



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE VANADIO Y MANGANESO EN
MATRICES BIOLÓGICAS MEDIANTE ICP-MS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

RAFAEL LEÓN ZÁRATE



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Liliana Virginia Raquel Saldívar y Osorio

VOCAL: Dr. Ciro Eliseo Márquez Herrera

SECRETARIO: Q. Nadia Marcela Munguia Acevedo

1er. SUPLENTE: M. en C. Araceli Tovar Tovar

2° SUPLENTE: Q.F.B. María Guadalupe Espejel Maya

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 103 DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (LEAA), DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



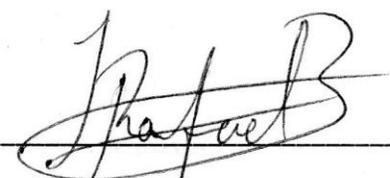
DRA. LILIANA VIRGINIA RAQUEL SALDÍVAR Y OSORIO

SUPERVISOR TÉCNICO:



Q.F.B. MARÍA GUADALUPE ESPEJEL MAYA

SUSTENTANTE:



RAFAEL LEÓN ZÁRATE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivos generales.....	2
2.2 Objetivos particulares.....	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Manganeso.....	3
3.1.1 Manganeso, un metal esencial.....	3
3.1.2 Distribución de Mn en el cuerpo humano.....	3
3.1.3 Propiedades físicas del manganeso.....	4
3.2 Vanadio.....	4
3.2.1 Vanadio, un metal tóxico.....	4
3.2.2 Vanadio, propiedades y usos.....	5
3.3 Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción.....	5
3.3.1 Consideraciones generales.....	5
3.3.2 Fundamento teórico y funcionamiento general.....	7
3.3.3 Componentes del Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción.....	9
3.3.3.1 Sistema de introducción de muestra.....	9
3.3.3.1.1 Nebulizadores.....	9
3.3.3.1.2 Cámaras de nebulización.....	10
3.3.3.2 Fuentes de ionización.....	11
3.3.3.2.1 Plasma Acoplado por Inducción.....	12
3.3.3.3 Sistema analizador de iones.....	15
3.3.3.3.1 Analizador de masas cuadrupolar.....	15

3.3.3.4 Sistema de detección de iones.....	19
3.3.3.4.1 Multiplicador de Electrones Secundarios.....	19
3.4 Desventajas en la determinación de metales traza por ICP – MS.....	20
3.4.1 Interferencias.....	20
3.4.1.1 Interferencias isobáricas.....	21
3.4.1.2 Interferencias poliatómicas.....	21
3.4.1.3 Interferencias no espectrales.....	21
3.4.2 Deriva instrumental.....	22
3.5 Preparación de muestra.....	23
3.5.1 Descomposición de muestra.....	23
3.6 Calidad del método analítico.....	24
3.7 Parámetros de desempeño.....	25
4. EXPERIMENTACIÓN.....	27
4.1 Material y reactivos.....	27
4.2 Equipos e instrumentos.....	28
4.3 Procedimiento experimental general.....	28
4.3.1 Lavado de material.....	29
4.3.2 Tratamiento físico del Material de Referencia Certificado y de las muestras.....	30
4.3.2.1 Tratamiento químico del Material de Referencia Certificado (1577c, NIST).....	31
4.3.2.2 Tratamiento químico de las muestras.....	32
4.3.3 Dilución gravimétrica.....	34
4.3.4 Cuantificación de analitos mediante ICP-MS.....	36
4.3.4.1 Elección de los isótopos de los analitos.....	36
4.3.4.2 Tratamiento de datos.....	37

