

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**DETERMINACIÓN DE HIERRO
EN MUESTRAS BIOLÓGICAS
POR IDA-ICP-MS**

Sonia Fernández Menéndez

Julio 2012, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de Química Física y Analítica

MARIA LUISA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "Determinación de Hierro en Muestras Biológicas por IDA-ICP-MS" ha sido realizado por la licenciada Sonia Fernández Menéndez, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio 2012

Fdo: María Luisa Fernández Sánchez

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Elementos traza y ultratrazas esenciales	2
1.2. Importancia biológica del hierro	3
1.3. El ciclo biológico del hierro	6
1.4. Métodos de determinación de elementos traza y ultratrazas en fluidos biológicos	8
1.5. Empleo de isótopos estables.....	9
1.5.1. Isótopos estables	9
1.5.2. Análisis por dilución isotópica.....	10
2. OBJETIVO	16
3. EXPERIMENTAL	18
3.1. Instrumentación utilizada	19
3.1.1. Espectrómetro de masas elemental: ICP-(OCR)-MS.....	19
3.1.2. Pequeños equipos utilizados	20
3.2. Material de laboratorio	21
3.3. Reactivos y disoluciones	22
3.4. Materiales de referencia	22
3.5. Procedimientos	23
3.5.1. Preparación de orina y suero	23
3.5.2. Preparación de los materiales de referencia	23
3.5.3. Lisado de eritrocitos.....	23
3.5.4. Homogeneización de las muestras de hígado	24
3.5.5. Mineralización de las muestras de hígado.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Evaluación de la exactitud y precisión de las medidas de las relaciones isotópicas de hierro.....	26
4.1.1. Condiciones de medida en el ICP-MS	26
4.1.2. Interferencias espectrales.....	27
4.1.2.1. Interferencias isobáricas	29
4.1.2.2. Interferencias poliatómicas	30

<i>Estudio del gas de colisión</i>	30
<i>Estudio de interferencias de calcio y sodio</i>	32
4.1.3. Tiempo muerto del detector	35
4.1.4. Discriminación de masas	37
4.1.5. Precisión en la medida de relaciones isotópicas del hierro.....	39
4.2. Caracterización de la disolución enriquecida isotópicamente en ^{54}Fe	40
4.3. Validación de la metodología.....	41
4.4. Determinación de hierro en muestras reales	42
5. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS	43
5.1. Conclusiones	44
5.2. Sugerencias para trabajos futuros	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Elementos traza y ultratrazas esenciales

La importancia de elementos traza ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ultratrazas ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en Biología y Medicina es indiscutible. A pesar de su aparente insignificancia cuantitativa, hoy está bien demostrado que dichos elementos (también llamados oligoelementos¹.) juegan un papel primordial en conocidas funciones vitales de los seres vivos. Concretamente, en los humanos se consideran esenciales el Fe, Zn, Cu, Se, I, Cr y Co, y su deficiencia en el hombre ha sido ampliamente estudiada. Se considera que un elemento traza es “esencial” si¹:

- a) Su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, las cuales pueden revertir cuando el elemento recupera su nivel fisiológico óptimo.
- b) El organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin ese elemento.
- c) El elemento posee una influencia directa sobre el organismo y está involucrado en sus procesos metabólicos.
- d) El efecto concreto de un elemento esencial no puede ser logrado totalmente por ningún otro elemento.

Para cada oligoelemento existe un intervalo de concentración óptima (“ventana biológica”)^{1,2} dentro del cual el organismo presenta funcionalidad óptima (ver Figura 1, línea verde). Por debajo de ese nivel la funcionalidad del organismo puede verse seriamente afectada y esta “insuficiencia” puede producir incluso la muerte. Por el contrario, cuando se incorpora un exceso del elemento, comienza a generar efectos tóxicos y finalmente, puede llegar a ser letal.

Además de los elementos traza esenciales en los organismos vivos, pueden existir otros elementos a nivel de traza y ultratrazas (p.ej. Cd, Hg, Al y Pb) sin una función fisiológica conocida hasta la fecha, pudiendo actuar como tóxicos en el organismo ya a muy bajas concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (ver Figura 1, línea roja).

Finalmente, existen elementos que se suministran con fines terapéuticos (p.ej. Au, Pt, Li, etc.) y cuya concentración en el organismo debe controlarse igualmente.

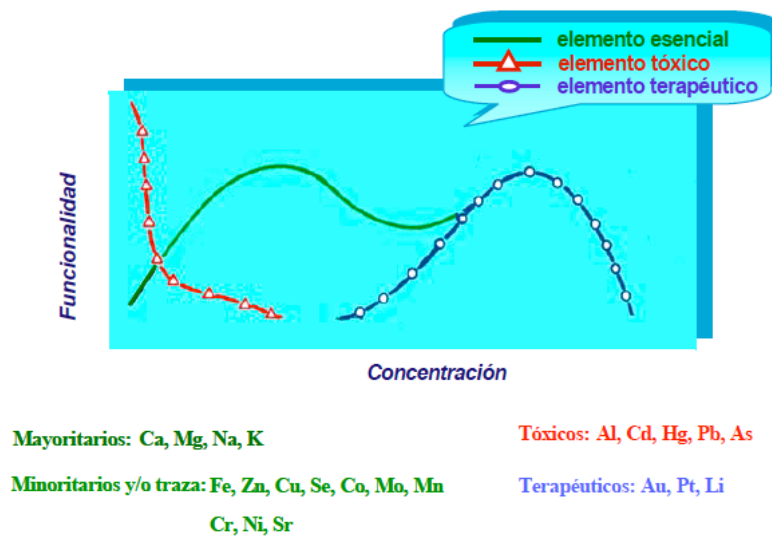


Figura 1. Relación entre la dosis ingerida o disponible de un elemento esencial, tóxico o terapéutico y la funcionalidad del organismo

De todos los elementos esenciales citados, el hierro será objeto de estudio en el presente trabajo. Por ello, a continuación se procederá a detallar el papel que desempeña éste en el organismo humano.

1.2. Importancia biológica del hierro

El hierro es un elemento esencial para la vida, no solo por ser indispensable para la respiración humana, sino también por ser un constituyente clave de un gran número de enzimas^{3,4}. En el ser humano el hierro es requerido para la síntesis de las hemoproteínas que, como su nombre indica, poseen el grupo químico “hemo” (anillo de porfirina en cuyo interior se encuentra un átomo de hierro). Una de las proteínas más importantes de este tipo es la hemoglobina, que es la proteína primaria presente en glóbulos rojos responsable del transporte de oxígeno desde los pulmones a otros tejidos. Otras proteínas y enzimas que contienen el grupo “hemo” incluyen: citocromos, proteínas críticas para la producción energética celular y de transporte de electrones; catalasa/peroxidasa, enzimas antioxidantes; así como la proteína mioglobina, implicada en el transporte del oxígeno en células musculares. Además, el hierro se puede encontrar en una variedad de metaloproteínas no-hemo, tales como:

la transferrina y lactoferrina, responsables del transporte del elemento; la enzima ribonucleótido reductasa necesaria para la síntesis de ADN y para la división celular; la ferritina, proteína responsable del almacenaje intracelular del hierro⁵; y la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenada, implicadas en la cadena de transporte mitocondrial de electrones que median reacciones bioquímicas y producen adenosina trifosfato (ATP, el compuesto portador de la energía que utilizan los seres vivos)

El hierro en el organismo puede hallarse en tres compartimentos básicos⁶:

- ❖ *Funcional*: formado por diferentes compuestos como la hemoglobina, mioglobina, y enzimas que requieren hierro como cofactor o como grupo prostético, bien en su forma iónica o como grupo hemo, para realizar su función.
- ❖ *Depósito*: el hierro absorbido a través del intestino, que excede las necesidades funcionales inmediatas, es depositado en los tejidos principalmente en forma de ferritina y en menor medida como hemosiderina. La ferritina y la hemosiderina se encuentran mayoritariamente en el hígado, en la médula ósea, en el bazo, en el músculo esquelético e incluso pueden encontrarse en la circulación sanguínea a niveles muy bajos. Este compartimento constituye la reserva de este elemento en el organismo.
- ❖ *Transporte*: los compartimentos funcional y de depósito están ligados por un compartimento de transporte consistente en el hierro de la transferrina. Este hierro es liberado en los tejidos a través de los receptores que tiene la transferrina en las células individuales.

Como puede observarse en la Figura 2, la mayor parte del hierro en el organismo forma parte del hierro activo (80%), encontrándose aproximadamente el 64% en la hemoglobina de los eritrocitos, molécula compuesta por cuatro unidades, cada una con un grupo hemo y una cadena proteica. Un 10% se halla en la mioglobina y una proporción menor (cercana al 5%) se halla en diversas enzimas como catalasas, peroxidasas y citocromos. El hierro restante se encuentra bien como hierro depósito (20%), formando parte de las proteínas que intervienen en la homeostasis y metabolismo de este elemento (ferritina y hemosiderina), o bien unido a transferrina como hierro circulante (para su transporte 1%).

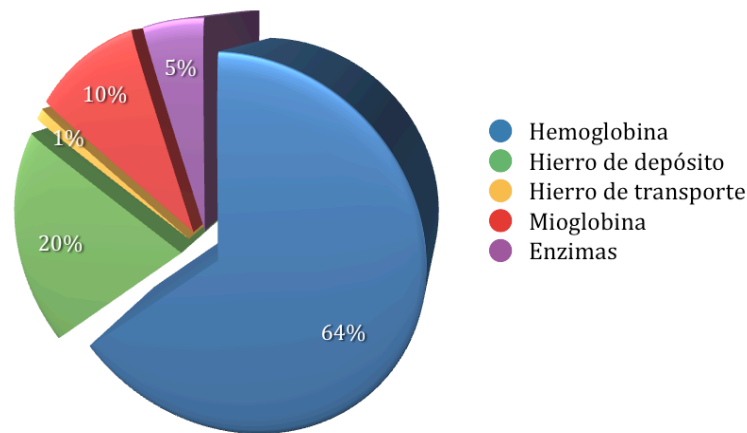


Figura 2. Distribución del hierro en el organismo

La falta de hierro en el organismo puede producir síntesis proteicas deficientes, deficiencia inmunitaria, aumento del ácido láctico, aumento de noradrenalina, menor compensación de enfermedades cardiopulmonares y la anemia. La anemia se caracteriza por síntomas como la fatiga, dolor de cabeza, anorexia y, en situaciones más severas, produce anomalías del tejido epitelial causando dolores de lengua y boca y estomatitis⁷. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la deficiencia de hierro como el principal desorden o deficiencia nutricional en el mundo⁸. Es más que probable que hasta el 80% de la población mundial sea deficiente en hierro y, lo que es más importante, el 30% de la misma población, que supone aproximadamente 2000 millones de personas, es anémica por deficiencia de este elemento⁹. Los grupos de población más vulnerables son las mujeres embarazadas y en periodo de lactancia, y los niños lactantes.

Es por ello de vital importancia desarrollar una metodología analítica que permita la determinación exacta y precisa de dicho elemento en los distintos fluidos biológicos.

