



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
Departamento de Química Física y Analítica

# **DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS DE TRAZA Y ULTRATRAZA EN MUESTRAS DE SUERO, ORINA Y SANGRE MEDIANTE ICP-MS**

**PROYECTO FIN DE MASTER**

***ANA ELENA GARCÍA FERNÁNDEZ***

**Oviedo, Junio 2012**

**Dr. PABLO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**, Jefe de Sección del Laboratorio del Departamento Técnico del Instituto Nacional de Silicosis de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS DE TRAZA Y ULTRATRAZA EN MUESTRAS DE SUERO, ORINA Y SANGRE MEDIANTE ICP-MS " ha sido realizado por Ana Elena García Fernández en el Laboratorio del Departamento Técnico del Instituto Nacional de Silicosis y en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 15 de Junio de 2012

Fdo.: Pablo Fernández Rodríguez

**Dr. PABLO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**, Investigador Ramón y Cajal, adscrito al Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS DE TRAZA Y ULTRATRAZA EN MUESTRAS DE SUERO, ORINA Y SANGRE MEDIANTE ICP-MS " ha sido realizado por Ana Elena García Fernández en el Laboratorio del Departamento Técnico del Instituto Nacional de Silicosis y en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 15 de Junio de 2012

Fdo.: Pablo Rodríguez González

Esta memoria nunca podría haberse llevado a cabo sin la ayuda de gente a la que estoy muy agradecida:

En primer lugar, al Departamento de Prevención Técnica del Instituto Nacional de Silicosis, por darme la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Máster y todo lo que él conlleva.

Al Dr. Pablo Fernández Rodríguez, por la supervisión directa de este trabajo, su interés y sus ideas para superar las dificultades con las que nos hemos encontrado.

A la Dra. Vanesa Díaz Huerta, por sus indicaciones y observaciones ya que ha sido una de las personas que más me ha ayudado en el día a día.

Al Dr. Pablo Rodríguez González, por guiarme a lo largo de este trabajo y por todas sus buenas sugerencias.

Y por último y no menos importante, a mi padre, por su paciencia con mi impaciencia, por confiar ciegamente en mí y por estar siempre a mi lado apoyándome en todo cuanto hago.

A todos ellos,

MUCHAS GRACIAS.

# ÍNDICE

---

<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>A.1. LOS ELEMENTOS TRAZA EN EL ORGANISMO</b>	<b>7</b>
A.1.1. Los elementos traza: clasificación y metabolismo	7
A.1.2. Elementos traza en fluidos y tejidos biológicos	9
<b>A.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS</b>	<b>11</b>
A.2.1. ETAAS	12
A.2.2. ICP-MS	13
<b>A.3. EFECTOS DE MATRIZ</b>	<b>16</b>
<b>B. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>C. EXPERIMENTAL</b>	<b>21</b>
<b>C.1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS</b>	<b>21</b>
C.1.1. Instrumentación utilizada	21
C.1.2. Reactivos y materiales	21
<b>C.2. PROCEDIMIENTOS</b>	<b>22</b>
C.2.1. Preparación de disoluciones patrón y de las muestras de suero	22
C.2.2. Preparación de muestras de orina	23
C.2.3. Preparación de muestras de sangre para el método de dilución alcalina y adición de reactivos complejantes y tensoactivos	23
C.2.4. Preparación de muestras de sangre para el método de digestión con microondas	24
<b>D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>D.1. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN SUERO MEDIANTE ICP-MS</b>	<b>26</b>
D.1.1. Estudio de los efectos de matriz en suero	26
D.1.2. Cálculo de límites de detección y cuantificación	30
<b>D.2. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN ORINA MEDIANTE ICP-MS</b>	<b>32</b>
D.2.1. Estudio de los efectos de matriz en orina	32
D.2.2. Cálculo de límites de detección y cuantificación	36
<b>D.3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN SANGRE MEDIANTE ICP-MS</b>	<b>37</b>
D.3.1. Método 1: Dilución alcalina de la muestra	37
D.3.1.1. Tratamiento de resultados	38
D.3.1.2. Cálculo de límites de detección	39
D.3.2. Método 2: Digestión en microondas	40
D.3.2.1. Tratamiento de resultados	40
D.3.2.2. Cálculo de límites de detección	41
D.3.2.3. Comparación de los métodos	42
<b>E. CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>F. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>

## **A. INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

---

## A. INTRODUCCIÓN

### A.1. LOS ELEMENTOS TRAZA EN EL ORGANISMO

#### **A.1.1. Los elementos traza: clasificación y metabolismo**

Los organismos vivos están constituidos por varios elementos, de los cuales el H, O, C y N constituyen el 99 %. El resto de los elementos presentes en el organismo son los llamados elementos minerales y se clasifican en base a distintos criterios. En base a su función se puede clasificar a los elementos minerales en tres categorías: esenciales, no esenciales y tóxicos.

Entendemos por elemento **esencial** aquel cuya deficiencia provoca alteraciones en el funcionamiento del organismo, si bien éstas desaparecen cuando se suministra dicho elemento en la proporción adecuada<sup>1</sup>. Los elementos constituyentes (C, H, O y N) y los macroelementos (Na, Ca, Cl, K, Mg, P y S) están presentes en altas concentraciones. Sin embargo, los elementos esenciales para el hombre como el Cr, Cu, Fe, Zn, Mo y Se, están presentes en el organismo a nivel de trazas y ultratazas. Los elementos **no esenciales** se definen como aquellos elementos que se encuentran presentes de manera regular en los organismos vivos en concentración variable y cuya función aún se desconoce. El estudio de sus implicaciones en los organismos vivos puede llegar a revelar el papel desempeñado por estos elementos. Finalmente, los elementos **tóxicos** se caracterizan por producir efectos nocivos en el organismo a niveles de concentración bajos (Cd, Hg, Sn, Pb, etc.).

La Tabla 1 recoge los elementos traza y ultratrazas considerados hasta la fecha como esenciales o potencialmente esenciales, indicando el año de la primera publicación relacionada con su esencialidad así como las funciones bioquímicas de cada uno de ellos.

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.-** Algunos elementos traza y ultratrazas esenciales, el año de la primera publicación acerca de la esencialidad del elemento y funciones bioquímicas más relevantes.

Elemento	Año	Función bioquímica
Fe	Siglo XVII	Captación, transporte y liberación del oxígeno
I	1850	Sustratos en la biosíntesis de las hormonas tiroideas
Cu	1928	Síntesis de hemoglobina, metabolismo del tejido conectivo, desarrollo óseo
Mn	1931	Fosforilación oxidativa, metabolismo de los ácidos grasos, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas
Zn	1934	Síntesis y degradación de ácidos nucleicos y proteínas, secreción pancreática
Co	1935	Metabolismo de la metionina, componente de la vitamina B <sub>12</sub>
Mo	1955	Metabolismo de la xantina
Se	1957	Antioxidante
Cr	1959	Metabolismo de los carbohidratos y de lípidos
V	1971	Biocatalizador de sustratos
F	1972	Formación del hueso
Si	1972	Formación
Ni	1976	Estabilizante de la estructura del ARN
As	1977	Compuesto metilado
B	1981	Metabolismo de Ca, Cu y Mg

La entrada de los elementos en el cuerpo humano tiene lugar por vía digestiva (agua, bebidas en general y alimentos ingeridos) y por vía respiratoria (aire). Una vez en el organismo, los elementos traza y ultratrazas son en parte absorbidos, transportados, transformados, distribuidos y, finalmente, excretados.

Los elementos son transportados por la sangre en donde se encuentran libres o enlazados a las proteínas y eritrocitos. La parte de la sangre que realiza el transporte es el plasma ya que contiene las proteínas transportadoras (p.e. albúmina o transferrina) y compuestos de bajo peso molecular que se unen al elemento en cuestión. Los elementos se distribuyen por los distintos tejidos, en donde al enlazarse a determinadas proteínas se acumulan en lugares específicos. Los principales lugares de acumulación son el hígado, el riñón, el músculo y el hueso. La acumulación se puede interpretar como un mecanismo de desintoxicación pero, en casos extremos, puede producir disfunciones generalizadas en estos tejidos y la muerte del individuo<sup>2</sup>.



# INTRODUCCIÓN

---

Finalmente, tiene lugar la eliminación de los productos derivados del metabolismo, los productos de desecho o los productos en exceso. Las vías renal y gastrointestinal son las más importantes. Otros mecanismos de excreción incluyen las secreciones salivares, la sudoración, la exhalación, la lactación, la exfoliación de la piel, la pérdida de pelo, uñas y el sangrado.

## **A.1.2. Elementos traza en fluidos y tejidos biológicos**

El contenido de los elementos traza en los fluidos biológicos y en los tejidos y órganos nos permite detectar la exposición a distintos metales y en consecuencia la posibilidad de una intoxicación. También nos permite diagnosticar una enfermedad por la acumulación o defecto de un metal, y llevar a cabo estudios metabólicos para aclarar el papel que estos elementos desempeñan en el organismo<sup>3</sup>.

Los fluidos biológicos son muestras comúnmente empleadas para la determinación de los elementos traza y ultratrazas ya que su obtención es relativamente sencilla. La sangre, la orina y el suero son analizados rutinariamente en los laboratorios clínicos. En cuanto a las muestras sólidas se pueden analizar el hígado, el riñón, los pulmones, el hueso (obtenido por biopsia), las heces y el pelo<sup>4</sup>.

### **a) Sangre total, plasma y suero sanguíneo**

La sangre es un líquido viscoso en el que los componentes celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) se encuentran suspendidos en un medio coloidal que constituye el plasma. Además es un líquido opaco debido al número de células en suspensión y rojo por la hemoglobina de los eritrocitos.

Al extraer la sangre, cuando ésta coagula, el fibrinógeno presente en el plasma se convierte en fibrina que se separa como filamentos mezclándose con las células y el líquido para formar un coágulo. Por reposo el coágulo se retrae, al acortarse los filamentos de fibrina, y se exprime un líquido transparente llamado suero. Si se impide la coagulación de la sangre por adición de oxalato o alguna otra sustancia, y se centrifuga, las células más densas caen al fondo del recipiente quedando una capa de líquido en la superficie llamado plasma.

## INTRODUCCIÓN

En el suero se analizan los metales que son transportados por la sangre y que están unidos a proteínas. Los intervalos de concentración de elementos traza y ultratrazas en suero en la población normal se presentan en la Tabla 2<sup>5</sup>. El análisis elemental en suero es complicado debido no solo a las bajas concentraciones de los elementos sino también a la limitación en el volumen disponible para realizar el análisis como el caso de los recién nacidos<sup>6</sup>.

