digestión del microondas.

Etapa	Max W	%	Rampa min	CONTROL PRESIÓN psi	Tap min
1	300	100	8	40	3.0
2	1200	100	10	85	5.0
3	1200	100	10	130	5.0
4	1200	100	10	180	5.0

2.5. Procedimiento de digestión

Para la preparación de la muestra utilizando digestión por microondas, se empleó 1 g de muestra líquida reconstituida y se le agregaron 8 mL de HNO₃ grado Ultrex y 2 mL de H₂O₂ grado reactivo;

el programa de digestión utilizado se presenta en la Tabla 3.

Una vez realizada la digestión, las muestras se aforaron con agua y se midieron en el ICP-AES.

Para el método de digestión BÜCHI desarrollado en el CENAM, se emplearon 2 g de muestra líquida, los cuales se agregaron a los tubos de cuarzo y se adicionaron 9,5 mL de HNO₃ y 2 mL de H₂O₂ ambos grado Ultrex. Para llevar a cabo la digestión de la muestra se colocaron los tubos en el digestor para proteína BÜCHI y se colocaron en el nivel 4 de calentamiento por 15 min posteriormente se pasaron al nivel 5 por 25 min, agregando agua en caso de presentar evaporación y por último se pasaron al nivel 6 hasta el término de los lavados realizados; durante todo el proceso de digestión, se realizaron 4 lavados con agua para evaporar la mayor cantidad de ácido posible. Las muestras se aforaron a 100 g con agua y se procedió a inyectar en el sistema cromatográfico.

Para ambos métodos se prepararon las curvas de calibración de manera gravimétrica, en el caso del ICP-AES se preparó la curva multielemental a partir de los siguientes materiales de referencia certificados: SRM 3141 (Sodio), SRM 3152 (Potasio) y SRM 3167 (Litio), este último se empleó como estándar interno; en la tabla 4 se presentan las concentraciones de los puntos de la curva.

Tabla 4. Puntos de la curva de calibración multielemental para la medición por ICP-AES.

Punto	Na mg/kg	K mg/kg	Y mg/kg
1	2,50	9,09	10,08
2	3,34	12,13	10,20
3	4,17	15,17	9,97
4	5,00	18,20	10,09
5	5,84	21,23	10,06
6	6,68	24,31	10,11
7	7,51	27,30	10,10
8	8,34	30,32	10,11
9	9,18	33,36	10,11

En el caso del método de CI se prepararon curvas individuales para cada analito a partir de sus sales, a las cuales se les determinó previamente la pureza cromatográfica con la misma columna mencionada en la Tabla 2, para todos los analitos se empleó litio como estándar interno; en las Tablas 5 y 6 se presentan las concentraciones de los puntos de las curvas de calibración para la medición por CI.

Tabla 5. Puntos de las curvas de calibración para sodio y potasio en la medición por CI.

Punto	Li mg/kg	Na mg/kg		Li mg/kg	K mg/kg
1	1,89	0,99		1,85	6,56
2	1,81	4,52		1,96	9,30
3	2,04	5,11		2,00	11,08
4	1,75	6,51		1,84	13,28
5	2,00	8,59		1,69	16,89
6	1,79	10,56		2,00	21,48

Tabla 6. Puntos de las curvas de calibración para magnesio y calcio en la medición por CI.

Punto	Li mg/kg	Mg mg/kg		Li mg/kg	Ca mg/kg
1	2,10	0,87		2,14	6,27
2	1,87	1,41		1,95	9,44
3	1,91	2,62		1,75	12,59
4	2,05	3,40		1,92	16,20
5	1,70	5,22		2,24	20,21
6	-	-		1,86	22,74

Una vez obtenidos los resultados, se realizó la estimación de incertidumbre para cada analito por método de medición.

3. RESULTADOS

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para el material de referencia certificado empleado como control.

Tabla 7. Valores obtenidos para el material de referencia certificado empleado como control SRM-8435.

Analito	Valor Certificado mg/kg	U (k=2) mg/kg	Valor obtenido por ICP- AES mg/kg	Valor obtenido por CI mg/kg
Na	3560	400	3343	3578
K	13630	470	12837	13553
Mg	814	76	-	837
Ca	9220	490	-	9002

En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos con sus incertidumbres expandidas para sodio, potasio, magnesio y calcio de las mediciones realizadas con los dos métodos descritos. La estimación de incertidumbre se realizó de acuerdo a la *Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, OIML, 1995*.

Tabla 8. Valores de fracción de masa obtenidos para las muestras de leche fluida.

Analito	ICP-AES		Cromatografía iónica	
	Valor (mg/kg)	U (k=2) (mg/kg)	Valor (mg/kg)	U (k=2) (mg/kg)
Sodio	497,0	21,0	497,4	11,3
Potasio	1501,0	99,0	1559,2	36,7
Magnesio	-	-	105,8	8,3
Calcio	-	-	999,9	284,6

En las Figs. 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos en la medición de la fracción de masa de sodio y potasio respectivamente, empleando la técnica de ICP-AES. En el eje x se presenta el número de muestra medido de acuerdo con la secuencia de llenado.