1.3. El ciclo biológico del hierro

Una dieta normal en humanos contiene entre 15-20 mg de hierro/día, del que el organismo únicamente absorbe un 10%, lo que significa entre 1-2 mg/día. Un organismo absorbe únicamente la cantidad de hierro necesaria para equilibrar la pequeña proporción de hierro que se elimina fisiológicamente a través de la orina, el sudor, la exfoliación de las células cutáneas y mucosas, las pérdidas de sangre (muy importante en la menstruación) y fundamentalmente por las heces¹⁰.

La absorción del hierro depende en primer lugar del tipo de compuesto de hierro presente en la dieta, existiendo dos formas diferentes de absorción: la del hierro hemo y la del hierro inorgánico.

El hierro inorgánico por acción del ácido clorhídrico del estómago pasa a su forma reducida, hierro ferroso (Fe^{2+}), que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Aunque el hierro puede absorberse a lo largo de todo el intestino, su absorción es más eficiente en el duodeno y la parte alta del yeyuno. La membrana de la mucosa intestinal tiene la facilidad de atrapar el hierro y permitir su paso al interior de la célula, debido a la existencia de un receptor específico en la membrana.

El hierro hemo atraviesa la membrana celular como una metaloporfirina intacta, una vez que las proteasas endoluminales o de la membrana del enterocito hidrolizan la globina. Los productos de esta degradación son importantes para el mantenimiento del hemo en estado soluble, con lo cual garantizan su disponibilidad para la absorción. En el citosol la hemoxigenasa libera el hierro de la estructura tetrapirrólica y pasa a la sangre como hierro inorgánico.

Puesto que no existe una manera efectiva de excretar hierro, la regulación de la absorción de este mineral procedente de la dieta, juega un papel fundamental en la homeostasis del hierro en el organismo¹¹.

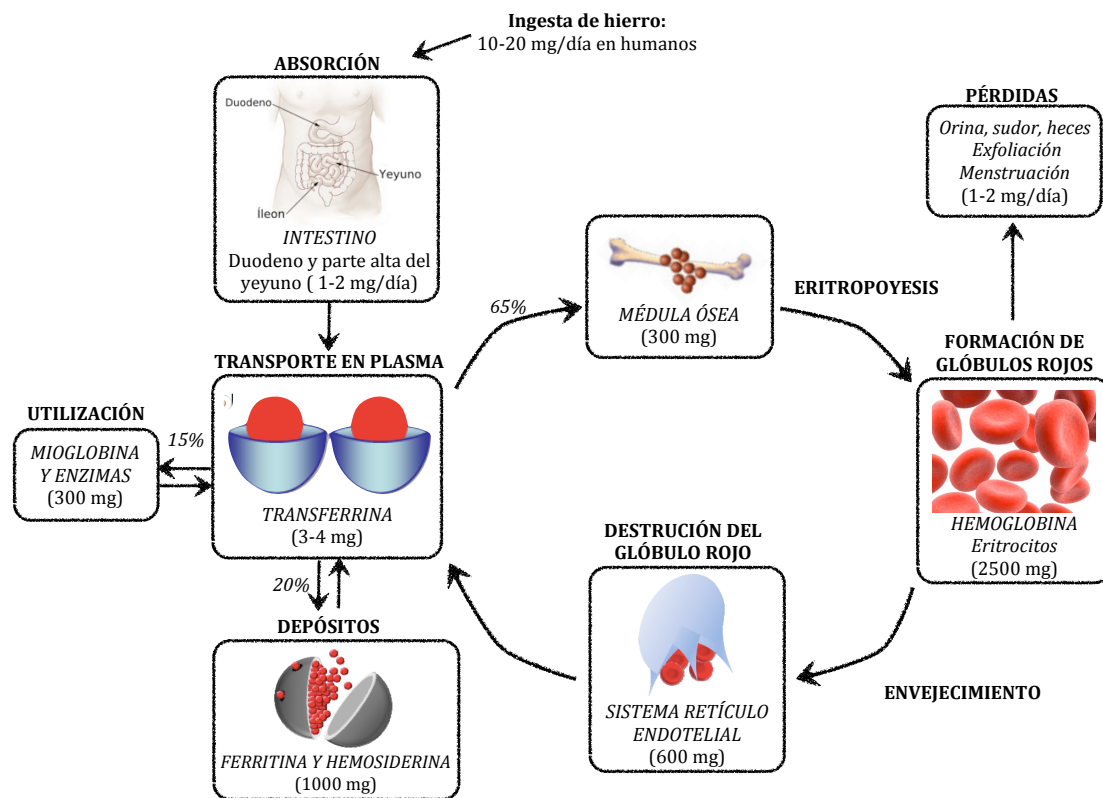


Figura 3. Esquema del ciclo biológico del hierro en el ser humano

El hierro absorbido es transportado por la transferrina. En el organismo, el hierro siempre aparece unido a proteínas (si estuviera libre generaría radicales libres). Todos los tejidos y células poseen un receptor específico para la transferrina, a través de cuya expresión en la superficie celular, regulan la captación del hierro de acuerdo con sus necesidades. La transferrina lleva el Fe a todas las células del organismo por tanto todas las células poseen receptores para tomar el Fe proveniente de la transferrina. En la médula ósea se forman los hematíes y tras 120 días van al bazo para ser degradados y el Fe se vuelve al hígado para ser reutilizado. En el hígado es donde se almacena el hierro y al ser muy oxidante tiene que estar unido a una proteína intracelular que es la ferritina..

En el enterocito es el encargado de transformar el Fe^{3+} en Fe^{2+} . El Fe^{3+} es una especie poco soluble y es como se encuentra en los alimentos ya que se oxida por el oxígeno del aire. El Fe^{3+} pasa a Fe^{2+} por el pH ácido en el estómago, pero en el duodeno se vuelve a pH básico por lo que la absorción se dará únicamente en el principio del duodeno.

En la membrana del enterocito se encuentran los receptores del Fe^{3+} (aunque son muy pocos) y la ferrireductasa que es una proteína capaz de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Muy cerca de esta ferrireductasa se encuentra la proteína transportadora de metales divalentes acoplada a una bomba de protones, que es capaz de introducir el Fe^{2+} al interior del enterocito.

En la membrana existen también receptores al hierro hemo (el que entra en el anillo protoporfirínico de la hemoglobina), que captan la molécula de hemoglobina y la introducen en el enterocito. Dentro de éste, hay una oxigenasa que rompe el grupo hemo y deja libre el hierro. En el bazo los eritrocitos son destruidos por macrófagos y se reutiliza el hierro enviándolo al hígado.

1.4. Métodos de determinación de elementos traza y ultratrazas en fluidos biológicos

La determinación de elementos traza y ultratrazas en materiales biológicos es de gran importancia. Los elementos están presentes en este tipo de muestras en concentraciones variables: desde nivel de trazas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) hasta nivel de ultratrazas ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e incluso $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Además, la compleja composición de la matriz de la muestra (proteínas y altos contenidos salinos) en la que estos elementos se encuentran dificulta en gran medida la determinación de los mismos. Por todo ello, es preciso disponer de técnicas analíticas lo suficientemente sensibles y selectivas para llevar a cabo este tipo de determinaciones.

De entre las numerosas técnicas analíticas existentes, las técnicas espectroscópicas son las más adecuadas para llevar a cabo el análisis del contenido elemental en muestras biológicas¹².

La Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (ETAAS) es junto con la Espectrofotometría de Absorción Atómica de llama (FAAS), la técnica más ampliamente empleada en el ámbito clínico para el análisis elemental¹³. Entre las ventajas de la técnica cabe citar su relativo bajo coste¹⁴, simplicidad y alta sensibilidad. En efecto, la técnica presenta unos buenos límites de detección para un gran número

de elementos, del orden de $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en disolución o de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en sólido. Esta alta sensibilidad unido a los bajos volúmenes de muestra requeridos para el análisis (unos pocos μL) ha contribuido a su popularización en el análisis de ultratrazas en material biológico.

La aparición en 1980 de la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) ha supuesto una revolución dentro de la Química Analítica elemental debido a sus excelentes características analíticas. El intervalo dinámico lineal es amplio (entre 6-8 órdenes de magnitud). Los límites de detección para la mayoría de los elementos están en el intervalo de 0.01 a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ llegando a detectar unos pocos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para algunos elementos. Una característica única de esta técnica en comparación con otras es la posibilidad de medir distintos isótopos de un mismo elemento. Las aplicaciones de esta técnica al análisis de material biológico son numerosas, como se demuestra por las cuantiosas publicaciones^{15,16,17,18,19}.

El análisis elemental directo de muestras biológicas líquidas (eritrocitos, orina, suero) está limitado por el alto contenido de proteínas y sales que bloquean el canal inyector de la antorcha y los orificio de los conos. Generalmente, el tratamiento de muestras líquidas se reduce a una simple dilución^{20,21}, mientras que en el caso de tejidos se realiza un ataque microondas. Asimismo, con objeto de reducir las interferencias físicas se emplea un patrón interno.

1.5. Empleo de isótopos estables en muestras biológicas

1.5.1. Isótopos Estables

Una gran parte de los elementos químicos existentes están constituidos por una mezcla de varios isótopos, que difieren entre sí sólo en el número de neutrones del núcleo. El peso atómico que normalmente utilizamos para cada elemento es una media ponderada de las masas de todos los isótopos de un elemento teniendo en cuenta la abundancia natural que poseen.

Por tanto, desde un punto de vista analítico, un isótopo cuya abundancia haya sido modificada artificialmente (“enriquecido”) constituye un patrón “interno” ideal para la medida por espectrometría de masas del elemento considerado.

Los isótopos estables se utilizan actualmente en Química Analítica en numerosas aplicaciones, como por ejemplo el análisis por dilución isotópica, como marcadores en estudios metabólicos²², toxicológicos²³, medioambientales²⁴, etc.

1.5.2. Análisis por dilución isotópica

El análisis por dilución isotópica (“isotope dilution analysis”, IDA) es una técnica de análisis elemental basada en la medida de relaciones isotópicas en muestras donde su composición isotópica ha sido previamente alterada mediante la adición de una cantidad conocida de un elemento enriquecido isotópicamente (trazador o “spike”).

Mediante la medida del cambio provocado en una relación isotópica concreta del elemento de interés, es posible conocer la concentración de dicho elemento en la muestra. El elemento a analizar debe tener, al menos, dos isótopos estables que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante espectrometría de masas.

Después de un tiempo de equilibración del trazador añadido con el elemento natural presente en la muestra, se lleva a cabo la medida de las relaciones isotópicas alteradas.

El principio básico de la dilución isotópica en análisis elemental se ilustra en la Figura 4 para un elemento que contiene dos isótopos diferentes a y b. Como puede observarse el isótopo a es el más abundante en la muestra mientras que el trazador está claramente enriquecido en el isótopo b. De este modo, las abundancias isotópicas de la mezcla y, por tanto, las relaciones isotópicas, serán intermedias entre las de la muestra y el trazador, y dependerán tanto de la cantidad de trazador adicionado como de la cantidad original del elemento en la muestra.