**Tabla 2.** Intervalos de concentración de elementos traza y ultratrazas en suero(s), sangre (sa) y en orina.

Elemento	Concentración		Elemento	Concentración	
	Suero	Orina		Suero	Orina
Ag	0.06-0.3 µg/L (s) 0.1-0.6 µg/L (sa)	0.04-6 µg/L	Ni	0.05-1.3 µg/L (s) 1.1-4 µg/L (sa)	0.06-8 µg/L
Al	0.5-8 µg/L (s) 2-8 µg/L (sa)	2.3-110 µg/L	Mo	0.58-0.91 µg/L (s) 5-157 µg/L (sa)	~100 µg/L
B	17-27 µg/L (s)	0.5-3.3 mg/L	Mn	0.1-2.9 µg/L (s) 6.7-10.4 µg/L (sa)	0.12-20 µg/L
Be	0.04-0.3 µg/L (s)	0.04-0.76 µg/L	Na	2500-3560 mg/L (s)	~2200 mg/L
Bi	0.1-0.8 µg/L (sa)	0.8-1.6 µg/L	Mg	17-22 mg/L (s)	~90 mg/L
Br	3.5-5.5 µg/L (s)	~5 mg/L	Pb	10-290 µg/L (sa)	12-30 µg/L
Ca	91-106 mg/L (s)	~120 mg/L	Rb	150-560 µg/L (s)	1-4.1 mg/L
Cd	0.04-0.4 µg/L (s) 0.1-2 µg/L (sa)	0.4-70 µg/L	Sc	≤0.03 µg/L (sa)	0.3-130 ng/L
Cr	0.04-0.43 µg/L (s) 0.08-0.5 µg/L (sa)	0.04-50 µg/L	Se	30-105 µg/L (s) 80-140 µg/L (sa)	2-160 µg/L
Co	0.08-0.45 µg/L (s) ~20 µg/L (sa)	0.2-135 µg/L	Zn	0.6-1.2 mg/L (s) 4-8 mg/L (sa)	0.27-0.85 mg/L
Cu	0.6-1.4 µg/L (s)	42-50 µg/L	Sr	28-44 µg/L (s)	~0.22 mg/L
F	0.06-0.26 mg/L (sa)	0.3-1.0 mg/L	Ti	20-70 µg/L (sa)	1.3-10 µg/L
K	140-215 mg/L (s)	~1.9 mg/L	Tl	0.05-0.3 µg/L (s) 0.15-0.6 µg/L (sa)	0.02-8.9 µg/L
Hg	0.1-3 µg/L (s) 1.2-10 µg/L (sa)	0.1-24 µg/L	V	0.1-0.9 µg/L (s)	0.2-10 µg/L
Li	0.52-0.64 µg/L (sa)	~0.5 µg/L	Zr	0.1-0.7 mg/L (s) 0.01-0.02 mg/L (sa)	2-100 µg/L

# INTRODUCCIÓN

---

## **b) Orina**

La principal vía de eliminación de los productos de desecho del metabolismo es a través del aparato renal, el cual ha de asegurar el funcionamiento interno del organismo manteniendo un estado estable frente a la variación de las condiciones externas. Como consecuencia, el volumen de orina y el contenido de los solutos en la misma puede variar diariamente en un mismo individuo.

La intoxicación metálica puede ser detectada a través de los análisis en la orina para elementos tales como el Cr, Cd, y Hg<sup>7</sup>. Dependiendo del tipo de análisis y la información buscada habrá que escoger entre la orina de 24 horas o muestras aisladas recogidas normalmente a primera hora de la mañana. En este último caso se suele determinar también el contenido de creatinina en la orina para normalizar los resultados<sup>8</sup>. Para estudios de la población en general se suele recomendar el análisis de la orina de primera hora de la mañana<sup>9</sup>. La Tabla 2 también muestra los contenidos de elementos traza encontrados en orina de sujetos sanos<sup>5</sup>.

## A.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA 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 (mg/L) hasta nivel de ultratrazas ( $\mu\text{g/L}$  e incluso ng/L). 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.

La contaminación de la muestra o la pérdida de analito durante el proceso analítico son los principales problemas asociados al análisis de ultratrazas, por lo que es preciso cuidar en extremo todos los detalles del procedimiento a fin de obtener resultados fiables<sup>10</sup>. Es preciso evaluar y controlar la posible contaminación de

# INTRODUCCIÓN

---

recipientes empleados en el almacenaje de las muestras y elegir adecuadamente el material empleado (p.e. evitar el vidrio) así como limpiarlo convenientemente con disoluciones ácidas. El empleo de reactivos ultrapuros asegura la presencia de contenidos bajos en elementos indeseados.

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 biológicas<sup>11</sup>. La Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (ETAAS) y la Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) son las técnicas atómicas más empleadas.

La técnica ETAAS constituye una herramienta analítica excepcional en el análisis de elementos traza y ultratrazas en material biológico y clínico. Sin embargo, a pesar de sus características analíticas favorables para este tipo de análisis (elevada sensibilidad, volumen de muestra pequeño, etc.), su carácter unielemental limita su aplicación general. A lo largo de los últimos quince años, se ha producido un desarrollo espectacular de la técnica ICP-MS, estableciéndose como la técnica de referencia para análisis elemental en muestras líquidas en detrimento del ETAAS. Esta técnica presenta importantes aplicaciones dentro del análisis biológico elemental debido a sus ventajosas características en términos de sensibilidad, capacidad multielemental y análisis isotópico, si bien su empleo en laboratorios de rutina todavía se encuentra limitado debido al coste de adquisición y mantenimiento de los equipos, lo que explica que en este tipo de laboratorios la técnica ETAAS aún se utilice ampliamente. Cabe pensar que esta situación cambiará en un futuro más o menos próximo a medida que se abaraten los costes de la técnica de ICP-MS.

## **A.2.1. ETAAS**

Entre las ventajas de la técnica cabe citar su relativo bajo coste<sup>12</sup>, 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 mg/L en disolución o de 1 mg/Kg en sólido<sup>13</sup>. Esta alta sensibilidad unida a los bajos volúmenes de muestra requeridos para el análisis (unos pocos mL) ha contribuido a su popularización en el análisis de ultratrazas en material biológico.

# INTRODUCCIÓN

---

Sin embargo, la técnica ETAAS presenta también ciertas limitaciones. En primer lugar, se trata de una técnica unielemental. En segundo lugar, no es posible el acoplamiento en línea con los sistemas de separación cromatográficos para los estudios de especiación. Por último, esta técnica está afectada por un gran número de interferencias, tanto espectrales como no espectrales, si bien se han desarrollado diversas estrategias analíticas para solventar dichas interferencias. Las interferencias espectrales están relacionadas con el aislamiento espectral de la señal. Su eliminación se consigue con la correcta utilización de correctores de fondo. Las interferencias no espectrales son debidas a las interacciones químicas que se producen entre la matriz y el analito. Para la eliminación de estas interferencias existen varias alternativas si, la opción más habitual es el empleo de modificadores de matriz. Los modificadores de matriz son agentes químicos (seleccionados en función de la matriz y el elemento de interés) que se añaden a la muestra con el fin de alterar el comportamiento del analito durante las etapas de mineralización y/o atomización.

## **A.2.2. ICP-MS**

La aparición de esta técnica en 1980 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 cerca de 50 elementos están en el intervalo de 0,01 a 0,1 mg/L llegando a detectar unos pocos ng/L para algunos elementos. Una característica única de esta técnica en comparación con otras es la posibilidad de medir distintos isótopos de un mismo elemento. El espectro de masas tiene una interpretación sencilla, aunque la presencia de interferencias espectrales dificulta en algunos casos el análisis. A pesar de estas ventajas, la aceptación de la técnica en los laboratorios de rutina es lenta debido a su alto coste inicial y de mantenimiento<sup>14</sup>.

Las aplicaciones de esta técnica al análisis de material biológico son numerosas y en los últimos años han aparecido numerosos artículos en los que se destaca el papel desempeñado por esta técnica de análisis<sup>7,15,16,17,18</sup>. El análisis elemental directo de muestras biológicas líquidas (sangre, orina, suero) está limitado por el alto contenido de proteínas y sólidos disueltos que bloquean los sistemas de nebulización de la muestra, y en menor medida, el canal inyector de la antorcha y los orificios de los conos. Dado que

# INTRODUCCIÓN

---

el ICP-MS no tolera contenidos salinos por encima de 0,2 %<sup>19</sup>, generalmente se somete a la muestra líquida a una simple dilución<sup>20,21</sup>, o un ataque de microondas con reactivos seleccionados convenientemente para evitar interferencias espectrales<sup>22</sup>. En ambos casos se emplea uno o varios elementos como patrón interno.

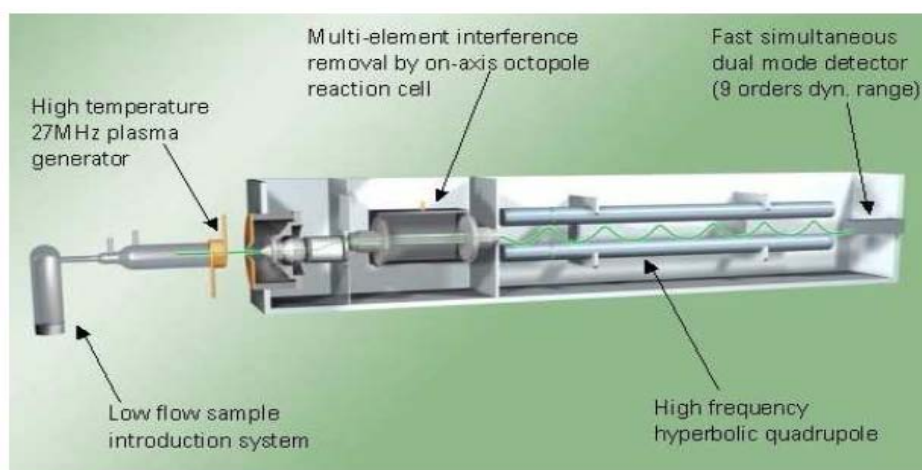
El carácter multielemental del ICP-MS para la determinación simultánea de elementos traza y ultratrazas se ha aplicado a la medida de los intervalos de referencia de varios elementos en diversas muestras clínicas<sup>23</sup>. Asimismo, esta técnica se está empleando cada vez con mayor frecuencia en campañas de certificación de nuevos materiales de referencia<sup>24,25,26</sup>.

Por otra parte, la Espectrometría de Masas proporciona información isotópica que puede utilizarse con fines de determinación de elementos. Por tanto, utilizando ICP-MS es posible realizar cuantificaciones elementales mediante análisis como la dilución isotópica (IDA) que es un método absoluto de análisis directamente trazable al sistema internacional de unidades. IDA se basa en la medida de relaciones isotópicas en muestras donde su composición isotópica ha sido previamente alterada por la adición de una cantidad conocida de un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente.

El principio del funcionamiento del ICP-MS es relativamente sencillo. La muestra es introducida en forma de un aerosol fino en el canal central de la antorcha del plasma. El aerosol se forma en un sistema de nebulización constituido por un nebulizador neumático concéntrico (Meinhard) y una cámara de nebulización de doble paso. La antorcha está formada por tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el flujo de Ar portador (o nebulizador), el exterior para el Ar plasmógeno y el intermedio para el Ar auxiliar. Una vez en el plasma el aerosol se desolvata, vaporiza, atomiza e ioniza.

Un esquema del equipo ICP-MS empleado a lo largo de este trabajo se muestra en la Figura 1.