Para todas las figuras, la línea central indica el valor promedio obtenido para cada analito, las líneas paralelas de tono más oscuro indican la incertidumbre expandida estimada por método y los puntos muestran los resultados obtenidos para las muestras analizadas.

En las Figs. 3 a 6 se presenta el valor de la fracción de masa obtenido para sodio, potasio, magnesio y calcio respectivamente, empleando la técnica de cromatografía iónica.

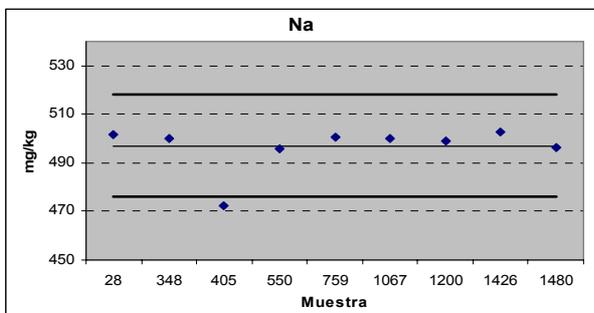


Fig. 1. Valores de fracción de masa para sodio obtenidos por ICP-AES en el material de leche.

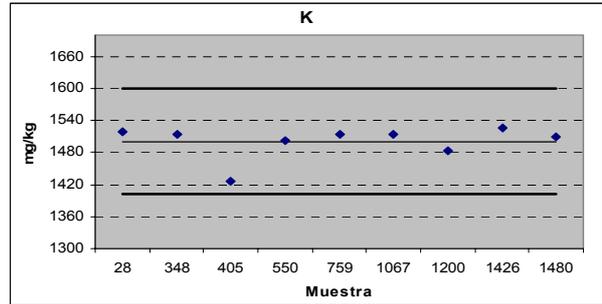


Fig. 2. Valores de fracción de masa para potasio obtenidos por ICP-AES en el material de leche.

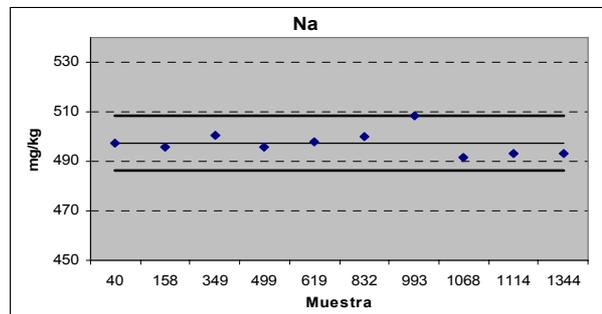


Fig. 3. Valores de fracción de masa para sodio obtenidos por CI en el material de leche.

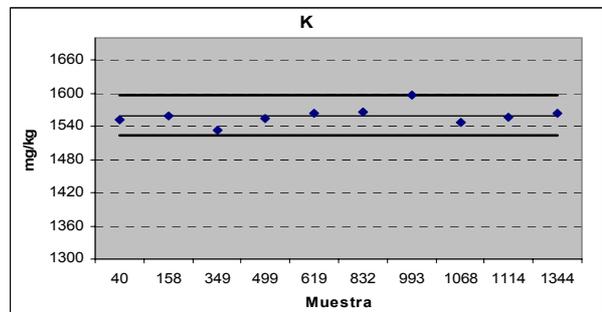


Fig. 4. Valores de fracción de masa para potasio obtenidos por CI en el material de leche.

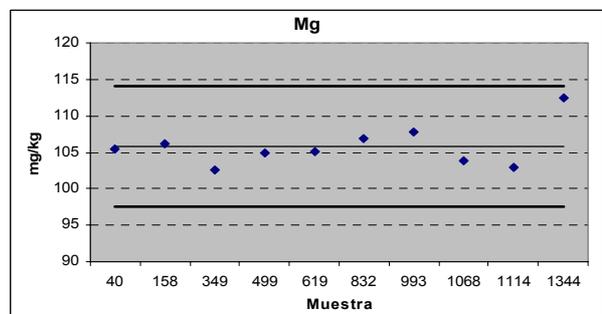


Fig. 5. Valores de fracción de masa para magnesio obtenidos por CI en el material de leche.

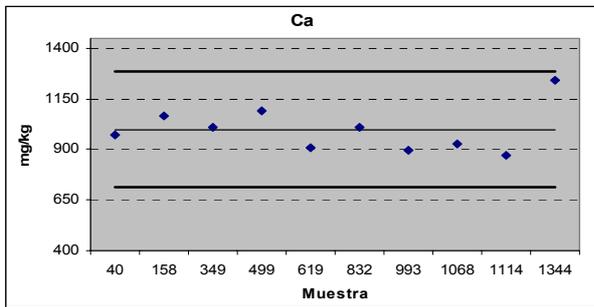


Fig. 6. Valores de fracción de masa para calcio obtenidos por CI en el material de leche.