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 Condiciones instrumentales de análisis.....	37
5.2 Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ).....	39
5.3 Intervalo lineal.....	41
5.4 Intervalo de trabajo.....	44
5.5 Recuperación.....	49
5.6 Selectividad.....	51
5.7 Exactitud.....	52
5.7.1 Veracidad.....	52
5.7.2 Precisión.....	52
5.8 Sensibilidad.....	53
5.9 Robustez.....	54
5.10 Deriva instrumental.....	57
5.11 Aplicación del método analítico desarrollado en muestras reales.....	59
6. CONCLUSIONES	69
ANEXO I	72
ANEXO II	77
ANEXO III	78
7. BIBLIOGRAFÍA	81

1. INTRODUCCIÓN.

Los alimentos que consumimos los seres humanos están compuestos, principalmente, por seis tipos de nutrientes básicos (carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y agua) y cada uno de ellos cumple con funciones muy importantes dentro de nuestro organismo ⁽¹⁾. Cada uno de estos nutrientes se encuentran en diferentes cantidades en el cuerpo humano y dependiendo de su concentración, éstos, se clasifican en macronutrientes y micronutrientes ⁽²⁾. De esta forma se tienen específicamente a los microminerales u oligoelementos, es decir, aquellos elementos químicos que tienen un papel muy específico dentro de las funciones del cuerpo humano y que están en cantidades muy pequeñas (su consumo diario recomendado es menor a 100 mg /día) ⁽³⁾. Dentro de estos oligoelementos se encuentran el hierro, cobre, manganeso, molibdeno, yodo, cobalto, cromo y el selenio ⁽⁴⁾. La concentración de estos oligoelementos es fundamental para que desempeñen adecuadamente su papel biológico ya que el exceso o déficit del metal puede ocasionar complicaciones graves.

Por otra parte, los alimentos no son la única vía entrada de elementos químicos a nuestro cuerpo, diversas actividades humanas provocan la liberación de metales tóxicos en el ambiente; tal es el caso del vanadio, plomo, cromo y el mercurio. Estos metales tóxicos tienen diversos efectos tanto en los seres humanos como en los animales aún en pequeñas concentraciones, así por ejemplo, se sabe que la mayoría de éstos son carcinógenos, genotóxicos y mutagénicos ⁽⁵⁾.

Las pequeñas concentraciones en las que se encuentran los micronutrientes y algunos metales tóxicos en el organismo, aunado al perjuicio que provocan las pequeñas variaciones de concentración, hacen que su determinación analítica sea una tarea muy importante y difícil pero que ha podido ser llevada a cabo gracias al desarrollo de equipos de alta tecnología y metodologías analíticas adecuadas. La determinación de elementos individuales puede ser llevada a cabo a través de varias técnicas de Espectroscopia Atómica (EA) ya sean de absorción o de emisión, las cuales difieren, principalmente, en la sensibilidad, los volúmenes de muestra necesarios para el análisis y el costo. Actualmente muchos laboratorios, alrededor del mundo, están usando el Espectrómetro de Masas - Plasma Acoplado por Inducción, ICP-MS (por sus siglas en inglés), para la determinación de metales traza, pues a diferencia de las técnicas convencionales de análisis, ésta, puede llevar a cabo la determinación de varios elementos a la vez. Esta técnica de determinación multielemental no sólo presenta límites de detección mucho más bajos que las técnicas de Espectroscopia Atómica (EA) sino que también ofrece la capacidad de medidas isotópicas ⁽¹³⁾.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivos generales.

- Desarrollar la metodología analítica para la determinación de vanadio y manganeso en matrices biológicas empleando el Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción (ICP – MS).
- Evaluar el método analítico desarrollado.
- Emplear el método analítico desarrollado en muestras reales.