# INTRODUCCIÓN



*Figura 1. Equipo ICP-MS con analizador de cuadrupolo equipado con una celda de colisión.*

Los iones formados en el ICP son extraídos del canal del plasma hacia una interfase que se encuentra a vacío ( $\sim 1$  torr) por medio del cono de extracción o “sampler” produciéndose una expansión adiabática. A continuación el haz de iones es transmitido hacia el sistema analizador a través de un segundo cono metálico o “skimmer”. Los conos “sampler” y “skimmer” son de níquel y tienen orificios de 1 y 0,8 mm respectivamente. La presión en la región del analizador es de alrededor de 10-5 torr. Esta baja presión es absolutamente necesaria para evitar la neutralización de los iones por colisiones con el gas de fondo. A continuación, el haz iónico pasa al sistema de enfoque a base de lentes. En primer lugar están las dos lentes de extracción, cuya función principal es acelerar los iones muestreados. A continuación se produce el enfoque de los mismos por tres lentes denominadas “Einzel”; y por último, se encuentra el grupo de lentes Omega, que producen una variación en la trayectoria del haz iónico dejando inalterados los fotones, que colisionan con la lente de salida.

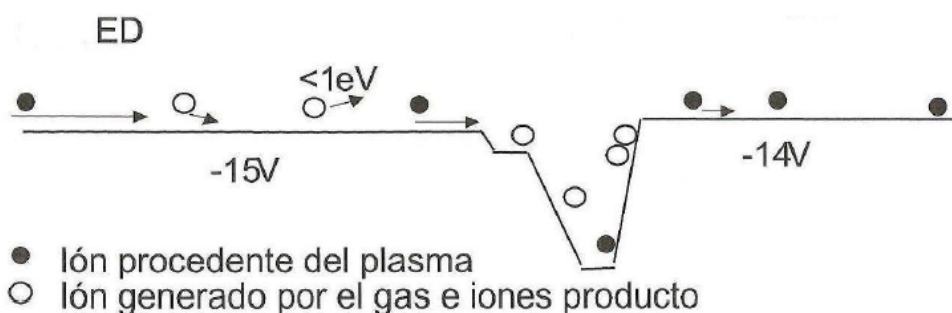
Posteriormente encontramos un octapolo de pequeño diámetro que se utiliza como celda de colisión. Esta celda se presuriza introduciendo un flujo de gas He, para la eliminación de interferencias poliatómicas y para aumentar la eficacia de transmisión de los iones sin la necesidad del enfoque colisional.

Las moléculas de He colisionan con los iones poliatómicos produciendo la disociación de aquellos cuya energía de disociación sea menor que la energía de colisión.

## INTRODUCCIÓN

---

Por otra parte, las colisiones producen una discriminación de energías cinéticas entre las moléculas poliatómicas y las monoatómicas de tal manera que parte de las poliatómicas no alcanzan el potencial eléctrico del cuadrupolo. El esquema del sistema de discriminación de energías se ilustra en la Figura 2. Para la mayoría de iones poliatómicos el proceso de discriminación de energía es más eficiente que la disociación inducida por colisión a la hora de reducir su intensidad aunque ambos procesos pueden tener lugar simultáneamente en el octapolo.



**Figura 2.** Discriminación de discriminación de energías cinéticas por colisión con He.

Una vez en el espectrómetro de masas los iones son separados en función de su relación masa/carga. El analizador de masas es de tipo cuadrupolo, constituido por cuatro barras cilíndricas sometidas a corrientes continuas y alternas de radiofrecuencias.

Variando estos voltajes, el cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de modo que sólo aquellos iones con una relación masa/carga determinada pasarán a través del centro del cuadrupolo hacia el detector.

Los iones, una vez separados en función de su relación masa/carga, son detectados mediante un multiplicador de electrones secundarios (SEM) que consta de un dínodo de conversión situado frente a un multiplicador de electrones secundarios con dínodos discretos.

### A.3. EFECTOS DE MATRIZ

El efecto matriz<sup>27</sup> consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. En otras palabras,



## INTRODUCCIÓN

---

para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental.

Una posibilidad para evitar el efecto matriz sería construir siempre la recta de calibrado tomando una muestra parecida a la muestra problema pero libre del analito a determinar (un blanco de muestra), y añadirle cantidades conocidas del analito para formar soluciones patrón. Sin embargo, esta aproximación resulta, en numerosos casos, impracticable, pues el efecto matriz puede variar de una muestra a otra y además, la disponibilidad de blancos de muestras es muy limitada.

La mejor alternativa para minimizar el efecto matriz es utilizar técnicas basadas en el análisis por dilución isotópica. Sin embargo, cuando esto no es posible, la técnica de las adiciones estándar se puede utilizar como alternativa, y consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de adiciones estándar. La posterior cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero. El mayor inconveniente de esta técnica es que necesitamos construir una recta de adiciones estándar para cada muestra que queramos analizar, lo cual supone un incremento sustancial en el volumen de trabajo del laboratorio.

## **B. OBJETIVOS**

### **B. OBJETIVOS**

El análisis de elementos traza y ultratrazas en el ser humano es indispensable debido a que pueden ser tóxicos o desempeñar funciones esenciales en el organismo. La determinación de estos elementos en muestras de interés clínico, fundamentalmente fluidos biológicos, permite caracterizar deficiencias nutricionales e intoxicaciones así como las posibles acciones farmacológicas asociadas a los diferentes niveles en que se pueden encontrar estos elementos. Una de las mejores técnicas para la medida de estos elementos es el ICPMS, debido a su excelente sensibilidad y su capacidad para realizar análisis multielemental.

El objetivo general de este Proyecto Fin de Máster es la evaluación de distintos métodos de preparación de muestra para el análisis multielemental en muestras de suero, orina y sangre mediante ICP-MS. Este objetivo se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

- a.** Estudio de los efectos de matriz para la determinación de elementos traza y ultratrazas en fluidos biológicos (suero y orina) mediante ICP-MS.
- b.** Comparación de la digestión ácida de la muestra asistida por microondas con la adición de reactivos complejantes, tensoactivos y dilución alcalina para el análisis multielemental en sangre.

## **C. EXPERIMENTAL**

## C. EXPERIMENTAL

### C.1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

#### **C.1.1. Instrumentación utilizada**

- Balanza Cobos XT 220A (Cobos Precisión S.L., Hospitalet, España) y juego de pesas certificadas de clase E2 Mettler Toledo 15880.
- Horno microondas MARSXpress de CEM Corporation (Mathews, NC, Estados Unidos).
- Equipo ICP- MS, de Agilent Technologies Modelo 7500cx (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Espectrómetro de Masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo de tipo cuadrupolo equipado con una celda de colisión un nebulizador tipo Meinhard de flujo concéntrico y un muestreador automático.

#### **C.1.2. Reactivos y materiales**

- **Reactivos:**
  - Patrones naturales certificados de cada uno de los elementos a determinar en una concentración aproximada de 1000 ppm (Absolute Standards, USA).
  - Ácido nítrico concentrado “Suprapur” 65 % (Merck, Darmstadt, Alemania).
  - Amonio “Suprapur” 25% (Merck).
  - Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato, EDTA (Merck).
  - Tritón X-100 (Merck).
  - 1,3-Butanodiol (Merck).
- **Materiales:**
  - Micropipetas HTL Labmate de 2-20, 20-200 y 200-1000  $\mu$ L; Rainin SL100 de 10-100  $\mu$ L.
  - Pipetas Pasteur de plástico.
  - Botes de polipropileno de 150, 60 y 20 mL.
  - Viales de polietileno para muestreador de 6 mL.
  - Bombas de teflón de 50 mL para microondas.

### C.2. PROCEDIMIENTOS

#### **C.2.1. Preparación de disoluciones patrón y de las muestras de suero**

En primer lugar, se preparó una disolución de patrones internos que contiene Litio, Escandio, Itrio, Indio, Terbio, Holmio y Bismuto de 1 ppm, a partir de una disolución multielemental de 10 ppm mediante dilución con H<sub>2</sub>O milli-Q. A continuación, se preparó mediante dilución con agua milli-Q una disolución multielemental de 1 ppm de los elementos a medir (Berilio, Cromo, Cobalto, Níquel, Arsénico, Selenio, Cadmio, Talio, Plomo y Uranio), a partir de las disoluciones certificadas de 1000 ppm. Posteriormente, se preparó una disolución multielemental de estos elementos de 100 ppb, a partir de la disolución intermedia de 1 ppm, diluyendo con H<sub>2</sub>O milli-Q.

No se acidificó el agua milli-Q con HNO<sub>3</sub> (1%) para que tanto las muestras como los patrones estuvieran en el mismo medio.

Todas las disoluciones se prepararon por pesada y se almacenaron en una nevera a temperaturas comprendidas entre 1 y 5 °C.

- **Preparación del calibrado:** en la preparación del calibrado no se empleó HNO<sub>3</sub> ya que las proteínas precipitan y pueden obstruir el sistema de nebulización del ICP-MS. Por tanto, se preparó un calibrado con siete puntos (incluido el blanco) añadiendo un volumen variable en orden creciente de la disolución multielemental de 100 ppb (0, 50 µL, 100 µL, 250 µL, 500 µL, 1 mL y 2 mL), a continuación un volumen constante de 100 µL de la disolución de patrón interno de 1 ppm y finalmente se diluyó con H<sub>2</sub>O milli-Q hasta llevarlo a un volumen final de 10 mL.
- **Preparación de muestras diluidas 1:5:** se realizó de igual manera que el calibrado, pero añadiendo 2 mL de la muestra de suero.
- **Preparación de muestras diluidas 1:10:** se realizó de igual manera que las muestras diluidas 1:5, pero añadiendo 1 mL de la muestra de suero.

- **Preparación de muestras diluidas 1:20:** se realizó de igual manera que las muestras diluidas 1:5, pero añadiendo 0.5 mL de la muestra de suero.
- **Preparación de los blancos:** se realizaron diez blancos para determinar los límites de detección y cuantificación añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón interno y se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q hasta llevarlo a un volumen final de 10 mL.

### C.2.2. Preparación de muestras de orina

Las disoluciones patrón, el calibrado, las muestras (con sus diferentes diluciones) y los blancos se prepararon como se describe en el apartado anterior, pero en este caso, en vez de diluir con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q, se hizo con  $\text{HNO}_3$  al 1%.

### C.2.3. Preparación de muestras de sangre para el método de dilución alcalina y adición de reactivos complejantes y tensoactivos

Todas las muestras, estándares y materiales de control de calidad fueron diluidos 1:20 usando una disolución alcalina que contenía aproximadamente 0.7 mM de amonio, 0.01 mM de EDTA, 0.07% (v/v) de Tritón X-100 y 1.5% (v/v) de butanol.