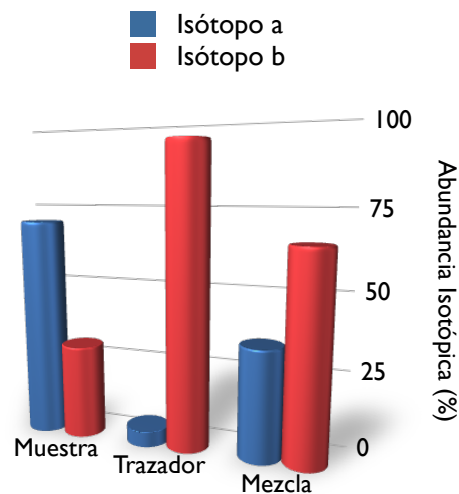


Figura 4. Ilustración del fundamento de la dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos (a y b)

La ecuación de la dilución isotópica, permite calcular la concentración original del elemento en dicha muestra a partir de la medida de la relación isotópica en la mezcla.

Si se denomina N_s al número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra y N_t al número de moles del mismo elemento en el trazador, resulta evidente que el número de moles del elemento en la mezcla N_m resultante vendrá dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad [1]$$

De la misma manera se pueden obtener balances de masa similares para los isótopos a y b:

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad [2]$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad [3]$$

Si se divide la Ecuación [2] entre la [3] se obtiene la relación isotópica de ambos isótopos (a/b) en la mezcla (R_m) la cual puede expresarse de la siguiente manera:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} = \frac{N_s \cdot A_s^a + N_t \cdot A_t^a}{N_s \cdot A_s^b + N_t \cdot A_t^b} \quad [4]$$

en donde $N_s^a = N_s \cdot A_s^a$; $N_t^a = N_t \cdot A_t^a$; $N_s^b = N_s \cdot A_s^b$; $N_t^b = N_t \cdot A_t^b$ si se tiene en cuenta las abundancias de los isótopos a y b en la muestra (A_s^a y A_s^b) y en el trazador (A_t^a y A_t^b) respectivamente

Despejando N_s en la Ecuación [4] se obtiene:

$$N_s = N_t \cdot \frac{R_m \cdot A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m \cdot A_s^b} \quad [5]$$

La Ecuación [5] es la forma más básica de la ecuación de la dilución isotópica, y en ella puede observarse que conociendo la composición isotópica del trazador y la muestra y el número de moles añadidos de trazador se puede calcular el número de moles del elemento en la muestra solamente con la medida de la relación isotópica R_m en la mezcla.

Esta ecuación se puede adaptar para expresar concentraciones en lugar de número de moles. Si se define $R_s = \frac{A_s^b}{A_s^a}$ como la relación isotópica (b/a) en la muestra

y $R_t = \frac{A_t^b}{A_t^a}$ como la relación isotópica (a/b) en el trazador se puede expresar la

Ecuación [5] como:

$$N_s = N_t \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad [6]$$

y utilizando las expresiones $N_s = \frac{C_s \cdot m_s}{M_s}$ y $N_t = \frac{C_t \cdot m_t}{M_t}$ donde:

- C_s y C_t son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador respectivamente.
- m_s y m_t son la masa tomada de muestra y la masa añadida de trazador respectivamente y
- M_s y M_t son los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador respectivamente,

se obtiene la ecuación final (Ecuación [7]) de la dilución isotópica en la que, con excepción de la relación isotópica R_m , todos los parámetros son conocidos y por tanto la concentración del elemento en la muestra C_s se determina con la simple medida de R_m mediante Espectrometría de masas. En el presente trabajo se ha empleado dicha expresión de la ecuación de la dilución isotópica:

$$C_s = C_t \cdot \frac{m_s}{m_t} \cdot \frac{M_s}{M_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad [7]$$

Como se puede observar en la Ecuación [7] y contrariamente a lo que ocurre con otras técnicas de cuantificación (p.ej. las adiciones estándar o la calibración externa) no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, la primera ventaja del análisis por dilución isotópica es que cualquier variación de este parámetro debida a inestabilidades instrumentales como la deriva de la señal o los efectos de matriz no tendrá ninguna influencia en el valor final de la concentración del elemento en la muestra (C_s).

Por otra parte, la incertidumbre en la medida de la concentración depende solamente de la incertidumbre de la medida de las relaciones isotópicas R_s , R_t y R_m ya

que los pesos atómicos de la muestra y del trazador (M_s y M_t) son conocidos y la masa tomada de muestra y trazador se puede determinar gravimétricamente (m_s y m_t). En la mayoría de los casos, excepto para ciertos elementos que muestran variaciones naturales en sus abundancias isotópicas, R_s es conocida mientras que el valor de R_t se puede determinar previamente o puede ser conocido de antemano si se usa un trazador certificado. Por tanto, el único parámetro que tiene que ser determinado experimentalmente es R_m y esta determinación se puede realizar con una elevada exactitud y precisión utilizando un espectrómetro de masas.

La tercera ventaja más relevante del análisis por dilución isotópica para análisis elemental total es que, una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de sustancia de la mezcla no va a tener ninguna influencia en el resultado final. Esto se debe al hecho de que cualquier alícuota de la muestra diluida isotópicamente contendrá la misma R_m y, por tanto, no habrá necesidad de conocer los factores de dilución o preconcentración realizados ni tener en cuenta separaciones no cuantitativas o procesos de evaporación. Cabe resaltar que aunque los métodos de preconcentración pueden resultar en fraccionamiento isotópico, estos efectos suelen estar por debajo del uno por mil y no son susceptibles de influir en el resultado final.

Cuando se aplican otros métodos analíticos u otras técnicas de calibración es necesario determinar de una manera muy precisa la cantidad total de analito que ha sido aislada para su detección, así como el rendimiento de cada paso analítico, lo cual no siempre es una tarea fácil. Por tanto, debido a todas estas ventajas el análisis por dilución isotópica está considerado internacionalmente como un método “de referencia” o “absoluto”. Además, cabe resaltar que como la medida de R_m proporciona directamente la concentración inicial del elemento en la muestra (Ecuación [7]), no es necesario recurrir a la calibración externa instrumental ni a métodos de adiciones estándar por lo que en IDA se consigue un ahorro considerable en el tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales.

Sin embargo, para que todas estas afirmaciones sean veraces se ha de cumplir algunos requisitos. En primer lugar, se tiene que tener en cuenta que cualquier pérdida de sustancia (ya sea de muestra o de trazador) antes de que se produzca el

equilibrio isotópico será una fuente de error considerable. Además, una vez que se haya alcanzado el equilibrio isotópico, el isótopo enriquecido añadido a la muestra deberá comportarse de una manera idéntica al elemento natural a lo largo de todo el proceso analítico. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos a y b realizada por el espectrómetro de masas debe estar libre de interferencias espectrales y los factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas (como la discriminación de masas o el tiempo muerto del detector) deben estar controlados.

Finalmente, también se han de controlar exhaustivamente los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos de R_m . Es importante hacer notar aquí que en el caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica medida R_m (Ecuación [7]) no proporcionará un valor exacto de la concentración inicial del elemento en la muestra (C_s).

2. OBJETIVO

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fin de máster ha sido la puesta a punto de una metodología para la determinación de hierro en muestras biológicas para su análisis mediante IDA-ICP-MS.

Este objetivo se ha abordado mediante las siguientes etapas secuenciales:

- a. Optimización de los parámetros instrumentales para la determinación de hierro por ICP-MS. Evaluación de las posibles interferencias espectrales, que afectan a las medidas de relaciones isotópicas de hierro.

- b. Selección del tratamiento de muestra más adecuado para las muestras en estudio (suero, eritrocitos, orina e hígado) para su posterior análisis mediante ICP-MS.

- c. Aplicación de la metodología desarrollada por IDA-ICP-MS a muestras de suero, eritrocitos, orina e hígado de ratas *wistar*.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación utilizada

3.1.1. Espectrómetro de masas elemental: ICP-(OCR)-MS

Para las medidas de los isótopos de hierro se ha utilizado un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, con detector tipo cuadrupolo y equipado con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORS, Sistema de Octapolo de Reacción), modelo 7500ce de Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.).

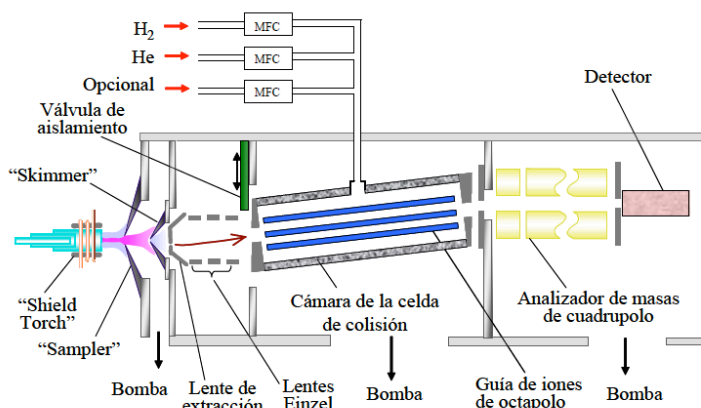


Figura 5. Esquema del equipo de ICP-ORS-MS Modelo Agilent 7500c (Agilent Technologies)

El principio de funcionamiento del ICP-MS es relativamente sencillo (Figura[5]). La muestra, formando un fino aerosol líquido, se introduce a través del canal central de la antorcha en el plasma de argón (que es el gas normalmente empleado), que se encuentra parcialmente ionizado (aproximadamente un 1%) y que posee una temperatura entre 6000 y 8000 K. Dicho aerosol se forma por aspiración de la muestra líquida, empleando una bomba peristáltica (controlada, en este caso concreto, por el programa informático del equipo) hacia el sistema de nebulización, constituido por un nebulizador (tipo Meinhard) y una cámara de nebulización de doble paso (tipo Scott, refrigerada por efecto Peltier a una temperatura de 2°C). La antorcha (tipo Fassel) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el flujo de Ar portador (o nebulizador), el intermedio para el Ar auxiliar y el exterior para el Ar plasmógeno. En el plasma la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada.

Los iones formados en el ICP son extraídos del canal central del plasma a una interfase que se encuentra a vacío (aproximadamente 1 torr) a través del cono de extracción o sampler (constituido por una base de cobre y una punta de níquel, con un orificio central de 1 mm de diámetro) produciéndose una expansión adiabática. A continuación el haz de iones es transmitido a través de un segundo cono metálico o skimmer (de níquel, con un orificio de 0.4 mm). Ambos conos constituyen la interfase de extracción por medio de la cual pasa el haz de iones (aproximadamente el 1 % de los iones formados en el plasma) hacia el sistema electrostático de enfoque que se encuentra sometido a alto vacío (10^{-3} - 10^{-4} torr) por la acción de una bomba turbomolecular.