2.2 Objetivos particulares.

- Optimizar el tratamiento físico y químico de las muestras y el material de referencia certificado (MRC).
- Aplicar el método gravimétrico en la preparación de las curvas de calibración y dilución de las muestras para su análisis por ICP-MS.
- Minimizar los contaminantes presentes en el material de laboratorio utilizado, mediante un tratamiento de limpieza.
- Conocer el adecuado funcionamiento del ICP-MS.
- Optimizar la metodología analítica empleando el ICP-MS.
 - Variar el flujo del gas nebulizador para lograr los mejores parámetros de lectura.
 - Preparar curvas de calibración de V y Mn, con diferentes estándares internos (E.I.), adecuadas para el Material de Referencia Certificado (MRC) y las muestras.
 - Utilizar el método del estándar o patrón interno para la determinación de los analitos en Material de Referencia Certificado (MRC) para determinar las mejores condiciones, tanto analíticas como instrumentales, de trabajo.
- Evaluar la metodología analítica desarrollada a través de los siguientes parámetros:
 - Límite de detección.
 - Límite de cuantificación.
 - Intervalo lineal.
 - Intervalo de trabajo.
 - Exactitud.
 - *- Veracidad.
 - *- Precisión.
 - Sensibilidad.
 - Recuperación (Utilizando Materiales de Referencia Certificados, MRC).
 - Selectividad.
 - Robustez.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Manganeso.

3.1.1 Manganeso, un metal esencial.

El manganeso (Mn) es un metal traza esencial que se encuentra en todos los tejidos del cuerpo humano y es requerido para el metabolismo de los aminoácidos. El Mn es cofactor de diversas enzimas. Entre las familias de enzimas que son dependientes del Mn se encuentran: las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, isomerasas, liasas y las ligasas. Entre las metaloenzimas de Mn destacan la arginasa, glutamino sintetasa, fosfoenilpiruvato descarboxilasa y la superóxido manganeso dismutasa. El Mn está involucrado en las funciones de numerosos órganos del cuerpo humano. El Mn es necesario para la función inmune, la regulación del azúcar en la sangre, la regulación de la energía celular, la reproducción, digestión, crecimiento de los huesos y ayuda en los mecanismos de defensa contra los radicales libres. El Mn en conjunto con la vitamina K apoyan la coagulación de la sangre y la homeostasis.

El Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos estimó, como seguro y adecuado, el consumo de 2-5mg/día de Mn en adultos. Una ingesta insuficiente de Mn puede provocar deterioro en el crecimiento, crecimiento retardado y mal formación de los huesos, fertilidad reducida, defectos de nacimiento y una alteración del metabolismo de lípidos y carbohidratos.

La fuente principal de Mn para los seres humanos son los alimentos y entre los que tienen mayor cantidad se encuentran los cereales, arroz y nueces (~ 30 mg/kg), otro alimento rico en Mn es el té (0.4 – 1.3 mg/taza). En las dietas infantiles la principal fuente de Mn es la leche ya sea materna, de vaca o de soya las cuales contienen 3 – 10 mg/L, 30-50 mg/L y 200 – 300 mg/L, respectivamente ⁽⁷⁾.

3.1.2 Distribución de Mn en el cuerpo humano.

Del Mn total que entra al cuerpo a través de los alimentos, sólo entre el 1 y 5% es absorbido a nivel del intestino, el resto del Mn se excreta vía el tracto biliar. En el tracto intestinal la absorción de Mn está mediada por la Transportadora Metálica Divalente 1 (DMT-1, por sus siglas en inglés) y es influida por la presencia de otros metales traza y del ácido ascórbico además de tener una competencia importante con el hierro (Fe).

La concentración “normal” de Mn en los tejidos mamíferos es de 0.3 – 2.9 µg/g en peso de tejidos húmedos. Tejidos con alta demanda energética (el cerebro) y alto contenido de pigmentos (la retina y la piel oscura) tienen las concentraciones de Mn más altas. También los huesos, el hígado, páncreas y el riñón tienen altas concentraciones de Mn ⁽⁷⁾.

3.1.3 Propiedades físicas del manganeso.

El manganeso es un metal de transición, es muy duro y tiene un color parecido al del hierro. Este elemento tiene un número atómico de 25 y una masa atómica de 54.9380 u.m.a. (es el único isótopo estable). Su símbolo químico es Mn y tiene la siguiente configuración electrónica: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^5$. Tiene un radio iónico (+2) de 0.080 nm, un radio covalente de 0.117 nm y un radio metálico de 0.124 nm. La primera energía de ionización (E.I.) del manganeso es de 737.7 KJ/mol ⁽⁸⁾.