Esta disolución alcalina se preparó de la siguiente manera:

- Disolución de  $\text{NH}_4^+$ : se preparó una disolución intermedia 1:20 de  $\text{NH}_4^+$ , para la que se añade 1 mL de  $\text{NH}_4^+$  y se lleva a 20 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q, y de esta disolución intermedia se extraen 11  $\mu\text{L}$  necesarios para la disolución alcalina a un bote de polipropileno de 150 mL, donde se añadirán el resto de los reactivos.
- Disolución de EDTA: se preparó una disolución intermedia pesando 55.83 mg de EDTA y se llevó a 150 mL con agua milli-Q. De esta disolución intermedia se extrajeron 1.5 mL que se añadieron al bote de polipropileno junto con el  $\text{NH}_4^+$ .
- Tritón: se añadieron 0.110 mL a la disolución anterior.
- Butanol: se añadieron 2.25 mL a la disolución anterior.

## EXPERIMENTAL

---

Una vez se añadidos todos los reactivos en el bote de polipropileno, la disolución se llevó a un volumen final de 150 mL con agua milli-Q.

Se prepararon las disoluciones de patrón interno de 1 ppm, de analitos de 1 ppm y de 100 ppb y el calibrado de igual manera que con suero y orina, pero siendo el diluyente la disolución alcalina preparada anteriormente.

La preparación de la muestra (de la que se hicieron cinco réplicas), se hizo empleando un volumen fijo de 0.5 mL de muestra de sangre, 100  $\mu$ L de la disolución de patrón interno y llevando a un volumen final de 10 mL con la disolución de alcalina.

Se prepararon diez blancos para determinar los límites de detección añadiendo 100  $\mu$ L de la disolución de patrón interno y se diluyó con la disolución alcalina hasta un volumen final de 10 mL.

### **C.2.4. Preparación de muestras de sangre para el método de digestión con microondas**

La disolución ácida empleada en el ataque por microondas contiene un 10% de  $\text{HNO}_3$  al 65% y un 30 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se llevó a un volumen final de 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q.

Se preparó el calibrado de la misma manera que para el estudio del efecto de matriz en suero y orina, pero siendo el diluyente la disolución ácida descrita anteriormente.

En la preparación de la muestra (de la que se hicieron cinco réplicas), se empleó un volumen fijo de 0.5 mL de muestra de sangre, 100  $\mu$ L de disolución de patrón interno y se llevó a un volumen final de 10 mL con la disolución de ataque.

Se prepararon diez blancos para determinar los límites de detección añadiendo 1 mL de  $\text{HNO}_3$  al 65%, 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 3 mL de agua milli-Q aproximadamente.

Para realizar el ataque de las muestras por microondas se introdujeron las bombas de teflón en el horno microondas y se expusieron a 1600W durante 10 minutos hasta que alcanzasen los 175°C, para después mantener esa T durante 4.5 minutos.



## **D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

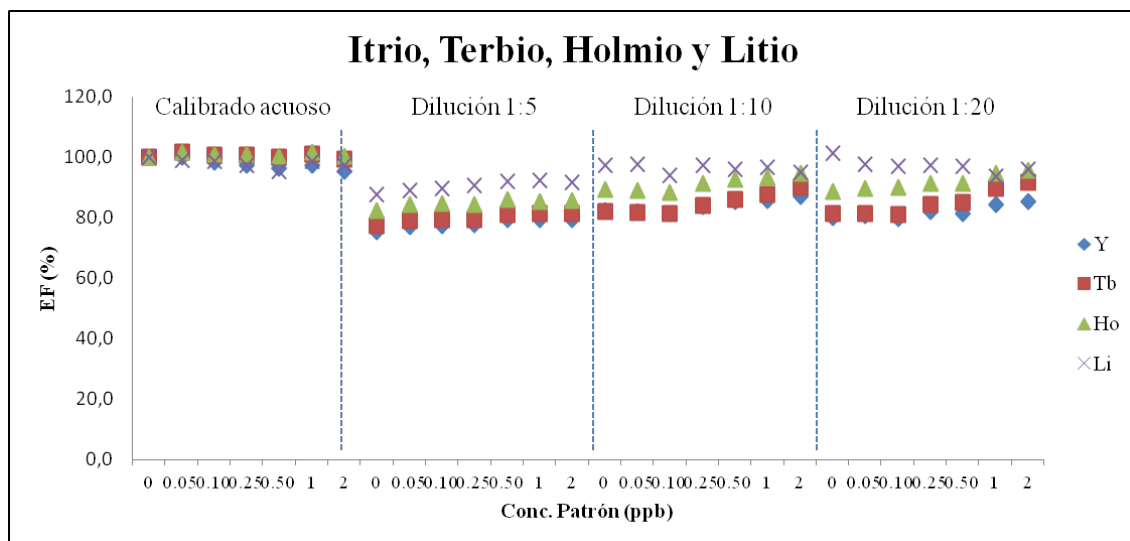
### D.1. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN SUERO MEDIANTE ICP-MS

#### D.1.1. Estudio de los efectos de matriz en suero

Para estudiar el efecto de matriz sufrido por los patrones internos (Li, Sc, Y, In, Tb, Ho y Bi) tanto en los patrones de calibración como en las muestras diluidas 1:5, 1:10 y 1:20, se calculo el efecto de matriz (EF) dividiendo la señal obtenida en cada muestra o patrón por la concentración del patrón interno añadido y éste valor se dividió por el valor obtenido en el blanco (Ecuación [1]).

$$EF(\%) = \frac{\frac{I_{\text{muestra o patrón}}}{C_{\text{muestra o patrón}}}}{\frac{I_{\text{Blanco}}}{C_{\text{Blanco}}}} \times 100 \quad [1]$$

Los valores de efecto de matriz obtenidos en el calibrado acuoso y en el suero diluido 1:5, 1:10 y 1:20 para el Y, Tb, Ho y Li se muestran en la Figura 3.



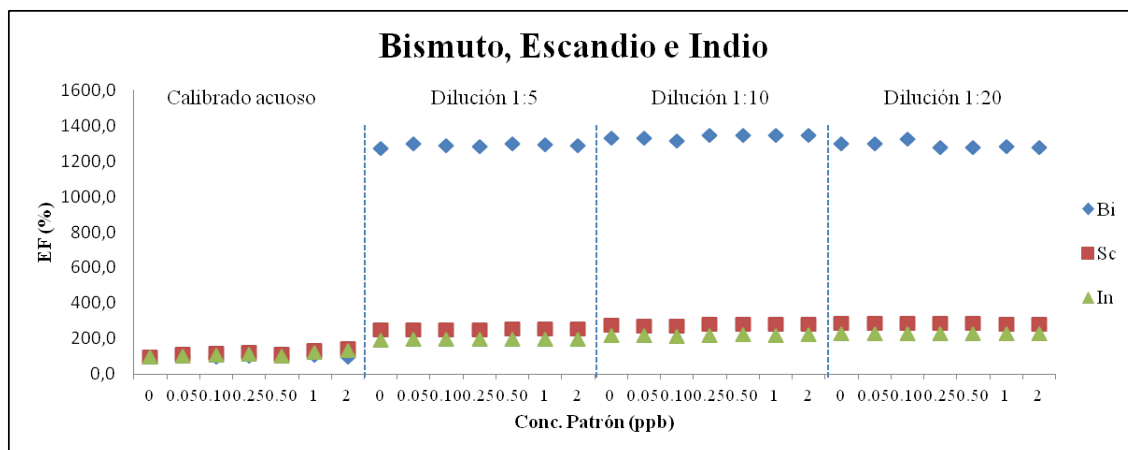
**Figura 3.** Comportamiento de los patrones internos (Y, Tb, Ho y Li) para el calibrado acuoso y las muestras (diluciones 1:5, 1:10 y 1:20) en el suero.

Como se puede observar, en el calibrado acuoso se obtienen valores de EF del 100% lo que indica que no existe efecto de matriz respecto al blanco. Sin embargo, en las diluciones del suero 1:5, 1:10 y 1:20 se obtienen valores inferiores

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(aproximadamente el 80%) independientemente del factor de dilución aplicado a la muestra. A la vista de estos resultados estos cuatro elementos serían adecuados para su uso como patrón interno en cualquier dilución de la muestra de suero.

Los valores de efecto de matriz obtenidos en el calibrado acuoso y en el suero diluido 1:5, 1:10 y 1:20 para el Bi, Sc e In se muestran en la Figura 4.



**Figura 4.** Comportamiento de los patrones internos (Bi, Sc e In) para el calibrado acuoso y las muestras (diluciones 1:5, 1:10 y 1:20) en el suero.

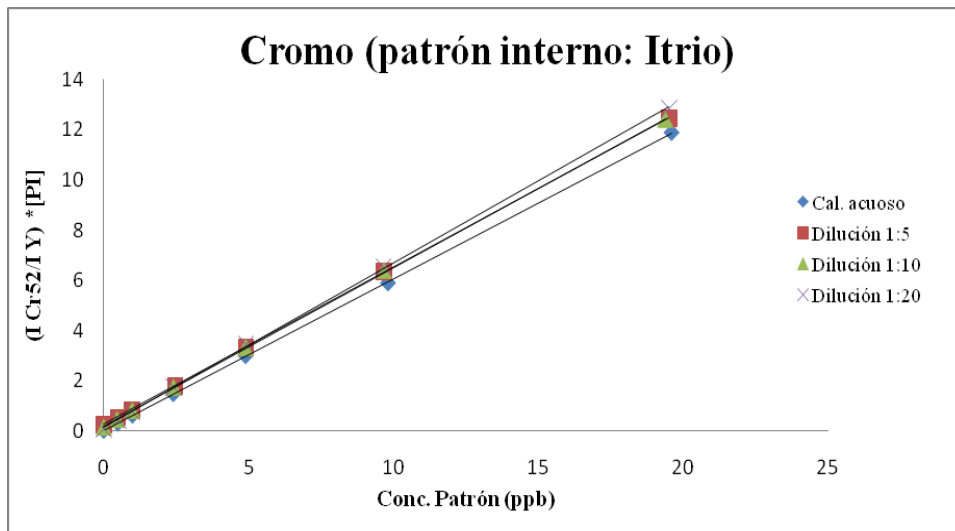
Como se puede observar, en el calibrado acuoso se obtienen valores de EF del 100% lo que indica que no existe de matriz. Sin embargo, en las diluciones del suero 1:5, 1:10 y 1:20 se obtienen valores exageradamente altos, particularmente para el Bi, reflejando un comportamiento muy diferente de estos elementos respecto al calibrado acuoso.

Esto puede ser debido a que los sueros contienen C, cuya presencia aumenta la ionización de elementos como el As, Se y Bi, y por otra parte, elementos como el Hg, Sb, Sn, Se, As y Bi pueden sufrir procesos de reducción formando compuestos volátiles, que son transportados eficientemente en el aerosol dando lugar a una mayor señal que en medio acuoso. Este comportamiento obliga a descartar Bi, Sc e In como patrones internos en análisis posteriores.

Para asignar a cada analito el patrón interno más adecuado se compararon los calibrados obtenidos en cada elemento utilizando los patrones que presentasen masas similares. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 5 los calibrados obtenidos para el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cr utilizando Y como patrón interno. Como se puede observar se obtuvieron pendientes similares en el calibrado acuoso y en las distintas diluciones de la muestra, indicando que no se observan efectos de matriz en la determinación de Cr en suero por ICP-MS.