Posteriormente el haz de iones es conducido al sistema de lentes electrostáticas (Figura[5]). En primer lugar están las lentes de extracción, cuya función principal es acelerar los iones muestreados. Luego, se produce el enfoque iónico con tres lentes Einzel que mediante campos electromagnéticos adecuados permiten obtener un haz colimado de iones. Por último, se encuentra un grupo de lentes Omega, que actúan eliminando los fotones.

Entre el sistema de lentes de extracción y enfoque iónico y el analizador de masas, se encuentra la celda de colisión (octapolo), la cual actúa como una guía de iones y opera en modo de radiofrecuencia. La cámara del octapolo puede ser presurizada con He, H₂ o mezclas de ambos, así como otro tipo de gases como Xe u O₂. Los gases se introducen en la celda bajo un controlador de flujo másico a través de una línea de acero para minimizar las posibles interferencias poliatómicas (es decir, los iones procedentes del plasma van a colisionar y/o reaccionar en la celda con las moléculas del gas rompiendo así los posibles iones interferentes).

3.1.2. Pequeños equipos utilizados

- Sistema de purificación de agua con módulo de pretratamiento para retener partículas y cloro, así como para evitar acumulación de precipitados calcáreos. (Tratamiento por ósmosis inversa. Módulo de electrodesionización para

reducir contaminantes orgánicos y minerales), *Elix 3* y *Milli-Q Advantage A10* (Millipore, Massachusetts, EE.UU.).

- La digestión de muestras se llevó a cabo en un digestor modelo *Ethos-1 de Milestone* (Microwave Laboratory Systems, Socisole (BG), Italia) con rotor de capacidad para 10 bombas (SK-10) de TFM (PTFE modificado químicamente) y controlador automático y continuo de temperatura mediante sonda dispuesta en la bomba de referencia.
- Para la homogeneización de tejidos se utilizó una *Ultra-Turrax T-25* (Ika Labortechnik, Staufen, Alemania).
- Las pesadas se realizaron en una balanza analítica de precisión *Precisa XB 220A* (Boadilla del Monte, Madrid).
- La centrifugación de las disoluciones se llevó a cabo a 4°C utilizando una centrífuga *Biofuge Stratos* modelo *Heraeus* (Hanau, Alemania).
- Para el control del pH en las muestras biológicas, se utilizó un pH-metro *micropH 2000 de Crison* (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España).
- Homogeneización de las muestras y disoluciones con un agitador mecánico *Vortex Velp* (Scientifica, España).

3.2. Material de laboratorio

- Micropipetas *Eppendorf Research Plus* (Eppendorf AG. 22331 Hamburg. Germany) de distinto rango de utilización dependiendo de la finalidad.
- Pipetas Pasteur de plástico.
- Tubos de poliestireno de 10 mL (Deltalab, S.L.U., Barcelona, España)
- Tubos eppendorf de microcentrífuga polipropileno (Labbox, Barcelona, España).
- Tubos de centrífuga 15 mL (Labbox, Barcelona, España).

3.3. Reactivos y disoluciones

- Los patrones de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe, Ca y Ni fueron obtenidos de la compañía Merck (Darmstadt, Alemania) y los de Li, Y e In de J. T. Baker (Philipsburg, NJ, EE.UU.). Estas disoluciones han sido siempre estabilizadas en medio ácido (HNO_3 al 2%).
- El ácido nítrico (65%) y el agua oxigenada ambos de calidad suprapur (30%) empleados en la mineralización de las muestras, así como el ácido clorhídrico (37%) utilizado en los ajustes del pH, fueron suministrados por Merck.
- Patrón enriquecido ^{54}Fe (98.93% de abundancia en el isótopo 54) de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EE.UU.) en forma de sólido elemental y disuelto en un volumen mínimo de HCl (30%) calidad suprapur, y posteriormente diluido con agua ultrapura. La concentración del hierro en esta disolución se determinó mediante dilución isotópica inversa, empleando el patrón natural de hierro.

3.4. Materiales de referencia

Con objeto de validar los métodos de análisis elementales desarrollados para la cuantificación total de hierro en muestras biológicas, mediante IDA (Isotope Dilution Analysis) se emplearon varios materiales de referencia, todos ellos almacenados a 4°C .

- *SeronormTM Trace Elements Serum* LOT 0903106 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- *SeronormTM Trace Elements Urine* LOT 0511545 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- *SeronormTM Trace Elements Whole Blood* LOT 1003192 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- *NIST SRM 1577a Bovine Liver* (National Institute for Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

3.5. Procedimientos

3.5.1. Preparación de orina y suero

Para las muestras de orina se pesó 1 g de la misma, mientras que fueron 0,5 g para las muestras de suero. Para la determinación por IDA, se les adicionó la cantidad apropiada de disolución estándar de ^{54}Fe -enriquecido. Seguidamente, las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta un peso final de unos 10 g totales.

3.5.2. Preparación de los materiales de referencia

Los materiales de referencia de suero, y orina fueron reconstituidos como se describe en sus certificados y directamente analizados tras la adición de una cantidad conocida de (^{54}Fe) la disolución enriquecida y seguidas de una dilución (1:10 en las muestras de orina y 1:20 en las muestras de suero) con agua ultrapura.

3.5.3. Lisado de eritrocitos

La fracción eritrocítica se diluyó 1:10 con H_2O milli-Q a 4°C y se ensayaron los siguientes procedimientos de lisis:

- *Protocolo A:* se centrifugó a 3000g durante 15 min a (4°C). Del sobrenadante, se tomaron 3 alícuotas que se mezclaron con la cantidad de “spike” adecuada, llevando a un peso final de 10g.
- *Protocolo B:* se congeló la muestra durante toda la noche, y tras su descongelación a temperatura ambiente, se procedió de la misma manera que en el protocolo A.
- *Protocolo C:* se homogeneizó la muestra mediante el empleo de un sistema Ultra-turrax y posteriormente se procedió de la misma manera que en el *protocolo A*.

El protocolo con el que se obtuvieron los mejores resultados de precisión y exactitud fue el B, y fue el que se utilizó en estudios posteriores, tanto para la validación del método mediante materiales de referencia certificados como para las muestras biológicas de concentración desconocida.

3.5.4. Homogeneización de las muestras de hígado

El hígado y los riñones fueron homogeneizados mediante el empleo de un sistema Ultra-turrax en 4 volúmenes (W/v) de una disolución TRIS (50 mM) a pH=7.

3.5.5. Mineralización de las muestras de hígado

Las muestras de hígado (tejido homogeneizado previamente) así como el material de referencia NIST SRM 1577a, fueron sometidas a digestión por horno de microondas. Para ello, una alícuota de unos 0,5 g de hígado, previamente descongelada y homogeneizada, se depositó en el interior de las bombas de digestión de PTFE, se les adicionó 1.5 mL de ácido nítrico (suprapur) y 1.5 mL de peróxido de hidrógeno (suprapur). Estos recipientes fueron cerrados inmediatamente y se procedió a aplicar las condiciones recogidas en la Tabla [1]. Tras el ataque, se diluyeron a 15 mL con agua ultrapura (dilución final 1:30).

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	3
2	160	10
3	185	3
4	185	15

Tabla 1. Programa de temperaturas utilizado en el ataque microondas Ethos-1 Milestone (Potencia 900W)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la exactitud y precisión de las medidas de relaciones isotópicas de hierro mediante ICP-MS

4.1.1. Condiciones de medida en el ICP-MS

Se optimizaron las siguientes condiciones operacionales del ICP-MS:

- Los parámetros instrumentales que rigen la formación de iones y su transporte (flujo de gas plasmógeno y portador; la potencia de RF y la posición de la antorcha).
- Los parámetros que rigen el enfoque y transmisión de los iones en el interior del analizador de masas (lentes iónicas).
- Los parámetros de medida en el equipo, como por ejemplo el número de puntos por pico, el tiempo de adquisición por punto y el número de réplicas a realizar.

Para llevar a cabo esta optimización se utilizó una disolución que contiene $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ${}^7\text{Li}$, ${}^{89}\text{Y}(89)$ y ${}^{205}\text{Tl}$ estabilizada en HNO_3 "sub-boiling" al 1% (v/v). Estos elementos se seleccionaron tratando de abarcar todo el intervalo de masas.

El elemento objeto de este estudio es el hierro, éste presenta cuatro isótopos estables de masas 54, 56, 57 y 58; con unas abundancias (naturales) de 5,845%; 91,754%; 2,119% y 0,282% respectivamente. Por tanto, las condiciones de operación óptimas se verificaron con una disolución de dicho elemento (de abundancia natural) de una concentración de $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Las condiciones operacionales utilizadas en el ICP-MS están recogidas en la siguiente tabla:

Parámetros del plasma

Potencia de radiofrecuencia	1500 W
Flujo del gas plasmógeno	15 L·min ⁻¹
Flujo del gas portador	1.12 L·min ⁻¹
Conos sampler y skimmer	Ni
Parámetros de las lentes iónicas	Optimizadas diariamente para la mejor sensibilidad con una disolución de 10 µg L ⁻¹ de Li, Co, Y y Tl

Parámetros de la celda de reacción/colisión

Flujo del gas <i>Helio</i>	4 mL·min ⁻¹
Potencial del octapolo (Oct bias)	-18 V
Potencial del cuadrupolo (QP bias)	-16 V

Parámetros de adquisición de datos

Isótopos monitorizados	42,43,44,54,56,57,58,60
Puntos por pico	3
Tiempo de adquisición por punto	3 s
Réplicas	5

Tabla 2. Condiciones de operación del ICP-MS y parámetros de adquisición para la determinación del hierro

4.1.2. Interferencias espectrales

La determinación de hierro por ICP-MS, al igual que ocurre con muchos otros elementos, está dificultada por las interferencias espectrales que afectan a todos sus isótopos estables. Estas interferencias espectrales están originadas por iones atómicos de la misma relación (interferencias isobáricas) o iones moleculares (interferencias poliatómicas, formadas a partir del Argon, disolvente y/o matriz de la muestra, así como por la entrada de gases atmosféricos en la región de la interfase del ICP-MS) que

Resultados y Discusión

tienen la misma relación masa/carga que el analito de interés, lo que ocasiona que a la señal del analito se sume la señal del ion interferente.

Las principales interferencias espectrales que pueden presentarse en la determinación de hierro por ICP-MS se recogen en la siguiente tabla:

Isótopo Fe	54	56	57	58
Abundancia %	5,845	91,754	2,119	0,282
Interferencias	^{54}Cr	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$	^{58}Ni
	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$ $^{40}\text{Ca}^{17}\text{O}$	$^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}$ $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}$

Tabla 3. Abundancias naturales para todos los isótopos del hierro y sus interferencias

La magnitud de las interferencias dependerá de la concentración de analito y/o interferente presentes en la muestra objeto de análisis. Teniendo en cuenta el contenido en distintos elementos químicos (p.ej. Fe, Cr, Ni Na) de los fluidos biológicos objeto de estudio (ver Tabla 4)²⁵ podemos tener una primera aproximación del tipo de interferencias espectrales esperadas que pueden presentarse en la medida de los distintos isótopos del hierro en las muestras de interés.