25	2
	8
Mn	13
	2
Manganeso	
54,938045	

Ilustración 1. Símbolo químico del manganeso.

3.2 Vanadio.

3.2.1 Vanadio, un metal tóxico.

El vanadio es un metal ampliamente distribuido en la corteza terrestre y en los sistemas biológicos. Participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es micronutriente para varias especies marinas y terrestres. Para los humanos no se ha comprobado su esencialidad pero se recomienda una ingesta aproximada a 15µg/día. El vanadio es considerado un contaminante ambiental, su liberación a la atmósfera es principalmente por la actividad humana. De las 64 mil toneladas anuales que se liberan a la atmósfera más del 90% son producto de la actividad industrial, la quema de combustibles fósiles (petróleo y carbón), emisiones volcánicas e incendios forestales ⁽⁹⁾. La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de la bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos produce cambios en el ritmo cardiaco. Los estudios de los efectos de diferentes metales en el aire urbano sobre la población, mostraron que los niveles de vanadio en las partículas suspendidas en el aire se correlacionan con la incidencia en enfermedades cardiovasculares. Las investigaciones sobre el papel biológico del vanadio han cobrado mucha importancia recientemente debido a que el vanadio es potencialmente tóxico, genotóxico y mutagénico para una gran variedad de sistemas biológicos. Recientemente se han agregado compuestos de vanadio a las listas de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (2006) como posibles carcinógenos (pentóxido de vanadio, entre otros) para los humanos ⁽⁵⁾. A nivel celular (células de mamífero, tanto *in vivo* como *in vitro*) se ha comprobado que los compuestos de vanadio

tienen efectos mutagénicos y genotóxicos por lo que algunos autores consideran al vanadio como un mutagénico débil.

3.2.2 Vanadio, propiedades y usos.

El vanadio es un metal grisáceo, tiene un número atómico de 23, una masa atómica de 50.9415 u.m.a y su configuración electrónica es: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^3$. El vanadio existe en varios estados de oxidación, sin embargo, sólo el vanadio +3, +4 y +5 tienen funciones biológicas reconocidas ⁽⁹⁾. Su símbolo químico es V, tiene un radio iónico (+5) de 0.059 nm, un radio covalente de 0.122 nm y un radio metálico de 0.1321 nm. La primera energía de ionización del V es de 650.9 KJ/mol ⁽⁸⁾.

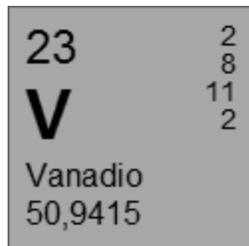


Ilustración 2. Símbolo químico del vanadio.

Para los procesos industriales el vanadio se obtiene de los minerales cuprodesclocita, desclocita, patronita, roscoelita, vanadita, etc, estos minerales generalmente contienen vanadio +5, +4 y +3. El vanadio también se encuentra en forma de complejos metálicos y organometálicos en los petróleos crudos y materiales fósiles. Los petróleos americanos son los que contienen una mayor cantidad de vanadio. El principal uso del vanadio es en la industria metalúrgica donde se elaboran aleaciones de este metal con otros como el titanio, aluminio, boro, níquel, manganeso, cromo y tungsteno ⁽⁹⁾.

3.3 Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción.

3.3.1 Consideraciones generales ⁽¹¹⁾.

La Espectrometría de Masas (EM) es una de las técnicas analíticas más importantes hoy en día para la determinación de concentraciones de diversos elementos (especialmente para los que se encuentran en cantidades de trazas y ultra trazas) y para análisis isotópico Este tipo de análisis se puede llevar a cabo, gracias a que los espectrómetros de masas, poseen gran sensibilidad, bajos límites de detección y cuantificación así como la posibilidad de analizar volúmenes de muestra pequeños.