**Figura 5.** Representación de los calibrados realizados agua y en la matriz de suero diluido 1:5, 1:10 y 1:20 para el Cr utilizando Y como patrón interno.

Se estudió qué patrón interno era más adecuado para cada uno de los elementos analizados en el suero, observando la relación de pendientes entre el calibrado acuoso y las muestras diluidas 1:5, 1:10 y 1:20. La Tabla 3 es un ejemplo de este procedimiento para el Cr, comparando los patrones internos Y y Tb.

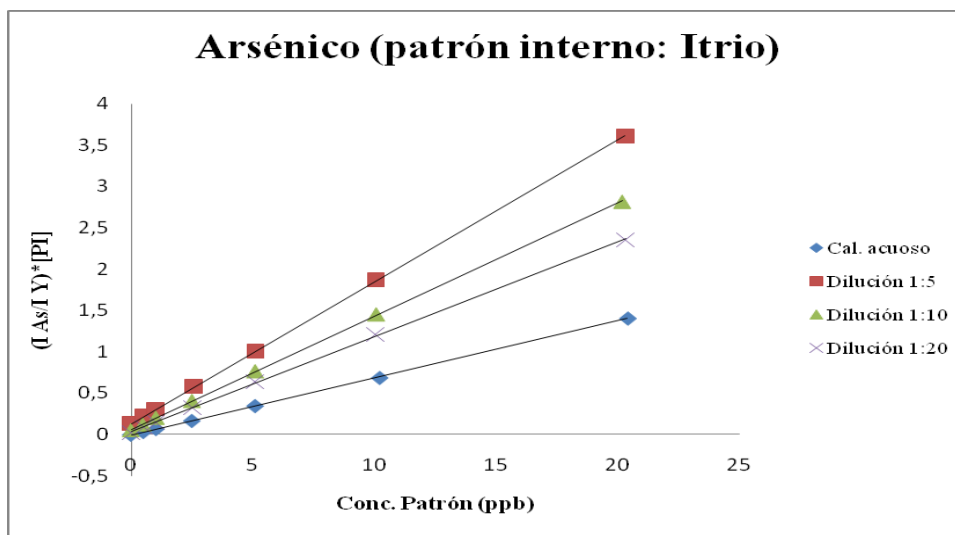
**Tabla 3.** Relación de pendientes para el Cr empleando como patrón interno Y o Tb en suero.

Elemento	P.I.	Muestra	Pendiente	Ordenada en origen	Coefficiente Correlación	Relación de pendientes
Cr	Y	Cal. Acuoso	0,605	0,005	1	
		Dilución 1:5	0,627	0,246	1	1,036
		Dilución 1:10	0,633	0,171	0,999	1,046
		Dilución 1:20	0,654	0,137	0,999	1,081
	Tb	Cal. Acuoso	0,158	0,004	1	
		Dilución 1:5	0,167	0,066	1	1,057
		Dilución 1:10	0,166	0,047	0,999	1,051
		Dilución 1:20	0,167	0,056	0,999	1,057

En el caso del Cr, la relación de pendientes de las diferentes diluciones con respecto a la del calibrado acuoso para los patrones internos Y y Tb, son muy similares, pero escogimos como patrón interno el Y por tener una más próxima a la masa del Cr.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un caso contrario es el del As, en el que si se observaron efectos de matriz como se muestra en la Figura 6, donde las pendientes obtenidas en las distintas diluciones del suero son significativamente superiores a las obtenidas en el calibrado acuoso.



**Figura 6.** Representación de los calibrados realizados en agua y en la matriz de suero diluido 1:5, 1:10 y 1:20 para el As en suero utilizando Y como patrón interno.

Para establecer un criterio con el que decidir los elementos en los que no se puede utilizar un calibrado con patrón interno sino adiciones estándar se compararon las pendientes obtenidas en la dilución 1:10 y en el calibrado acuoso. Solamente se utilizó en este estudio la dilución 1:10 al considerarse que la dilución 1:5 era una matriz muy concentrada y que la 1:20 era demasiado diluida. De este modo, se calculó el cociente de las pendientes estableciéndose como criterio (al 95% de confianza) que valores por debajo de 0.9 o superiores a 1.10 demostraban la necesidad de aplicar adiciones estándar a la muestra. Los cocientes de las pendientes obtenidas para las tres diluciones se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Relación de pendientes para las diferentes diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 respecto a la pendiente del calibrado acuoso para los distintos elementos analizado en el suero.

	Pendiente dilución/Pendiente calibrado		
	Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:20
<b>Be</b>	0,78	0,77	0,75
<b>Cr</b>	1,04	1,05	1,08
<b>Co</b>	0,92	0,92	0,91

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Ni</b>	0,90	0,91	0,94
<b>As</b>	2,52	2	1,68
<b>Se</b>	2,33	1,89	1,67
<b>Cd</b>	0,77	0,80	0,89
<b>Tl</b>	0,98	1,03	1,11
<b>Pb</b>	0,69	0,65	0,69
<b>U</b>	1,95	1,89	1,82

Fijándonos en la relación dada para la dilución 1:10, para determinar los elementos Cr, Co, Ni y Tl en suero, puede emplearse un calibrado externo, mientras que para el resto de los elementos se observan efectos de matriz y habría que emplear adiciones estándar. El método de las adiciones estándar<sup>28</sup>, tiene como principal inconveniente que necesita mayores cantidades de muestra y requiere para cada muestra el análisis de varias alícuotas de la misma a las que se añaden cantidades crecientes del elemento a analizar. Esto hace que sea un método extremadamente difícil de automatizar y de implantar en análisis de rutina.

Finalmente se asignó como patrón interno aquel cuya masa fuese más próxima al elemento a analizar y que proporcionara una mejor relación de pendientes. Es decir, para el Cr, Co, Ni, se empleó Y, y para el Tl, se utilizó Tb.

### D.1.2. Cálculo de límites de detección y cuantificación

Se define límite de detección<sup>28</sup> como la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco.

$$S_m = y_{bl} + 3 \cdot s_{bl} \quad [2]$$

$$LOD = \frac{S_m}{m} \quad [3]$$

$$LOC = 3.3 \cdot LOD \quad [4]$$

Siendo:  $S_m \equiv$  mínima señal analítica distinguible.

$y_{bl} \equiv$  media de la señal analítica de los blancos.

$s_{bl} \equiv$  desviación estándar de la señal.

$LOD \equiv$  límite de detección.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

$m \equiv$  pendiente de la recta de calibrado.

LOC  $\equiv$  límite de cuantificación.

Para calcular los límites de detección y cuantificación, se realizó el análisis de diez blancos, que únicamente contenían patrón interno y agua milli-Q.

Se introdujo el valor de las intensidades de los elementos a medir en el blanco en la recta de calibrado utilizando el patrón interno adecuado y se calculó la desviación estándar de las concentraciones obtenidas. Los límites de detección y cuantificación obtenidos según las Ecuaciones [2], [3] y [4] se calcularon teniendo en cuenta una dilución 1:10 de la muestra. Los resultados obtenidos para los distintos elementos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Límites de detección y cuantificación para los diferentes elementos analizados en suero.

	LOD ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )	LOC ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )
<b>Be</b>	3,65	12,05
<b>Cr</b>	0,01	0,03
<b>Co</b>	0,01	0,02
<b>Ni</b>	0,44	1,58
<b>As</b>	0,01	0,03
<b>Se</b>	0,44	1,44
<b>Cd</b>	0,01	0,02
<b>Tl</b>	0,00	0,00
<b>Pb</b>	0,28	0,933
<b>U</b>	0,00	0,00

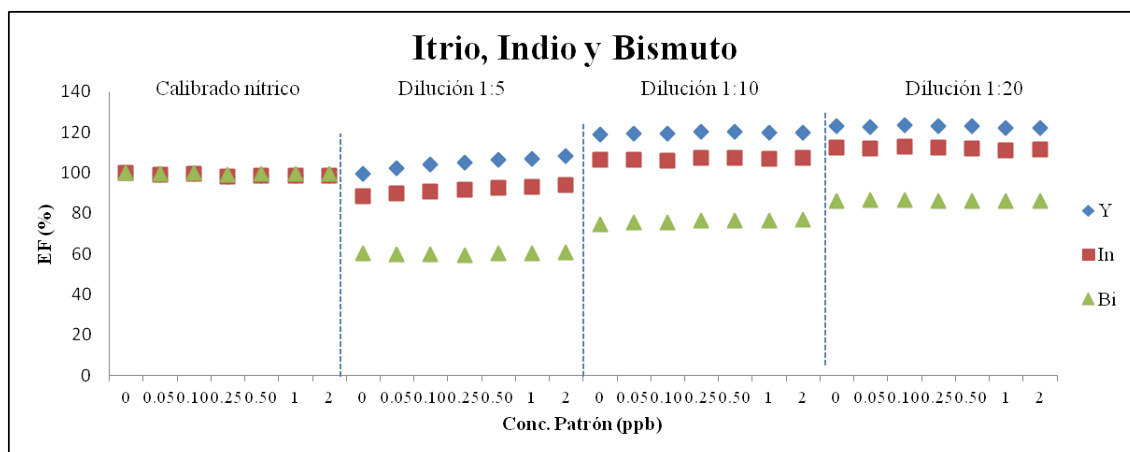
Como se puede observar en la Tabla 5, para casi todos los elementos medidos obtenemos un límite de cuantificación menor de  $50 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  (ppt), excepto para el Ni, que tiene problemas de contaminación en blancos debido a las piezas del equipo de agua ultrapura y a los conos del ICP-MS, que contienen Ni. Por otra parte, el Se presenta límites de detección más altos debido a interferencias espectrales. En el caso del Pb, se observaron límites de detección de  $0.3 \text{ ng g}^{-1}$  debido a problemas de contaminación en el equipo ICP-MS.

D.2. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN ORINA MEDIANTE ICP-MS

**D.2.1. Estudio de los efectos de matriz en orina**

El estudio de los efectos de matriz en orina se realizó de la misma manera que en el suero. En este caso la preparación de muestra se realizó como se indica en la sección C.1.2.2.

Los valores de efecto de matriz obtenidos mediante la ecuación [1] en el calibrado empleando ácido nítrico al 1% y en la orina diluida 1:5, 1:10 y 1:20 para el Y, In y Bi se muestran en la Figura 7.