Elemento	Sangre	Orina	Hígado
	Suero ^(s) ; Plasma ^(p)		
Fe	1.1-1.3 mg ·L ⁻¹ (p)	0.17 mg ·L ⁻¹	46-307 µg ·g ⁻¹
Ca	91-106 mg ·L ⁻¹ (s)	120 mg ·L ⁻¹	-----
Cr	0.04-0.43 µg ·L ⁻¹ (s,p)	0.04-50 µg ·L ⁻¹	8-160 ng·g ⁻¹
Na	2500-3560 mL ·L ⁻¹ (s)	2200 mg ·L ⁻¹	-----
Ni	0.05-1.3 µg ·L ⁻¹ (s,p)	0.06-8 µg ·L ⁻¹	9-380 ng·g ⁻¹

Tabla 4. Concentraciones de los distintos elementos de interés en diferentes fluidos humanos

Teniendo en cuenta la concentración de analito en las distintas muestras y teniendo en cuenta la dilución 1:30 para hígado; 1:20 para suero y fracción eritrocítica y 1:10 para orina, se estudiaron las posibles interferencias espectrales causadas por los elementos de la matriz.

4.1.2.1. Interferencias isobáricas

La interferencia que causa la presencia de níquel es la más problemática porque, aunque su presencia en orina y sangre es baja²⁵, la interfase del instrumento ICP-MS está compuesta de aleaciones de níquel. Este último hecho hace que el nivel del fondo de níquel sea elevado en nuestro ICP-MS por lo que la precisión y reproducibilidad en las medidas se verá deteriorada^{26,27,28}.

La mejor forma de evitar las interferencias isobáricas producidas por el Ni a la masa 58 del Fe, es el empleo de correcciones matemáticas. Para ello, a partir de una disolución estándar de Ni con abundancias naturales y concentración elevada (aproximadamente 50 ng·g⁻¹) se miden las intensidades a las masas 58 y 60 del Ni (⁵⁸I_{Ni}, ⁶⁰I_{Ni}) obteniéndose un factor de corrección f_{Ni} definido como la relación de intensidades ⁵⁸I_{Ni}/⁶⁰I_{Ni} (normalmente dicha relación toma un valor entre 2,30 y 2,40). De este modo, en la muestra biológica de interés además de la medida de la intensidad a la masa 58 (⁵⁸I), se mide a la masa 60 correspondiente al del isótopo ⁶⁰Ni. Para calcular en la muestra la intensidad del ⁵⁸Fe corregida (⁵⁸I_{Fe}) se emplea la siguiente ecuación:

$${}^{58}I_{Fe} = {}^{58}I - f_{Ni} \cdot ({}^{60}I_{Ni}) \quad [8]$$

donde ⁵⁸I y ⁶⁰I_{Ni} son las intensidad medidas a la masa 58 y a la 60 de la muestra.

Por el contrario, la concentración de Cr presente en la sangre, orina y heces está por debajo de las μg·L⁻¹ en la mayor parte de los casos, dicho elemento no causa interferencia en la determinación del Fe y no se tuvo en cuenta ésta interferencia a la hora de corregir las señales medidas.

4.1.2.2. Interferencias poliatómicas

En lo que se refiere a las interferencias poliatómicas que afectan la determinación de Fe, las más problemáticas son las derivadas de argón, como ArO^+ , ArOH^+ y ArN^+ (ver Tabla 3) son inherentes al gas plasmógeno y la entrada de gases atmosféricos en la región de la interfase del equipo, así como el ácido nítrico utilizado como estabilizador de las disoluciones. Éstas pueden ser minimizadas mediante el uso de un ICP-MS con celda de colisión/reacción y el empleo de H_2 o He como gases de colisión/reacción^{29,30,31}.

Estudio del gas de colisión

Se estudió la influencia del tipo de gas de celda de colisión y el flujo de éste a la hora de minimizar las interferencias ArN^+ , ArO^+ , ArOH^+ , CaO^+ , CaOH^+ , NaCl^+ producidas en la medida de los distintos isótopos de hierro en el ICP-MS.

En las Figuras 5 y 6 se representan las señales de los distintos isótopos del elemento de interés (Fe) frente al cambio del flujo de gas portador en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, para una disolución “blanco” de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hierro y una disolución de la misma concentración de analito a la que se le ha añadido $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de calcio. También se ha representado el BEC “*Background equivalent concentration*” que es la concentración de analito que produce la misma señal que la que produce el blanco, y que se define como:

$$BEC = \frac{\text{Señal}_{\text{blanco}} (\text{CPS})}{\text{Señal}_{\text{analito}} (\text{CPS})} \cdot \text{Concentración}_{\text{analito}} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) \quad [9]$$

• **Hidrógeno (H₂)**

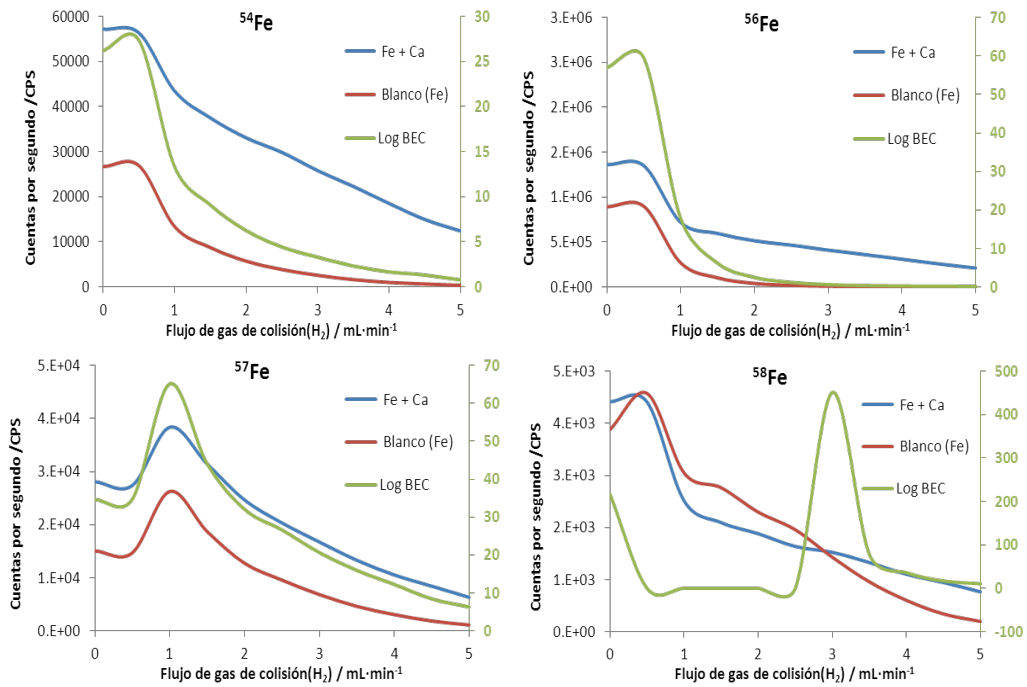


Figura 6. Estudio de la interacción entre el flujo del gas portador (H₂) y la señal de los isótopos 54, 56, 57, 58 del hierro

• **Helio (He)**

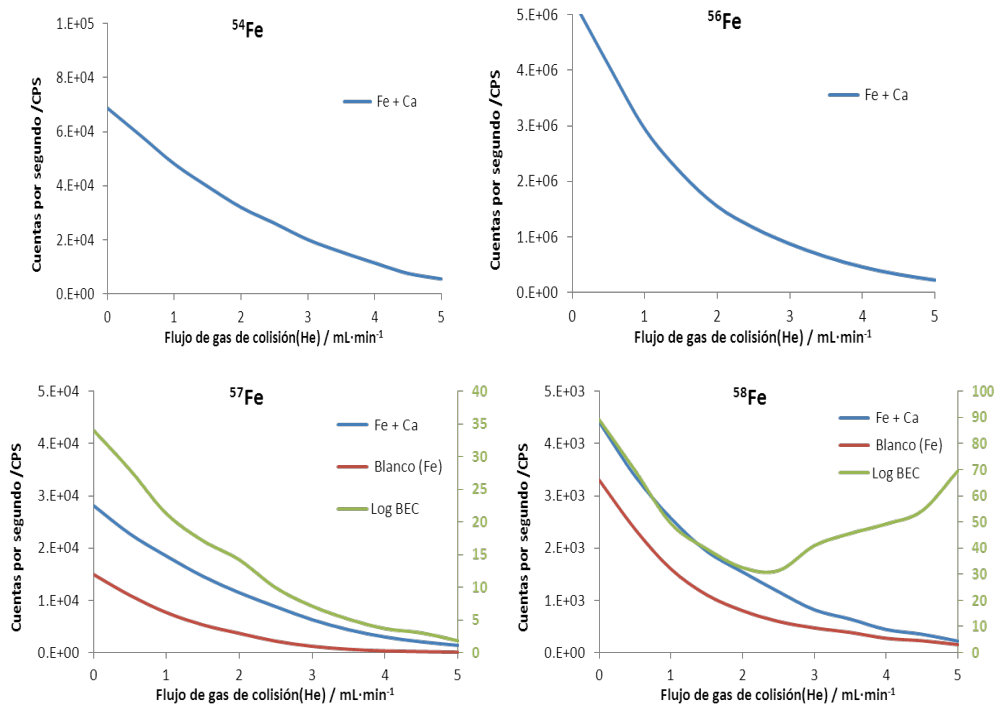


Figura 7. Estudio de la interacción entre el flujo del gas portador (He) y la señal de los isótopos 54, 56, 57, 58 del hierro

En las Figuras 6 y 7 se observa que inicialmente, sin gas en la celda de colisión, tanto el blanco como la disolución con el interferente, presentan una señal elevada, debido a las interferencias espectrales. Y al aumentar el flujo de gas de la celda de colisión (ya sea H₂ o He) disminuye la señal obtenida con interferente y para el analito.

Se observó que el gas que mejores resultados producía en la determinación de hierro por ICP-MS fue el He puesto que es capaz de reducir y/o eliminar dichas interferencias. El flujo de gas óptimo observado fue de 4 mL·min⁻¹. Esto concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio para la determinación de hierro mediante ICP-MS³².

Estudio de interferencias de calcio y sodio

Se estudiaron las interferencias producidas por el sodio y el calcio, para distintas concentraciones de éstos elementos en las muestras, los resultados están recogidos en las Figuras 8 y 9.

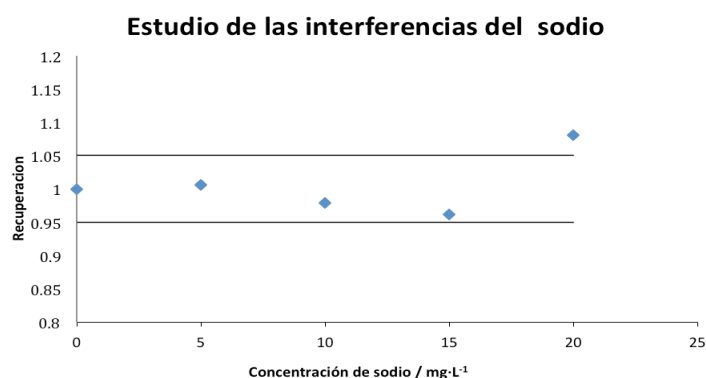


Figura 8. Estudio de interferencias en la señal de Fe para distintas concentraciones de interferente (Na)

Los resultados obtenidos muestran para el caso de la interferencia del Na, una relación interferente/analito lo suficientemente pequeña como para considerar que su presencia no provoca un efecto severo en las medidas realizadas para los isótopos de interés.