En la Fig. 7 se presenta un cromatograma característico de los minerales medidos por CI.

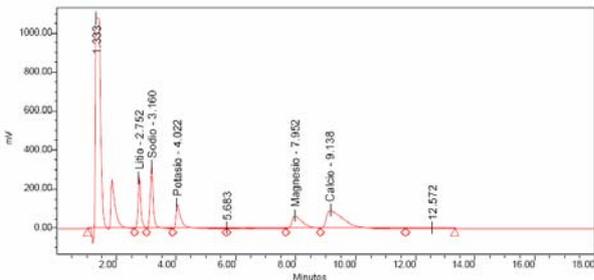


Fig. 7. Cromatograma obtenido por CI para el material de leche fluida.

4. DISCUSIÓN

En las Figs. 1 a 4 se puede observar que los resultados de sodio y potasio en ambos métodos presentan una buena reproducibilidad, ya que se realizó la prueba F para comparación de varianzas, observando que no hay diferencia estadística significativa.

Ambos métodos de digestión son adecuados para la preparación de muestras de leche fluida para la medición de minerales, sin embargo, para poder realizar las mediciones por CI es necesario eliminar la mayor cantidad de ácido posible, debido a que la resolución de los picos se ve afectada por la cantidad de ácido que tengan las muestras, por lo tanto si se quiere emplear digestión por microondas y medición por CI se tiene que evaporar el ácido presente.

Los resultados de magnesio obtenidos por digestión con BÜCHI y medición con CI muestran una buena reproducibilidad (Tabla 7 y Fig. 5), sin embargo mayor que la de sodio y potasio por el mismo método, mientras que para calcio se obtiene una

reproducibilidad considerablemente menor (Tabla 7 y Fig. 6). La disminución de reproducibilidad para magnesio y calcio se atribuye principalmente a que se empleó como estándar interno litio y su tiempo de retención (2,5 min) se encuentra alejado del magnesio (6 min) y calcio (6,8 min) por lo que la compensación resulta ser menor a la que ejerce en el sodio y el potasio. Otro factor es que el magnesio y el calcio permanecen más tiempo en la columna que el sodio y el potasio.

5. CONCLUSIONES

Con ambos métodos (ICP-AES y Cromatografía Iónica) se logro obtener el valor de referencia para el control.

El método de digestión desarrollado en el CENAM es un método alternativo de digestión, ya que tiene la ventaja de poder concentrar o diluir in situ la muestra de acuerdo a las concentraciones del analito de interés.

Una de las mejoras en el método de medición por cromatografía iónica para disminuir la incertidumbre de calcio y magnesio es emplear como estándar interno estroncio (Sr), debido a que el tiempo de retención del Sr es más cercano al calcio, ya que tiene un tiempo de retención entre 10 min y 12 min.

Una de las mayores ventajas del método de digestión con BÜCHI para la medición con cromatografía iónica es la reducción de los tiempos, ya que el tiempo total para la digestión de la muestra es de aproximadamente 2 h y la muestra obtenida esta lista para inyectarse en el sistema de CI, mientras que con el método de digestión por microondas es necesaria la evaporación del ácido en caso de querer medir con CI, lo cual se realiza en el CENAM en vasos de teflón sobre plato caliente y el tiempo aproximado es de 18 h. Otra ventaja que presenta es que permite el uso de grandes cantidades de muestra para el caso de matrices naturales en las cuales el analito de interés este en bajas concentraciones.

REFERENCIAS

[1] J. A. Nobrega, Y. Gélinas, A. Krushevska y R. M. Barnes. Direct Determination of Major and Trace Elements in Milk by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission and Mass Spectrometry. J. Anal. Atomic Spectroc.. Vol. 12, October 1997, 1243-1246.

- [2] A. L. Heckenberg, P.G. Alden, B.J. Wildmon, J. Krol, J.P. Romano, P.E. Jackson, P. Jandik and W. R. Jones. Mono/Divalent Cation Analysis using IC-Pak C M/D Column. Method # C-207. Waters Innovative Methods for Ion Analysis. Manual Number 22340. Waters S.A. 1989.
- [3] División de materiales metálicos CENAM, Informe de medición de minerales (Na y K) en el material de referencia DMR-411a "Leche entera fluida liofilizada. IM/620-AIGH-001/2008.
- [4] D. Amarasiriwardena, M. Kotrebai, A.Krushevskaya y R. M. Barnes. Multielement analysis of human milk by inductively coupled plasma mass and atomic emission spectrometry after high pressure, high temperature digestion. Canadian J. Anal. Sc. and Spectrom., Vol. 42,. 1997. No. 3, 69–78.
- [5] F. A. Rivero Martino, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks, *Analytica Chimica Acta*, 2001 No.442 ,191–200.
- [6] Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, OIML, 1995
- [7] División de materiales orgánicos CENAM, Informe de medición de minerales (Na, K, Mg y Ca) en el material de referencia DMR-411a "Leche entera fluida liofilizada empleando cromatografía iónica. IM/630-LRC-006/2008.