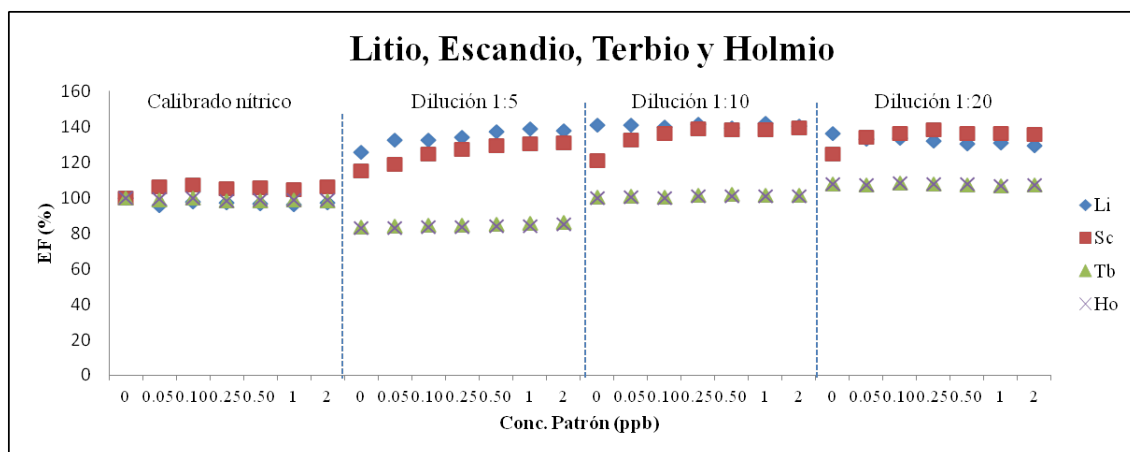
**Figura 7.** Comportamiento de los patrones internos (Y, In y Bi) para el calibrado en ácido nítrico y las muestras (diluciones 1:5, 1:10 y 1:20) en la orina.

Como se puede observar, en el calibrado en ácido nítrico se obtienen valores de EF del 100% lo que indica que no existe efecto de matriz respecto al blanco, y en las diluciones del suero 1:5, 1:10 y 1:20 se observa un comportamiento similar para los diferentes patrones internos excepto en el caso del Bi en la dilución 1:5 (valores en torno al 60%). A la vista de estos resultados el Y y el In serían adecuados para su uso como patrón interno en cualquier dilución de la muestra de orina.

Los valores de efecto de matriz obtenidos en el calibrado nítrico y en la orina diluida 1:5, 1:10 y 1:20 para el Li, Sc, Tb y Ho, se muestran en la Figura 8.



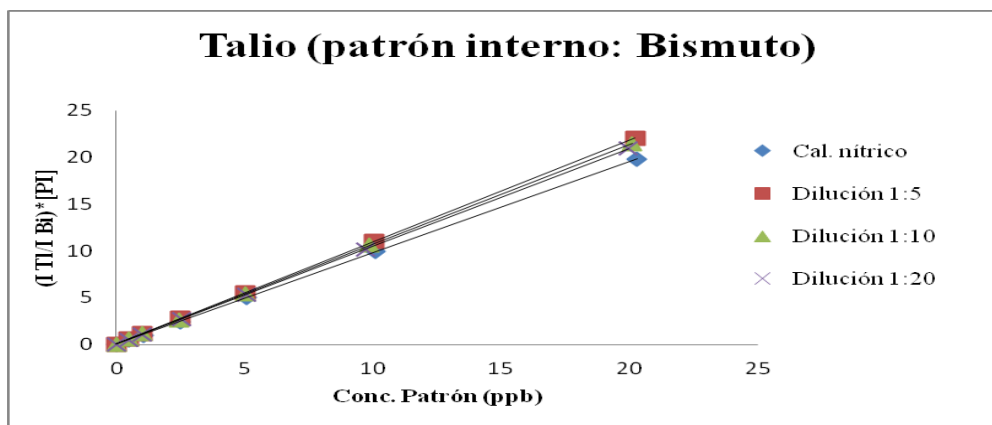
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 8.** Comportamiento de los patrones internos (Li, Sc, Tb y Ho) para el calibrado en ácido nítrico y las muestras (diluciones 1:5, 1:10 y 1:20) en la orina.

En el caso de la orina, no se puede usar el Li como patrón interno, puesto que es un elemento que está presente en la orina. Por otro lado el Sc muestra efectos matriz mientras que el Tb y el Ho no presentan efectos de matriz importantes en diluciones 1:10 y 1:20 por lo que podrían ser utilizados como patrones internos.

Para asignar a cada analito el patrón interno más adecuado se compararon los calibrados obtenidos en cada elemento utilizando los patrones que presentasen masas similares. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 9 los calibrados obtenidos para el Tl utilizando Bi como patrón interno. Como se puede observar se obtuvieron pendientes similares en el calibrado ácido nítrico y en las distintas diluciones de la muestra, indicando que no se observan efectos de matriz en la determinación de Tl en orina por ICP-MS.



**Figura 9.** Representación de los calibrados realizados en ácido nítrico y en la matriz de orina diluida 1:5, 1:10 y 1:20 para el Tl en orina utilizando Bi como patrón interno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

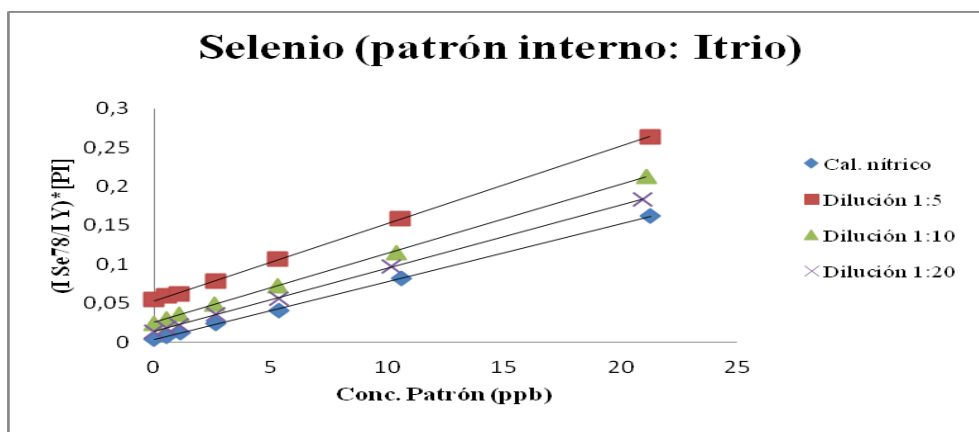
Se estudió qué patrón interno era más adecuado para cada uno de los elementos analizados en la orina, observando la relación de pendientes entre el calibrado en ácido nítrico y las muestras diluidas 1:5, 1:10 y 1:20. La Tabla 6 es un ejemplo de este procedimiento para el Tl, comparando los patrones internos Bi y Tb.

**Tabla 6.** Relación de pendientes para el Tl empleando como patrón interno Bi o Tb en orina.

Elemento	P.I.	Muestra	Pendiente	Ordenada en origen	Coefficiente Correlación	Relación de pendientes
Tl	Bi	Cal. Acuoso	0.979	0.018	1	
		Dilución 1:5	1.088	0.047	1	1.111
		Dilución 1:10	1.068	0.038	1	1.091
		Dilución 1:20	1.049	0.013	1	1.072
	Tb	Cal. Acuoso	0.672	0.005	1	
		Dilución 1:5	0.518	0.026	1	0.771
		Dilución 1:10	0.546	0.014	1	0.813
		Dilución 1:20	0.571	0.007	1	0.850

Como se puede observar, la relación de pendientes de las diferentes diluciones con respecto a la del calibrado en ácido nítrico empleando Bi como patrón interno se encuentra dentro del intervalo 0.9 – 1.10 (para el 95% de confianza). Por otro lado, cuando se emplea Tb como patrón interno la relación de pendientes queda fuera de ese intervalo. Por tanto, se seleccionó Bi como patrón interno para la determinación de Tl en orina.

Un caso representativo en el que se observan efectos de matriz es el del Se como se muestra en la Figura 10. Como se puede observar las pendientes obtenidas en las distintas diluciones de la orina son significativamente superiores a las obtenidas en el calibrado con ácido nítrico.



**Figura 10.** Representación de los calibrados realizados en ácido nítrico y en la matriz de orina diluida 1:5, 1:10 y 1:20 para el Se en orina utilizando Y como patrón interno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De igual manera que para el suero, para establecer un criterio con el que decidir los elementos en los que no se puede utilizar un calibrado con patrón interno sino adiciones estándar se compararon las pendientes obtenidas en la dilución 1:10 y en el calibrado acuoso. Solamente se utilizó en este estudio la dilución 1:10 al considerarse que la dilución 1:5 era una matriz muy concentrada y que la 1:20 era demasiado diluida. De este modo, se calculó el cociente de las pendientes estableciéndose como criterio (al 95% de confianza) que las relaciones por debajo de 0.9 o superiores a 1.10 demostraban la necesidad de aplicar adiciones estándar a la muestra. Los cocientes de las pendientes obtenidas para las tres diluciones se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Relación de pendientes para las diferentes diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 respecto a la pendiente del calibrado en ácido nítrico para los distintos elementos analizados en la orina.

	Pendiente dilución/Pendiente calibrado		
	Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:20
<b>Be</b>	0,86	0,94	0,97
<b>Cr</b>	0,95	0,96	0,95
<b>Co</b>	0,90	0,92	0,92
<b>Ni</b>	0,83	0,86	0,88
<b>As</b>	1,22	1,11	1,03
<b>Se</b>	1,29	1,14	1,14
<b>Cd</b>	0,85	0,89	0,92
<b>Tl</b>	1,11	1,09	1,07
<b>Pb</b>	1,07	1,07	1,06
<b>U</b>	1,14	1,15	1,13

Fijándonos en la relación de pendientes obtenida con la dilución 1:10 para determinar los elementos Be, Cr, Co, Tl y Pb en orina, puede emplearse un calibrado externo, mientras que para el resto de los elementos se observan efectos de matriz y habría que emplear adiciones estándar.

Finalmente se asignó como patrón interno aquel cuya masa fuese más próxima al elemento a analizar y que proporcionara una mejor relación de pendientes. Es decir, para el Be, Cr y Co, se empleó Y como patrón interno, y para el Tl y el Pb se utilizó Bi.

**D.2.2. Cálculo de límites de detección y cuantificación**

Se calcularon los límites de detección y cuantificación de igual manera que en las muestras de suero mediante el análisis de diez blancos, que únicamente contenía patrón interno y HNO<sub>3</sub> al 1%.

Se introdujo el valor de las intensidades de los elementos a medir en el blanco en la recta de calibrado utilizando el patrón interno adecuado y se calculó la desviación estándar de las concentraciones obtenidas. Los límites de detección y cuantificación obtenidos se calcularon teniendo en cuenta una dilución 1:10 de la muestra. Los resultados obtenidos para los distintos elementos se muestran en la Tabla 8.

*Tabla 8. Límites de detección y cuantificación para los diferentes elementos analizados en la orina.*

	<b>LOD (ng·g<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOC (ng·g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Be</b>	0,27	0,90
<b>Cr</b>	0,20	0,65
<b>Co</b>	0,03	0,09
<b>Ni</b>	1,12	3,71
<b>As</b>	0,13	0,42
<b>Se</b>	5,21	17,16
<b>Cd</b>	0,07	0,23
<b>Tl</b>	0,01	0,05
<b>Pb</b>	0,55	1,83
<b>U</b>	0,01	0,02

Como anteriormente concluimos que sólo se podrían determinar Be, Cr, Co, Tl y Pb por calibrado externo, los límites de detección obtenidos sólo serán aplicables para dichos elementos.