La espectrometría de masas está basada en las propiedades físicas del núcleo atómico. El núcleo atómico, de cualquier elemento, está formado por protones y

neutrones. Los protones tienen una masa de 1.67262×10^{-27} kg y una carga positiva de $1.60217733 \times 10^{-19}$ C ⁽¹⁰⁾. La cantidad de protones en un núcleo determina las propiedades químicas del átomo así como su posición en la tabla periódica, el número de protones que cada átomo posee se llama número atómico (Z) y para escribirlo se antepone como subíndice al símbolo del elemento químico (ejemplo: ${}^1\text{H}$, ${}^6\text{C}$, ${}_{26}\text{Fe}$ o ${}_{92}\text{U}$). Los protones junto con los neutrones se encuentran en el núcleo atómico, estos últimos no tienen carga, su masa es de 1.67493×10^{-27} kg y estabilizan el núcleo atómico positivo. La suma del número atómico (Z) y del número de neutrones (N) en el núcleo proporcionan la masa atómica (A) y para escribirla se antepone como superíndice al símbolo del elemento químico (ejemplo: ${}^1\text{H}$, ${}^{12}\text{C}$, ${}^{25}\text{Cl}$, ${}^{56}\text{Fe}$ o ${}^{238}\text{U}$).

$$A = Z + N \quad \text{ecuación 1}$$

Dado lo anterior podemos identificar isótopos de diversos elementos, es decir, átomos con el mismo número de protones (Z) pero diferente número de neutrones (N) y por tanto diferente masa atómica (A) (ejemplo: ${}^1\text{H}$ y ${}^2\text{H}$, ${}^{35}\text{Cl}$ y ${}^{37}\text{Cl}$) y aunque tiene las mismas propiedades químicas pueden diferenciarse por su masa atómica ⁽¹¹⁾. Para elementos monoisotópicos, es decir, que sólo poseen un isótopo estable con una abundancia del 100%, la masa del isótopo es igual a la masa atómica. Para elementos con más de un isótopo, la masa atómica es un promedio ponderado de las masas de los diferentes isótopos naturales.

A través de la Espectrometría de Masas, la masa de átomos y moléculas puede ser determinada gracias a la medición del cociente masa/carga (m/z). En este tipo de experimentos la carga del ión (z) (atómico o poliatómico) es +1 unidad elemental de carga (e, carga del electrón o protón) y la masa corresponde a la masa atómica (A) o a la suma de masas atómicas, en el caso de ser un ión poliatómico. Por lo anterior, la masa de átomo o molécula no es medida en gramos o kilogramos, sino en múltiplos de la unidad de masa atómica (m_u). La cual se define como “un doceavo de la masa del átomo neutro ${}^{12}\text{C}$, $m_a({}^{12}\text{C})$, en su estado basal”.

$$m_u = 1u = \frac{m_a({}^{12}\text{C})}{12} \quad \text{ecuación 2}$$

Para el cálculo de la masa de un átomo, molécula o ión en kilogramos se utiliza la siguiente equivalencia, 1, para la constante de masa atómica, m_u .

$$m_u = 1\text{Da} = 1.6605402 \times 10^{-27} \text{kg} \quad \text{equivalencia 1}$$

Donde 1 Da es un Dalton, la unidad de masa atómica, m_u , también es llamada de esa forma. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en

inglés) propone ambas unidades, m_u y Da , para su uso en documentos oficiales. Una ventaja de la definición de unidad de masa, m_u , es que la masa de un átomo o molécula puede ser caracterizada por un número entero, masa atómica (A), el cual es igual al número de protones mas neutrones en el núcleo (ver ecuación 1). La masa de un átomo o masa atómica, m_a , puede ser calculada en kilogramos aproximadamente a través de la ecuación 3.

$$m_a \approx A * m_u \quad \text{ecuación 3}$$

Además, la unidad de carga elemental (e , carga del protón o electrón) se mide en Coulombs, C , y se define según la equivalencia 2.

$$e = 1.60217733 \times 10^{-19} C \quad \text{equivalencia 2}$$

En la Espectrometría de Masas la relación masa/carga (m/z) es, generalmente, medida como un número adimensional. A veces se utiliza la unidad conocida como Thomson (Th), en honor a J. J. Thomson.