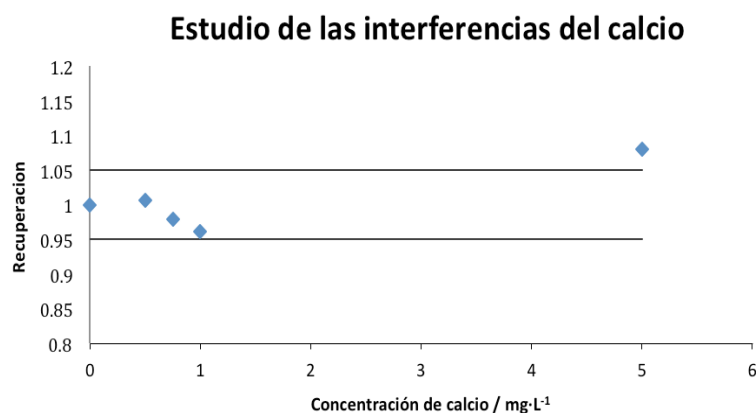


Figura 9. Estudio de interferencias en la señal de Fe para distintas concentraciones de interferente (Ca)

En el caso del calcio, se observó que no podían ser eliminadas mediante el uso de He (o H₂) excepto para una relación interferente/analito de (100:1), donde se produce una interferencia lo suficientemente elevada como para tenerla en cuenta. Dado que en los fluidos corporales existen niveles elevados de Ca es necesario utilizar correcciones matemáticas para poder eliminar dichas interferencias.

Para ello, es necesaria la medida de las intensidades de calcio ⁴²Ca, ⁴³Ca, y ⁴⁴Ca (^{xx}I_{Ca}) en una disolución estándar de calcio natural y concentración entre 5 y 10 mg·L⁻¹ y calcular los factores (f_{Ca}) correspondientes para corregir las interferencia que causa dicho elemento en las medidas de los isotopos del Fe. Las ecuaciones matemáticas necesarias para calcular las intensidades corregidas del Fe (^{xx}I_{Fe}) en la muestra son las siguientes:

- Corrección para el ⁵⁶Fe: la ecuación matemática que corrige la interferencia generada por el ⁴⁰Ca¹⁶O, viene dada por

$$^{56}\text{I}_{\text{Fe}} = ^{56}\text{I} - f_{\text{Ca}(\text{I})} \cdot (^{40}\text{I}_{\text{Ca}}) \quad [10]$$

donde $f_{Ca(I)}$ es la relación de intensidades $^{56}I_{Ca}/^{40}I_{Ca}$ en las disoluciones estándar de calcio y ^{56}I y $^{40}I_{Ca}$ son las intensidades medidas a las masas 56 y 40 en la muestra. Ante la imposibilidad de medir la señal $^{40}I_{Ca}$ (debido a la interferencia $^{40}Ar^+$), esta se calcula a partir de las relaciones isotópicas $^{40}I_{Ca}/^{42}I_{Ca}$, $^{40}I_{Ca}/^{43}I_{Ca}$ y $^{40}I_{Ca}/^{44}I_{Ca}$ y la relación entre sus abundancias naturales conocidas (A_{Ca})³³ según:

$$^{40}I_{Ca} = ^{42}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{42}A_{Ca}) \quad [11]$$

$$^{40}I_{Ca} = ^{43}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{43}A_{Ca}) \quad [12]$$

$$^{40}I_{Ca} = ^{44}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{44}A_{Ca}) \quad [13]$$

El valor de la intensidad de $^{40}I_{Ca}$ se promedia para todos los valores obtenidos mediante las ecuaciones [11], [12] y [13] en todas las disoluciones estándar de calcio medidas. El valor del $f_{Ca(I)}$ calculado oscila entre 0,0001 y 0,0003).

- Corrección para el ^{57}Fe : De manera similar que para el ^{56}Fe , la interferencia producida por $^{40}Ca^{17}O$ se corrige mediante la siguiente ecuación:

$$^{57}I_{Fe} = ^{57}I - f_{Ca(II)} \cdot (^{40}I_{Ca}) \quad [14]$$

donde $f_{Ca(II)}$ es la relación de intensidades $^{57}I_{Ca}/^{40}I_{Ca}$ en las disoluciones estándar de calcio promediadas, ^{57}I y $^{40}I_{Ca}$ son las intensidades medidas a las masas 57 y 40 en la muestra. La intensidad debida a $^{40}I_{Ca}$ tanto en las disoluciones estándar de calcio, como en las muestras, se obtienen según se aplicando las ecuaciones descritas anteriormente [11], [12] y [13].

- Corrección para el ^{58}Fe : la ecuación que corrige la interferencia $^{42}Ca^{16}O$ a la masa 58 del Fe es la siguiente:

$$^{58}I_{Fe} = ^{58}I - f_{Ca(III)} \cdot (^{42}I_{Ca}) \quad [15]$$

donde $f_{Ca(III)}$ es la relación de intensidades $^{58}I_{Ca}/^{42}I_{Ca}$ en las disoluciones estándar de calcio e ^{58}I y $^{42}I_{Ca}$ corresponden con el valor de la intensidad a la masa 58 y a la masa 42 de calcio ($^{42}I_{Ca}$) medidas en la muestra.

4.1.3. Tiempo muerto del detector

El tiempo muerto puede definirse como el tiempo que necesita el detector del ICP-MS para contabilizar la llegada de dos iones como dos eventos diferentes. Esta limitación es inherente a todo sistema de detección que incluya una electrónica de conteo, por lo tanto sólo ocurre en detectores como el multiplicador secundario de electrones (SEM) cuando éstos trabajan en modo digital. En este tiempo (en torno a unos pocos nanosegundos), el detector no es capaz de registrar nuevos iones que eventualmente alcanzan al detector. Cuando la concentración del elemento medido es elevada (típicamente $> 10^6$ cuentas·s⁻¹) llegarán al detector muchos iones en un intervalo de tiempo menor que el tiempo muerto, registrándose en el sistema de conteo de pulsos menos iones de los que realmente han llegado. Esto provoca pérdidas de linealidad en el detector a concentraciones elevadas de analito, que se conocen como pérdidas por “tiempo muerto del detector”.

Dado que la pérdida de cuentas es una función del número de iones que llegan al detector por unidad de tiempo, cuando se mide una relación isotópica distinta de la unidad, la pérdida de cuentas para los dos isótopos será de distinta magnitud (mayor cuanto mayor sea la diferencia entre sus abundancias isotópicas) y, por tanto, la relación isotópica medida será diferente de la real. En consecuencia este parámetro debe ser evaluado para corregir las intensidades y por consiguiente las relaciones isotópicas.

La ecuación que hemos empleado para corregir las intensidades medidas es la siguiente^{34,35}:

$$I_{\text{corregida}} \text{ (CPS)} = \frac{I_{\text{medida}} \text{ (CPS)}}{1 - (I_{\text{medida}} \text{ (CPS)} \cdot T \text{ (s)})} \quad [16]$$

Donde I_{medida} son las cuentas por segundo medidas experimentalmente e $I_{\text{corregida}}$ son las cuentas por segundo que mediríamos si no existiera error debido al tiempo muerto T .

El tiempo muerto se puede calcular de diversas formas³⁴. En nuestro caso fue determinado de acuerdo al método propuesto por Vanheaecke y col³⁶ midiendo la relación isotópica $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ a diferentes concentraciones. Para ello se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de Fe y se midieron las señales correspondientes a los isótopos de Fe (54, 56, 57 y 58), empleando un tiempo muerto de cero segundos en el software del instrumento y utilizando los parámetros instrumentales que se presentan en la Tabla 1. Para evaluar el tiempo muerto del detector del equipo se representó la relación $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ normalizada (relación isotópica corregida por el tiempo muerto dividida por la relación isotópica teórica) para diferentes tiempos muertos asignados entre 0 y 100 ns (de 10 en 10 ns) a las diferentes concentraciones de Fe estudiadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Figura 10.

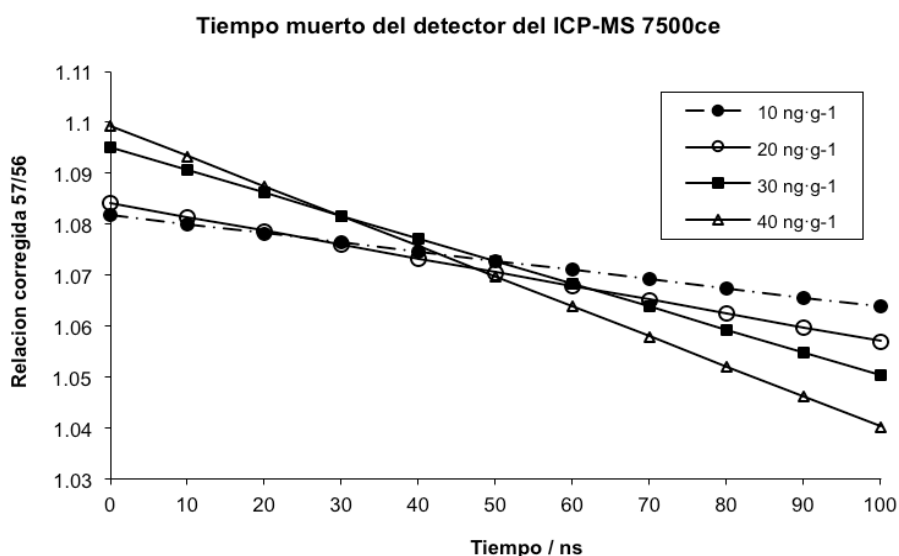


Figura 10. Tiempo muerto del detector para el ICP-MS Agilent 7500c

Como se puede observar en la Figura 10, para cada concentración se obtiene una recta y todas ellas se cruzan para un valor dado del tiempo muerto aproximado de (49 ns). El valor obtenido es el tiempo muerto del detector ya que corrigiendo las

intensidades medidas con este valor (Ecuación [16]) la relación isotópica es independiente de la concentración de hierro. Este resultado se obtuvo con anterioridad en estudios con otros elementos químicos en nuestro grupo de investigación^{32,35}, poniendo de manifiesto que su valor es independiente de la relación m/z medida. El valor obtenido se introdujo en el software del equipo para llevar a cabo la corrección de intensidades automáticamente.