Como se puede observar en la Tabla 8, hay tres elementos que tienen límites de cuantificación elevados, el Ni, que tiene problemas de contaminación en blancos por piezas del equipo de agua ultrapura y por los conos del ICP-MS, cuyos materiales son de Ni. Por otra parte, el Se, que presenta límites de detección más altos debido a sus interferencias espectrales. En el caso del Pb, se observaron límites de detección de 0.5 ng g<sup>-1</sup> debido a un problema de contaminación en el ICP-MS.

### D.3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA EN SANGRE MEDIANTE ICP-MS

Para la determinación de elementos traza y ultratrazas en sangre por ICP-MS se compararon dos métodos de preparación de muestra distintos. Como no se disponía de un material de referencia certificado, ambos métodos se compararon mediante el análisis de la misma muestra de sangre humana realizando cinco réplicas independientes para cada método.

#### **D.3.1. Método 1: Dilución alcalina de la muestra**

El objetivo de este método<sup>29</sup> es realizar un análisis multielemental de sangre mediante una simple dilución de la muestra. De esta manera se evita la digestión ácida mediante microondas, disminuyendo el tiempo de análisis, el coste y el riesgo de contaminación. Para ello, todas las muestras y patrones fueron diluidos 1:20 usando una disolución alcalina que contenía aproximadamente 0.7 mM de amonio, 0.01 mM de EDTA, 0.07% (v/v) de Tritón X-100 y 1.5 % (v/v) de butanol.

La función de estos reactivos es la siguiente:

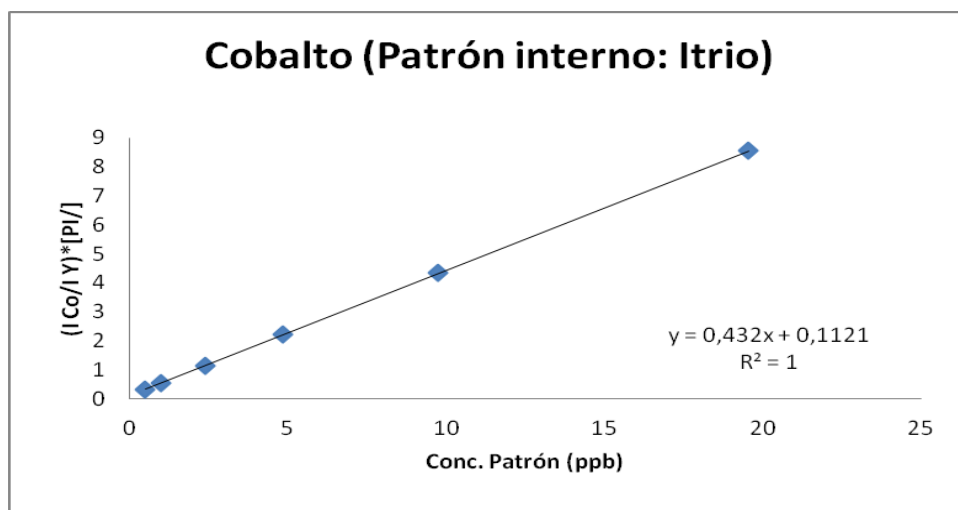
- Amonio y EDTA proporcionan una estabilidad temporal de al menos 48 h a la solución diluida de la sangre<sup>31</sup>. La función del amonio es proporcionar un medio básico a la muestra y evitar que precipiten las proteínas mientras que el EDTA tiene como función evitar la precipitación de los metales en medio básico.
- El Butanol tiene como función proporcionar una fuente de C estable dentro de la muestra que minimice los efectos de matriz entre los estándares y las muestras. De este modo, la ionización de los elementos se mantiene constante y se incrementa la precisión de analitos como As y Se, cuya ionización en el plasma está afectada por el contenido de C.
- El Tritón X-100 es un tensoactivo que tiene como función homogeneizar la muestra y prolongar los tiempos de muestreo de la sangre más de 30 minutos sin obturar el nebulizador Meinhard<sup>30</sup>.

**D.3.1.1. Tratamiento de resultados**

Debido a la mayor complejidad del procedimiento de preparación de muestra utilizado para las muestras de sangre no se realizaron calibrados en presencia de matriz. Por tanto, la selección de los patrones internos se realizó preparando calibrados en la disolución alcalina en presencia de todos los reactivos descritos anteriormente.

Tomando como criterio la diferencia de masa entre analito y patrón interno se escogió Bi como patrón interno para el Tl, Pb y para el resto de los elementos se escogió Y como patrón interno

De esta manera, se representó para cada elemento la relación de su intensidad respecto a la del patrón interno por la concentración de este último, frente a la concentración de analito. Como ejemplo, en la Figura 11 se muestra la recta de calibrado para el Co.



**Figura 11.** Representación de la recta de calibrado para el Co empleando Y como patrón interno, para el método de dilución alcalina de sangre.

De igual manera se hace lo mismo para el resto de los elementos analizados, recogiendo cada recta de calibrado y coeficiente de correlación en la tabla 9.

**Tabla 9.** Rectas de calibrado y el coeficiente de correlación para cada elemento analizado por el método de dilución alcalina de sangre.

	Rectas de calibrado	R <sup>2</sup>
Be	$y = 0,022 x + 0,000$	0,999

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Cr</b>	$y = 0,598 x + 0,186$	1
<b>Co</b>	$y = 0,432 x + 0,112$	1
<b>Ni</b>	$y = 0,108 x + 0,016$	0,999
<b>As</b>	$y = 0,165 x + 0,000$	1
<b>Se</b>	$y = 0,023 x + 0,003$	0,999
<b>Cd</b>	$y = 0,089 x + 0,006$	0,999
<b>Tl</b>	$y = 0,726 x + 0,013$	1
<b>Pb</b>	$y = 0,184 x + 0,026$	0,999
<b>U</b>	$y = 0,347 x - 0,055$	0,999

Utilizando estas rectas de calibrado se procedió a cuantificar los elementos incluidos en la Tabla 9 en una muestra real de sangre humana. Las concentraciones que calcularon según la Ecuación [5] de la siguiente manera:

$$C_{\text{elemento}} = y_m \pm \tau \cdot S \quad [5]$$

Donde:  $y_m \equiv$  media de la concentración del elemento.

$\tau \equiv$  t de Student, donde para una probabilidad del 95% y n=5 réplicas, es 2.571.

$S \equiv$  desviación estándar de la concentración del elemento.

Las concentraciones obtenidas para cada elemento se representan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Concentración de los elementos analizados por el método de dilución alcalina en una muestra de sangre humana. La incertidumbre de los resultados se expresa al 95% de confianza.

	<b>Concentración (ng·g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Be</b>	0,20 ± 0,07
<b>Cr</b>	2,43 ± 0,41
<b>Co</b>	< LOD
<b>Ni</b>	5,96 ± 1,66
<b>As</b>	1,68 ± 0,28
<b>Se</b>	89,24 ± 3,22
<b>Cd</b>	< LOD
<b>Tl</b>	< LOD
<b>Pb</b>	3,19 ± 0,16
<b>U</b>	3,32 ± 0,21

### **D.3.1.2. Cálculo de límites de detección**

El cálculo de los límites de detección se realizó mediante la medida de diez blancos utilizando las rectas de calibrado de la Tabla 9. En este cálculo se tuvo en cuenta que las muestras de sangre se diluyeron 1:20 debido a la adición de la disolución alcalina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 11.** Límites de detección para los elementos analizados por el método de dilución alcalina de sangre.

	LOD (ng·g <sup>-1</sup> )
<b>Be</b>	0,38
<b>Cr</b>	5,93
<b>Co</b>	0,24
<b>Ni</b>	5,34
<b>As</b>	2,05
<b>Se</b>	4,50
<b>Cd</b>	0,17
<b>Tl</b>	0,06
<b>Pb</b>	0,63
<b>U</b>	0,02

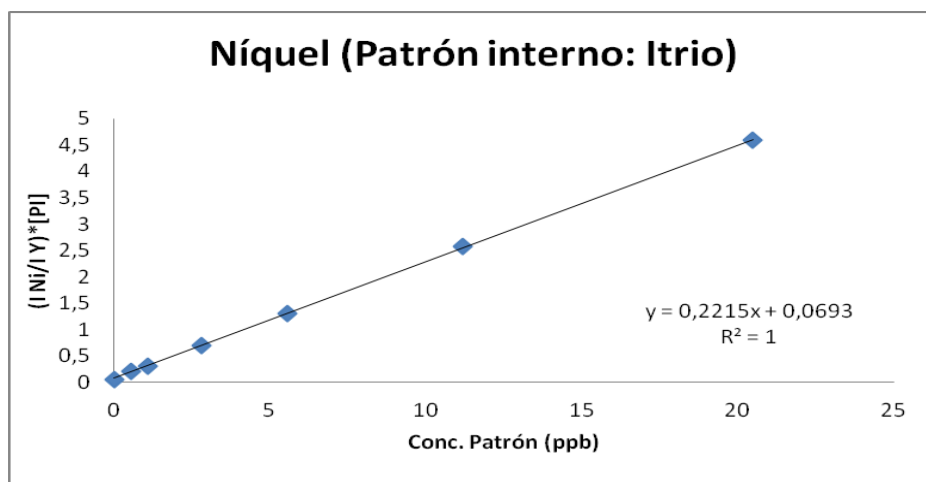
### D.3.2. Método 2: Digestión en microondas

Este método se basa en el ataque por microondas de la matriz de la muestra tras la adición de HNO<sub>3</sub> al 65 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se indica en la sección C.1.2.4.

#### D.3.2.1. Tratamiento de resultados

De un modo análogo al método 1 no se realizaron calibrados en presencia de matriz. Por tanto, la selección de los patrones internos se realizó preparando calibrados en la disolución acida empleada en la digestión por microondas.

Se representó para cada elemento la relación de su intensidad respecto a la del patrón interno por la concentración de este último, frente a la concentración del patrón. Como ejemplo, en la Figura 12 se muestra la recta de calibrado para el Ni.



**Figura 12.** Representación de la recta de calibrado para el Ni empleando Y como patrón interno, para el método de digestión en microondas de sangre.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De igual manera se hace lo mismo para el resto de los elementos analizados, recogiendo cada recta de calibrado y coeficiente de correlación en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Rectas de calibrado y el coeficiente de correlación para cada elemento analizado por el método de digestión en microondas de sangre.

	<b>Rectas de calibrado</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Be</b>	$y = 0,013 x + 6e-05$	0,999
<b>Cr</b>	$y = 0,542 x + 0,031$	1
<b>Co</b>	$y = 0,870 x + 0,053$	0,999
<b>Ni</b>	$y = 0,221 x + 0,069$	1
<b>As</b>	$y = 0,042 x + 0,002$	0,999
<b>Se</b>	$y = 0,004 x + 0,003$	0,999
<b>Cd</b>	$y = 0,146 x + 0,003$	1
<b>Tl</b>	$y = 0,625 x + 0,005$	1
<b>Pb</b>	$y = 0,441 x + 0,064$	1
<b>U</b>	$y = 0,918 x - 0,051$	0,999

Utilizando estas rectas de calibrado se procedió a cuantificar los elementos incluidos en la Tabla 12 según la Ecuación [5] en la misma muestra real de sangre humana que se analizó empleando el método de la dilución alcalina . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Concentración de los elementos analizados por el método digestión en microondas de sangre. La incertidumbre de los resultados se expresa al 95% de confianza.