Por otra parte, y en contraste con los isótopos elementales, los cuales contienen el mismo número de protones pero diferente número de neutrones, se encuentran los elementos isóbaros que poseen la misma masa atómica pero tiene diferente número de protones (lo que significa que son elementos químicos diferentes) por ejemplo: ^{40}Ca y ^{40}Ar ; ^{58}Fe y ^{58}Ni ; ^{92}Zr y ^{92}Mo ; ^{142}Nd y ^{142}Ce ; ^{204}Hg y ^{204}Pb ; y otros. No es difícil notar que los elementos isóbaros son un interferente potencial a la hora de hacer una determinación analítica mediante Espectrometría de Masas.

3.3.2 Fundamento teórico y funcionamiento general ⁽¹¹⁾.

Para estudiar el patrón isotópico (abundancias isotópicas en relación con los valores de m/z) el cual es diferente para cada elemento químico y para determinar la composición de cualquier tipo de muestra (muestras gaseosas, líquidas o sólidas), la espectrometría de masas es el método de elección. Los diferentes sistemas de Espectrometría de Masas para análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos usan el mismo principio básico. Un diagrama general de los espectrómetros de masas se presenta en la Ilustración 3. La muestra a ser analizada (gaseosa, líquida o sólida) es introducida en la fuente de ionización, hay diferentes formas de hacerlo, por ejemplo: los líquidos se introducen por nebulización de la solución y los sólidos se introducen por evaporización de la muestra. En la fuente de ionización (que opera a alto vacío, baja presión o presión atmosférica) la muestra es vaporizada, atomizada e ionizada. Los iones cargados positivamente son extraídos y acelerados desde la fuente de ionización hasta la entrada del sistema de separación de masas (analizador de masas) gracias a que la fuente de ionización normalmente se encuentra con un potencial positivo y la

entrada al sistema analizador tiene un potencial de cero. Después de la extracción, los iones tienen una energía potencial eV , donde V es la aceleración voltaica y e es la carga eléctrica de un ión monocargado ($z=1$), la cual es la misma que la carga elemental de un electrón. Toda la energía potencial de los iones es transformada completamente en energía cinética después de pasar a través de la entrada del analizador de masas. Si la energía inicial de los iones recibida tras su formación es muy pequeña en comparación con la energía de aceleración recibida tras la extracción, la ecuación 4 es válida debido al principio de conservación de la energía.

$$eV = \frac{1}{2}mv^2 \quad \text{ecuación 4}$$

Donde v es la velocidad de los iones y m es la masa del ión atómico o molecular. Esta ecuación fundamental explica que la velocidad de iones más pesados es menor que la de los iones más ligeros.

Los espectrómetros de masas son utilizados para la determinación de las masas absolutas de isótopos, pesos atómicos, abundancias relativas de isótopos y para la determinación analítica de elementos traza y ultratrazo ⁽¹¹⁾. Los iones monocargados positivamente, que son extraídos de la fuente de ionización y acelerados hacia el analizador de masas, son separados con base en su relación masa/carga (m/z). Los rayos iónicos separados de acuerdo a su masa son, subsecuentemente, grabados en un sistema detector de iones.