4.1.4. Discriminación de masas

La discriminación de masas en ICP-MS es otro efecto que provoca desviaciones en la exactitud de las relaciones isotópicas medidas. Se origina tanto en el sistema de lentes iónicas (efectos “espacio-carga”) como en el vacío de la interfase de extracción (efecto “orificio”). El efecto “espacio-carga” consiste en la repulsión mutua que sufren los iones del haz al abandonar el cono separador (“skimmer”). Por tanto, el número de iones que son transmitidos por la óptica iónica disminuye debido a que los iones más ligeros son desviados en mayor grado mientras que los más pesados permanecen en el centro del haz iónico. Asimismo, en la región situada en la interfase de extracción, entre el cono de muestreo y el cono separador, se produce un chorro supersónico de iones, átomos y moléculas que se expande en función de su energía cinética. Los iones más ligeros, con menor energía cinética, se expanden en mayor proporción que los más pesados por lo que serán absorbidos preferentemente por el sistema de vacío. El denominado efecto “orificio” también produce enriquecimiento en los iones más pesados.

El factor de discriminación de masas fue calculado empleando una disolución de hierro de 50 ng·g⁻¹ de composición natural, bajo las mismas condiciones que las muestras sobre la cual se quieren medir las relaciones isotópicas. El factor de discriminación de masas se calculó utilizando un modelo exponencial previamente utilizado en nuestro grupo de investigación:

Para ello, se representa el logaritmo neperiano del cociente de las relaciones isotópicas corregida y teórica ($\ln R_{\text{corregida}}/R_{\text{teórica}}$) frente a la diferencia de masa de los isótopos medidos (2 para la relación $^{54}/_{56}$, 0 para la relación $^{56}/_{56}$, -1 para la $^{57}/_{56}$ y

-2 para la relación $^{58}/_{56}$). La pendiente de la recta obtenida es el factor de discriminación de masas, K. Así, todas las relaciones obtenidas experimentalmente se corrigen utilizando este factor de acuerdo a la ecuación³⁷:

$$R_{corr} = \frac{R_{exp}}{e^{K \cdot \Delta M}} \quad [17]$$

donde $R_{corregida}$ es la relación isotópica corregida con el factor de discriminación de masas K; $R_{experimental}$ es la relación isotópica medida; K es el factor de discriminación de masas calculado con la disolución de hierro natural de 50 ng·g⁻¹; y ΔM es la diferencia de masa entre los isótopos considerados. De esta forma, las abundancias isotópicas, corregidas en la muestra, son calculadas de nuevo empleando esta ecuación:

$$A_b = \frac{R_i}{\sum_{i=1}^n R_i} \quad [18]$$

El factor de discriminación de masas fue relativamente constante para los diferentes días de trabajo. Obteniéndose normalmente valores comprendidos entre -0.060 y -0.085.

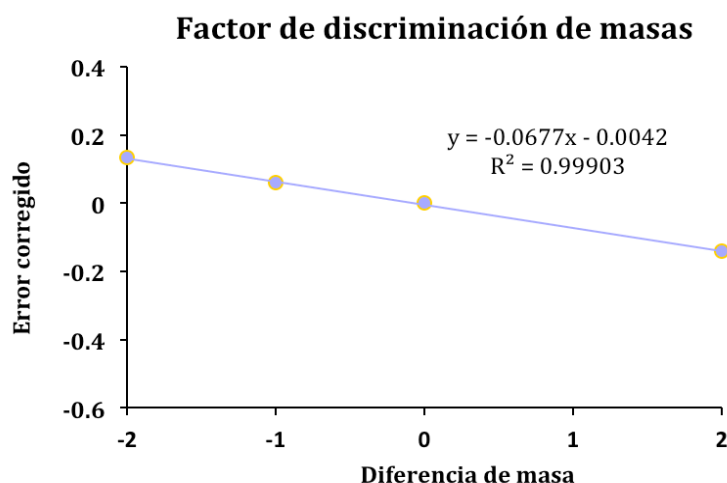


Figura 11. Factor de discriminación de masas para una disolución de hierro de abundancia natural (50 ng·mL⁻¹) **Factor K: -0.0677**

4.1.5. Precisión en la medida de relaciones isotópicas del hierro

Uno de los parámetros que pueden tener un influencia significativa en la precisión final de una determinación por dilución isotópica, es la cantidad de trazador (disolución enriquecida isotópicamente) añadida a la muestra. Esta cantidad puede ser optimizada calculando el rango óptimo de la relación muestra/trazador en el que se minimicen los errores aleatorios.

Aplicando la teoría de propagación de errores aleatorios a la ecuación de la dilución isotópica³⁸ se puede demostrar que la incertidumbre asociada al cálculo de la concentración dependerá de la incertidumbre en la medida de relaciones isotópicas de la mezcla (muestra con el isótopo enriquecido), multiplicado por el factor de magnificación del error (f(R)):

$$f(R) = \left[\frac{R_m(1 - R_{sp} \cdot R_s)}{(R_m - R_{sp}) \cdot (R_m \cdot R_s)} \right]^2 \cdot \left[\frac{s(R_m)}{R_m} \right]^2 \quad [19]$$

En la ecuación anterior, f(R) depende de R_m, R_{sp} y R_s (relación de isótopos en la mezcla, el spike y la muestra "sample" respectivamente). Como R_s y R_{sp} son conocidos, los valores de f(R) se pueden representar frente a R_m para obtener el intervalo de R_m en que la magnificación del error sea mínima. Una vez conocido este intervalo, la cantidad de trazador a añadir a la muestra puede ser fácilmente optimizada. La Figura 11 muestra la variación del factor de magnificación del error f(R) frente a la relación isotópica ⁵⁶Fe/⁵⁴Fe, calculado mediante el uso de la Ecuación [19].

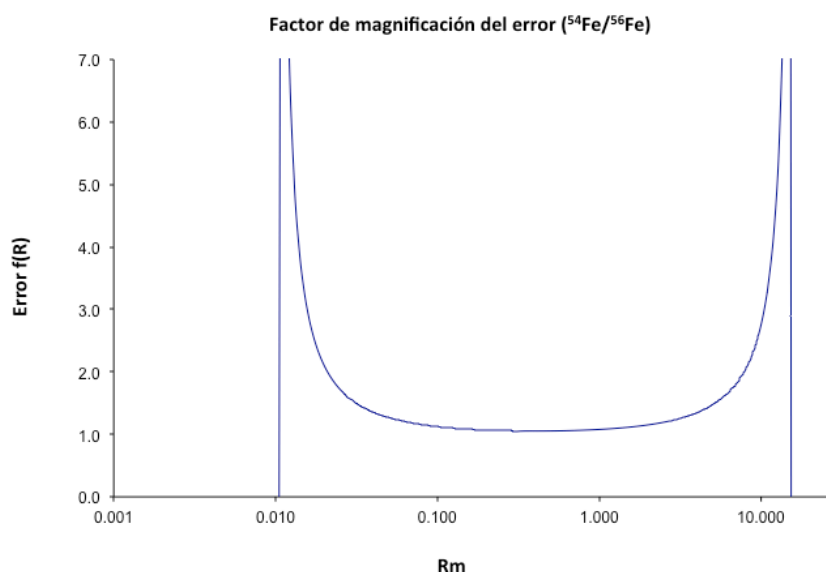


Figura 12. Factor de magnificación del error para la relación de isótopos $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$

Como se puede observar la relación isotópica en la mezcla R_m presenta un intervalo óptimo entre 0.19 y 3 (aproximadamente). Siempre que R_m se encuentre dentro de estos intervalos, la incertidumbre en el cálculo de la concentración dependerá sólo de la incertidumbre en la medida de la relación isotópica, ya que el factor de magnificación del error $f(R)$ en estos intervalos es muy próximo a la unidad (el valor óptimo es una relación $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ de 0.9). Por tanto, todas las mezclas de muestra con isótopo enriquecido se prepararon tratando de que la relación final medida se encontrase dentro de estos valores. En caso contrario, la medida no se consideraba como válida y se preparaba de nuevo la mezcla con una proporción de muestra/isótopo enriquecido distinta, lo más próxima a la relación óptima.

4.2. Caracterización de la disolución enriquecida isotópicamente en ^{54}Fe

La composición isotópica y la concentración de la disolución enriquecida isotópicamente en ^{54}Fe se determinaron en el Octapolo-ICP-MS. Para ello, en primer lugar se midieron las relaciones isotópicas del hierro en una disolución patrón de Fe

natural de $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, con objeto de determinar el factor de discriminación de masas a aplicar a las relaciones isotópicas medidas posteriormente.

A continuación se midieron las mismas relaciones isotópicas en cada una de las disoluciones de trazador, de concentración $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. A partir de estos datos se calculó la composición isotópica del trazador. La abundancia de cada isótopo se calculó utilizando la ecuación:

$$A_b = \frac{R_i}{\sum_{i=1}^n R_i} \quad [18]$$

Donde A_i es la abundancia del isótopo i ; R_i es la relación isotópica del isótopo i frente al isótopo de referencia una vez corregido el factor de discriminación de masa y $\sum_i R_i$ es la suma de todas las relaciones isotópicas existentes entre los distintos isótopos del elemento y el isótopo de referencia (^{54}Fe en el trazador enriquecido en el isótopo 54).

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 5:

	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{58}Fe
Disolución $^{54}\text{FeCl}_3$	98.9326	1.0345	0.0296	0.0033

Tabla 5. Composición isotópica del patrón enriquecido de hierro utilizado en las medidas de IDA en el ICP-MS

La concentración de la disolución madre se obtuvo mediante dilución isotópica inversa, empleando el patrón natural de hierro como disolución conocida y la disolución del trazador como desconocida.

4.3. Validación de la metodología

La precisión y exactitud de las relaciones isotópicas medidas en las muestras analizadas fueron validadas mediante el análisis de dos materiales de referencia, a los que se adicionó una disolución enriquecida isotópicamente en ^{54}Fe .

Los materiales de referencia utilizados se reconstituyeron según las especificaciones del fabricante y se trataron según los procedimientos descritos en el Apartado [3.2.2].

Material de referencia	Hierro natural	
	Certificado	Encontrado
Seronorm™ Trace Elements Serum LOT 0903106	1.23 -1.55 mg·L ⁻¹	1.36 ± 0.04 mg·L ⁻¹
Seronorm™ Trace Elements Urine LOT 0511545	12.3 ± 1 µg·L ⁻¹	12.34 ± 0.02 µg·L ⁻¹
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood LOT 1003192	333 ± 10 mg·L ⁻¹	343 ± 3 mg·L ⁻¹
NIST SRM 1577a Bovine Liver	194 ± 20 mg·g ⁻¹	183 ± 10 mg·g ⁻¹

Tabla 6. Resultados obtenidos para la validación de materiales de referencia certificados

Se observa que la cantidad de hierro natural y hierro enriquecido encontrados está en concordancia con los valores de hierro certificado y añadido respectivamente.