	<b>Concentración (ng·g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Be</b>	0,17 ± 0,22
<b>Cr</b>	1,57 ± 0,88
<b>Co</b>	< LOD
<b>Ni</b>	9,47 ± 2,90
<b>As</b>	0,92 ± 0,15
<b>Se</b>	155,72 ± 9,74
<b>Cd</b>	0,56 ± 0,05
<b>Tl</b>	< LOD
<b>Pb</b>	3,29 ± 4,62
<b>U</b>	1,22 ± 1,35

### **D.3.2.2. Cálculo de límites de detección**

El cálculo de los límites de detección se realizó mediante la medida de diez blancos utilizando las rectas de calibrado de la Tabla 13. En este cálculo se tuvo en cuenta que las muestras de sangre se diluyeron 1:10. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

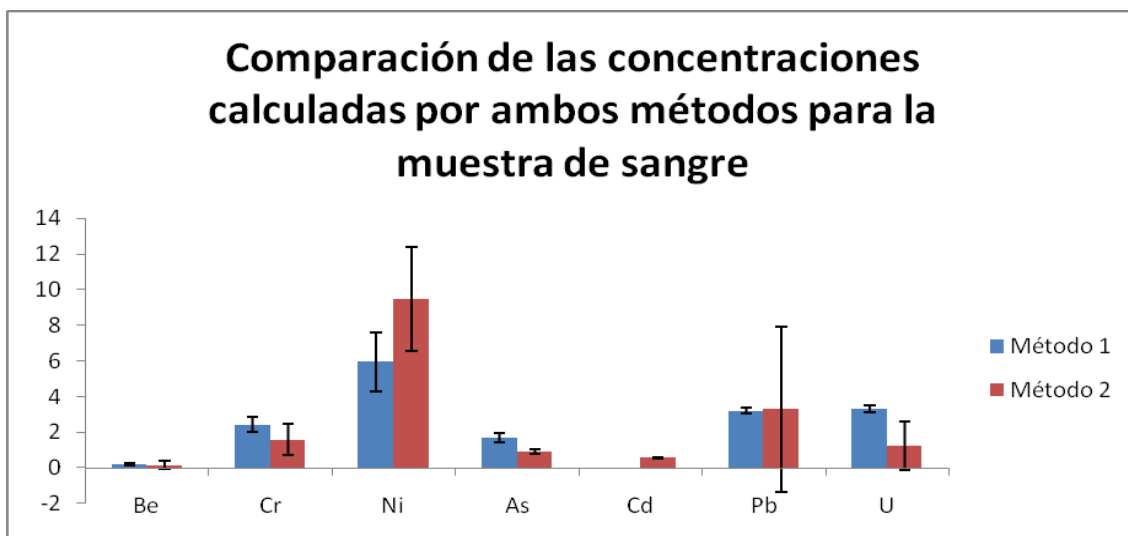
**Tabla 14.** Límites de detección para los elementos analizados por el método digestión en microondas de sangre.

	LOD (ng·g <sup>-1</sup> )
<b>Be</b>	0,32
<b>Cr</b>	2,78
<b>Co</b>	0,23
<b>Ni</b>	25,97
<b>As</b>	0,42
<b>Se</b>	10,65
<b>Cd</b>	0,74
<b>Tl</b>	0,13
<b>Pb</b>	5,67
<b>U</b>	0,13

Observamos que para el Ni, Se y Pb se obtienen límites de detección altos debido a que las piezas del equipo de agua ultrapura y los conos del ICP-MS contienen materiales de Ni, . En el caso del Se las interferencias espectrales aumentan el límite de detección y en el caso del Pb el valor obtenido, se debe a una contaminación en las bombas de teflón por residuos mal eliminados de ataques anteriores. En comparación con el método 1, la digestión por microondas proporciona límites de detección similares para el Be y Co y mejores límites de detección para el resto de elementos excepto para el As y el Cr.

### ***D.3.2.3. Comparación de los métodos***

En la Figura 13 se comparan los resultados de las concentraciones calculadas para cada elemento analizado por el método de dilución alcalina (método 1) y por el método de digestión por microondas (método 2).



**Figura 13.** Comparación de las concentraciones obtenidas para los diferentes elementos analizados (excepto el Se), por el método de dilución alcalina y por el método de digestión en microondas en la muestra de sangre estudiada.

Para todos los elementos excepto para el As, Se y U no se observan diferencias significativas entre los dos métodos al 95% de confianza. La determinación de As y Se por el método de dilución alcalina puede resultar menos fiable debido a la posible formación de especies volátiles de estos elementos o a la diferencia en su eficiencia de ionización debido a la presencia de C. Como se puede observar en la Figura 13, el método de la dilución alcalina proporciona resultados más precisos, especialmente para el Pb y el U. La gran incertidumbre asociada a la concentración de estos dos elementos obtenida por el método 2 puede ser debida a problemas de contaminación en las bombas utilizadas en la digestión.

## **E. CONCLUSIONES**

### E. CONCLUSIONES

A partir de los estudios realizados en el presente Proyecto Fin de Máster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el análisis de sueros por ICP-MS, la determinación de los elementos traza Cr, Co, Ni y Tl no presentan problemas de interferencias de matriz, por lo que su determinación fiable no requiere el uso del método de adiciones estándar.
- En el análisis de orinas por ICP-MS, la determinación de los elementos traza Be, Cr, Co, Tl y Pb no presentan problemas de interferencias de matriz, por lo que su determinación fiable no requiere el uso del método de adiciones estándar.
- En el análisis de sangre por ICP-MS, la digestión por microondas proporciona límites de detección similares para el Be y Co y mejores límites de detección para el resto de elementos excepto para el As y el Cr en comparación con el método de la dilución alcalina.
- El método de la dilución alcalina proporcionó resultados más precisos en el análisis de muestras de sangre humana. Además evita el ataque con el microondas y consecuentemente al no emplear bombas, se eliminan problemas de contaminación por mal aclarado de las mismas, aunque el uso de Tritón para la disolución alcalina, genera una espuma, que dificulta la preparación de las muestras a la hora de hacer las pesadas.

## **F. BIBLIOGRAFÍA**

## F. BIBLIOGRAFÍA

<sup>1</sup> Mertz W., *Science*, 18, (1981), 1332-1338,

<sup>2</sup> Camner P., Clarkson T. y Nordberg G. F. en “*Handbook on the toxicology of Metals*”, (1980), 65-97.

<sup>3</sup> Yergey A. L., *J. Nutr.*, 126, (1996), 355S-361S.

<sup>4</sup> Savory J. y Wills M. R., *Clin. Chem.*, 38/8, (1992), 1565-1573.

<sup>5</sup> Caroli S., Alimonti A., Coni E., Petrucci F., Senofonte O. y Violante N., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24 (5&6), (1994), 363-398.

<sup>6</sup> Alimonti A., Petrucci F., Fioravanti S., Laurenti F. y Caroli S., *Anal. Chim. Acta*, 342, (1997), 75-81.

<sup>7</sup> Bertam C., Brandt R., Jakubowski N., Amend M., *Trace elements and electrolytes*, 21 (3), (2004), 159-167.

<sup>8</sup> Viau C., Lafontaine M., Payam J.P., *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 77 (3), (2004), 177-185.

<sup>9</sup> Cornelis R., Heinzow B., Herber R. F. M., Molin Christensen J., Poulsen O. M., Sabbioni E., Templeton D. M., Thomassen Y., Vahter M. y Vestermberg O., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 10, (1996), 103-127.

<sup>10</sup> Cornelis R., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 6, (1992), 129-135.

<sup>11</sup> Komaromy-Hiller G., *Anal. Chem.*, 71, (1999), 338R-342R.

<sup>12</sup> Erickson B. E., *Anal. Chem.*, (2000), 543A-546A.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>13</sup> Polzik L.K., Begak O. Yu., Borodin A.V., Novochiklin A.V., *Industrial Laboratory*, 64 (12), (1998), 777-781.
- <sup>14</sup> Nuttall K. L., Gordon W. H. y Owen Ash K., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 25, 3, (1995), 264-271.
- <sup>15</sup> Krachler M., e Irgolic K. J., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 13, (1999), 157-169.
- <sup>16</sup> Becker J.S., Sela H., Dobrowolska J., Zoriy M., *International J. Mass Spectrometry*, 270 (1-2), (2008), 1-7.
- <sup>17</sup> Kawamoto K., Takada Y., Tanaka Y., Akaboshi M., *J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 242 (2), (1999), 527-530.
- <sup>18</sup> De Blas Braco I., Sanz Castro R., López Riquelme N., Tormo Díaz C., Apraiz Goyenaga D., *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, 21 (suppl 1), (2007) 14-17.
- <sup>19</sup> Hutton R. C. y Eaton A. N., *J. Anal. At. Spectrom*, 3, (1988), 547-550.
- <sup>20</sup> Vanhoe H., Vandecasteele C., Versieck J. y Dams R., *Anal. Chem.*, 61, (1989), 1851-1857.
- <sup>21</sup> Barany E., Bergahld I. A., Schütz A., Skerfving S. y Oskarsson A., *J. Anal., At., Spectrom.*, 12, (1997), 1005-1009.
- <sup>22</sup> González M.H., Souza G.B., Oliviera R.V., Forato L.A., Lóbrega J.A., Nogueira A.R.A., *Talanta*, 79 (2), (2009), 396-40.
- <sup>23</sup> Alimonti A., Petrucci F., Laurenti F., Papoff P. y Caroli S., *Clin. Chem. Acta*, 292, (2000), 163-173.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>24</sup> Moens L., Verrept P., Dams R., Greb U., Jung G. y Laser B., *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, (1994), 1075-1078.
- <sup>25</sup> Barbante C., Cozzi G., Capodaglio G. y Cescon P., *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, (2000), 377-382.
- <sup>26</sup> Weis D., Kieffer B., Maerschalk C., Barling J., De Jong J., *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 7 (8), (2006), Q08006.
- <sup>27</sup> Chiung-Sheng Hsiung, Joseph D. Andrade, Robert Costa, and K. Owen Ash. *Clin. Chem.* 43:12, (1997), 2303-2311.
- <sup>28</sup> Skoog, Holler, Nieman. *Principios de Análisis Instrumental. McGraw Hill*, (2001), 20.
- <sup>29</sup> R. Whalen, L. Evans, J. Turner, and R.Hearn. *Application note of Agilent Technologies*, 5989-2885EN, (2005).
- <sup>30</sup> H. Trevor Delves and Michael J. Campbell. *Chem. Pathology and Human Metabolism*, SO9 4XY, Vol.3, (1988), 345.
- <sup>31</sup> Shutter, I. L., and Delves, H. T., *Analyst*, (1986), 111, 541.