4.4. Determinación de hierro en muestras reales

Se aplicó la metodología puesta a punto para los distintos fluidos biológicos, a muestras reales de una rata wistar de 15 días de edad (con alimentación materna). Los resultados obtenidos se compararon con los expuestos en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio³² para los mismos fluidos y el mismo tipo de ratas. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

Muestra	Valores obtenidos (µg·g ⁻¹)
Eritrocitos	640 ± 5
Suero	10.71 ± 0.01
Hígado	279 ± 8

5. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

5.1. Conclusiones

- a. Se han investigado las posibilidades que ofrece el empleo de isotopos estables en combinación con la dilución isotópica y detección por ICP-MS para determinar el contenido de hierro en muestras biológicas.
- b. Se han eliminado las interferencias espectrales que se presentan en la medida de las intensidades de los isótopos de hierro. Para la eliminación de dichas interferencias ha utilizado como gas de celda el He y/o ecuaciones matemáticas. Asimismo se determinó el tiempo muerto y el factor de discriminación de masas que también afectan a la exactitud de las medidas de relaciones isotópicas.
- c. La validación de la metodología ha sido realizada mediante el análisis de materiales de referencia (suero, eritrocitos, orina e hígado de vaca) certificados en hierro natural, sobre los que se adicionó una cantidad conocida de ^{54}Fe para la cuantificación.
- d. La metodología analítica IDA-ICP-MS ha sido aplicada a la determinación de hierro en muestras de suero, eritrocitos, orina e hígado de ratas lactantes.

5.2. Sugerencias para trabajos futuros

- a. Aplicación de la metodología IDA en combinación con la detección por ICP-MS para el estudio de la absorción y/o biodisponibilidad de suplementos nutricionales de elementos esenciales. Dado que el uso de isótopos estables no presenta ningún riesgo para la salud en animales ni en humanos, sería posible aplicar la metodología desarrollada en estudios de absorción y biodisponibilidad de distintas formas fisicoquímicas utilizadas como suplementos nutricionales de los elementos esenciales

Conclusiones y Trabajos futuros

- b. Aplicación de la metodología IDA-HPLC-ICP-MS para la especiación cuantitativa de hierro en tejidos biológicos. Sería interesante continuar con los estudios de identificación, cuantificación y caracterización de las especies conteniendo Fe en los diversos tejidos de interés, con objeto de conseguir un conocimiento más preciso del destino, metabolismo y/o papel biológico de dichos elementos en los tejidos.

- c. Evaluar la posibilidad de utilizar nuevas formas fisicoquímicas de Fe como suplementos nutricionales en las leches fórmula. Resultaría muy útil el uso de la metodología empleada en este proyecto para evaluar la posibilidad de utilizar como suplementos nutricionales de hierro otras formas fisicoquímicas alternativas a las que actualmente están permitidas. Además, debido a que el hierro presenta múltiples isótopos, es posible estudiar simultáneamente la absorción y biodisponibilidad de este elemento en formas fisicoquímicas diferentes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ A. Mas, J. M. Azcue, *"Metales en sistemas biológicos"* (1993) Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona (España). ISBN:84-477-0175-1.
- ² W. Mertz, E. J. Underwood, *"Trace elements in human and animal nutrition"* (1986) Academic Press Inc. Nueva York (EEUU). ISBN: 0-1249-1252-4.
- ³ T. H. Bothwell, R.W. Charlton, J.D. Cook and C. A. Finc, *"Iron metabolism in man"* (1979) Blackwell Scientific Publications. Londres (Reino Unido). ISBN: 0-6320-0223-9.
- ⁴ J. H. Brock, J. W. Halliday, M. J. Pippard and L. W. Powell, *"Iron metabolism in health and disease"* (1994) W.B. Saunders Company Ltd. Londres (Reino Unido). ISBN: 0-7020-1732-9.
- ⁵ R. D. Baynes, *"Refining the assessment of body iron status"* (1996) Am. J. Clin. Nutr. 64:793-4.
- ⁶ M. F. Barrios, H. G. Gómez and N. F. Delgado, *"Metabolismo del hierro"* (2000) Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. 16(3):149-160.
- ⁷ D. A. Phipps, *"Metals and Metabolism"* (1976) Oxford University Press, Londres (Reino Unido). ISBN 0-1985-5413-3.
- ⁸ B. de Benoist, E. McLean, I. Egli, M. Cogswell, *"Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005"* (2008) WHO Global Database on Anaemia. Ginebra (Suiza). ISBN: 978-92-4-159665-7.
- ⁹ <http://www.who.int/en>
- ¹⁰ J. D. Cook, W. E. Barry, C. Hershko, G. Fillet and C.A. Finch, *"Iron kinetics with emphasis on iron overload"* (1973) Am. J. Pathol. 72(2):337-343.
- ¹¹ C. W. Siah, J. Ombiga, L. A. Adams, D. Trinder and J. K. Olynyk, *"Normal iron metabolism and the pathology of iron overload disorders"* (2006) Clin. Biochem. Rev. 27:5-16.
- ¹² G. Komaromy-Hiller, *"Flame, flameless, and plasma spectroscopy"* (1999) Anal. Chem. 71(12):338R-342R.
- ¹³ J. Arnaud, J. P. Weber, C. W. Weykamp, P. J. Parsons, J. Angerer, E. Mairiaux, O. Mazarrasa, S. Valkonen, A. Menditto, M. Patriarca, and A. Taylor, *"Quality specifications for the determination of copper, zinc, and selenium in human serum or plasma: Evaluation of an approach based on biological and analytical variation"* (1996) Clin. Chem. 54(11):1892-1899.
- ¹⁴ Erickson B.E., *"Graphite furnace AAS"* (2000) Anal. Chem. 72(15)543A-546A.
- ¹⁵ S. Zimmermann, C. M. Menzel, Z. Berner, J. D. Eckhardt, D. Stüben, F. Alt, J. Messerschmidt, Horst Taraschewski, B. Sures, *"Trace analysis of platinum in biological samples: a comparison between sector field ICP-MS and adsorptive cathodic stripping voltammetry following different digestion procedures"* (2001) Anal. Chim. Acta 439:203-209.
- ¹⁶ J. S. Becker, H. Sela, J. Dobrowolska, M. Zoriy, J. S. Becker, *"Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles"* (2008) Int. J. Mass Spectrom. 270:1-7.
- ¹⁷ M. Krachler and K. J. Irgolic, *"The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whole blood, plasma and serum"* (1999) J. Trace Elements Med. Biol. 13:157-169.

- ¹⁸ K. Kawamoto, J. Takada, Y. Tanaka, M. Akaboshi, "Determination of rare earth and other elements in standard biological samples by ICP-MS and activation analysis" (1999) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 242:527-530.
- ¹⁹ R. R. de la Flor St. Remy, M. L. F. Sánchez, J. B. López-Sastre and A. Sanz-Medel, "Determination of essential and toxic total elements in premature human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-ORC-MS), using an octopole reaction cell" (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* 19:616-622.
- ²⁰ H. Vanhoe, C. Vandecasteele, J. Versieck, and R. Dams, "Determination of iron, cobalt, copper, rubidium, molybdenum, and cesium in human serum by inductively coupled mass spectrometry" (1989) *Anal. Chem.* 61:1851-1857.
- ²¹ E. Barany, I. A. Bergdahl, A. Schütz, S. Skerfving and A. Oskarsson, "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Direct Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum" (1997) *J. Anal. At. Spectrom.* 12:1005-1009.
- ²² H. G. Iglesias, M. L. . Sanchez, J. A. Rodríguez-Castrillón, J. I. G. Alonso , J. L. Sastre and A. Sanz-Medel, "Enriched stable isotopes and isotope pattern deconvolution for quantitative speciation of endogenous and exogenous selenium in rat urine by HPLC-ICP-MS" (2009) *J. Anal. At. Spectrom.* 24:460-468.
- ²³ A. Castillo, P. Rodríguez-Gonzalez, G. Centineo, A. F. Roig-Navarro, J. I. G. Alonso, "Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by Molecular Mass Spectrometry: Simultaneous Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Fish Tissues" (2010) *Anal. Chem.* 82:2773-2783.
- ²⁴ K. R. Pak and R. Bartha, "Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria" (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3):1013-1017.
- ²⁵ S. Caroli, A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte, and N. Violante, "The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review" (1994) *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24(5&6): 363-398.
- ²⁶ Z. Chen, I. J. Griffin, L. M. Plumlee and S. A. Abrams, "High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry allows rapid assessment of iron absorption in infants and children" (2005) *J. Nutr.* 135(7): 1790-1795.
- ²⁷ C. S. Muñiz, J. M. M. Gayón, J. I. G. Alonso and A. Sanz-Medel, "Speciation of essential elements in human serum using anion exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS" (2001) *J. Anal. At. Spectrom.* 16: 587-592.
- ²⁸ C. Ingle, N. Langford, L. Harvey, J. R. Dainty, C. Armah, S. Fairweather-Tait, B. Sharp, H. Crews, M. Rose, and J. Lewis, "Development of a high-resolution ICP-MS method, suitable for the measurement of iron and iron isotope ratios in acid digests of faecal samples from a human nutrition study" (2002) *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 1498-1501.
- ²⁹ F. Vanhaecke, L. Balcaen, G. de Wannemacker and L. Moens, "Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of Fe isotope ratios", (2002) *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 933-943.
- ³⁰ J. A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J. I. G. Alonso, J. J. Lucena, M. L. García-Tomé, L. Hernández-Apaolaza, "Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants" (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* 390:579-590.

- ³¹ J. Vogl, P. Klingbeil, W. Pritzkow and G. Riebe, "High accuracy measurements of Fe isotopes using hexapole collision cell MC-ICP-MS and isotope dilution for certification of reference materials" (2003) *J. Anal. At. Spectrom.* 18:1125-1132.
- ³² H. G. Iglesias, M. L. Fernández-Sánchez, J. B. López-Sastre and A. Sanz-Medel, "Nutritional iron supplementation studies base don enriched ^{57}Fe , added to milk in rats, and isotope pattern deconvolution in ICP-MS analysis" (2012) *Electrophoresis* 33:1-9.
- ³³ J. K. Böhlke, J. R. de Laeter, P De Brièvre, H. Hidaka, H. S. Peiser, K. J. R. Rosman and P. D. P. Taylor, "Isotopic Compositions of the Elements 2001" (2005) *J. Phys. Chem. Ref. Data* 34(1):57-67.
- ³⁴ S. M. Nelms, C. R. Quétel, T. Prohaska, J. Vogl and P. D. P. Taylor, "Evaluation of detector dead time calculation models for ICP-MS" (2001) *J. Anal. At. Spectrom.* 16:333-338.
- ³⁵ C. S. Muñiz, J. M. M. Gayón, J. I. G. Alonso and A. Sanz-Medel, "Accurate determination of iron, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double focusing ICP-MS" (1999) *J. Anal. At. Spectrom.* 14:1505-1510.
- ³⁶ F. Vanhaecke, G. de Wannemacker, L. Moens, R. Dams, C. Latkoczy, T. Prohaska and D. Stingeder, "Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry" (1998) *J. Anal. At. Spectrom.* 13:567-571.
- ³⁷ K. G. Heumann, S. M. Gallus, G. Rädlinger and J. Vogl, "Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry" (1998) *J. Anal. At. Spectrom.* 13:1001-1008.
- ³⁸ J. I. G. Alonso, "Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis: a study of random and systematic errors" (1995) *Anal. Chim. Acta* 312:57-78.