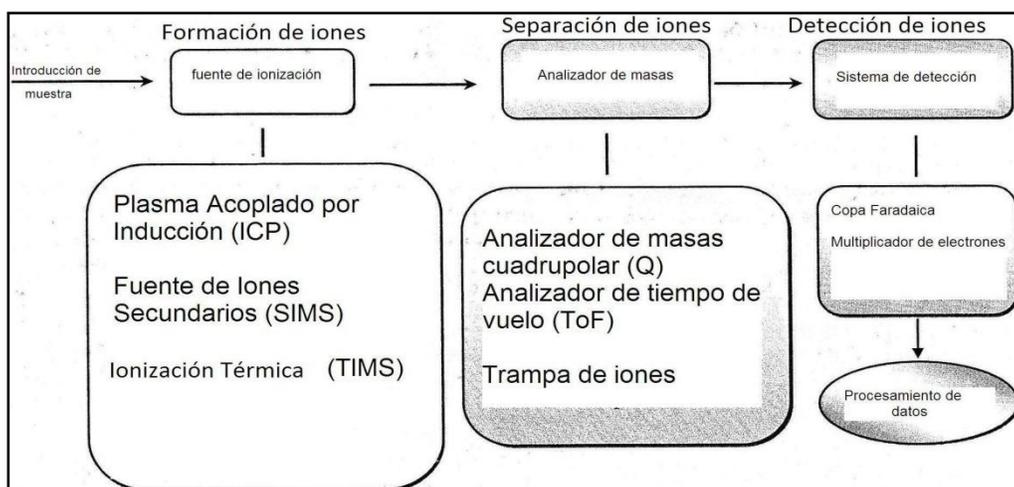


Ilustración 3. Diagrama Básico de un Espectrómetro de Masas. J. Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Página 4, Figura 1.1

Actualmente las investigaciones en Espectrometría de Masas están enfocadas en el mejoramiento de la instrumentación, en diferentes técnicas para reducir el volumen de

muestra, mejorar la sensibilidad y reducir los límites de detección. Una disminución de los volúmenes de muestra significa que también se reducen los desechos con el objetivo de desarrollar una “química verde”. Además, las nuevas técnicas analíticas involucran el desarrollo de procedimientos de cuantificación con exactitud y precisión analítica mejoradas. En el futuro se pondrá una atención especial en el desarrollo de técnicas basadas en espectrometría de masas que permitan un análisis con especiación y de análisis superficial con una resolución lateral mejorada, del orden de nm ⁽¹¹⁾.

3.3.3 Componentes del Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción.

Para describir con mayor facilidad un ICP-MS, se puede dividir el sistema en cuatro componentes principales: 1) sistema de introducción de muestras, 2) fuente de ionización, 3) sistema discriminador de iones y 4) sistema de detección.

3.3.3.1 Sistema de introducción de muestra ⁽¹¹⁾.

La introducción eficiente de una muestra al Plasma Acoplado por Inducción (ICP, por sus siglas en inglés) es crucial para la detección de elementos de diferentes concentraciones. Para muestras líquidas la combinación de un nebulizador y de una cámara de aerosol es la propuesta más común, pero este arreglo sólo permite que una pequeña porción de la muestra (< 2%) alcance el ICP.

3.3.3.1.1 Nebulizadores ⁽¹¹⁾.

Hay diferentes tipos de nebulizadores pero su principio de funcionamiento es esencialmente el mismo. Entre los más comunes se encuentran el nebulizador *concéntrico neumático* y el nebulizador de *flujo cruzado*.

En el nebulizador de flujo cruzado, la muestra líquida y el gas argón interactúan de manera perpendicular, el uno con respecto del otro. El nebulizador de flujo cruzado original consiste de dos tubos capilares posicionados a 90° uno respecto del otro y muy juntos, pero sin tocarse, según se muestra en la Ilustración 4. El gas acarreador, argón, fluye a través de un tubo capilar mientras que a través del otro tubo capilar se bombea la muestra líquida. En el punto de salida de los capilares, la fuerza de escape del gas

acarreador es suficiente para romper el flujo continuo de la muestra líquida y convertirla en un “aerosol grueso”.

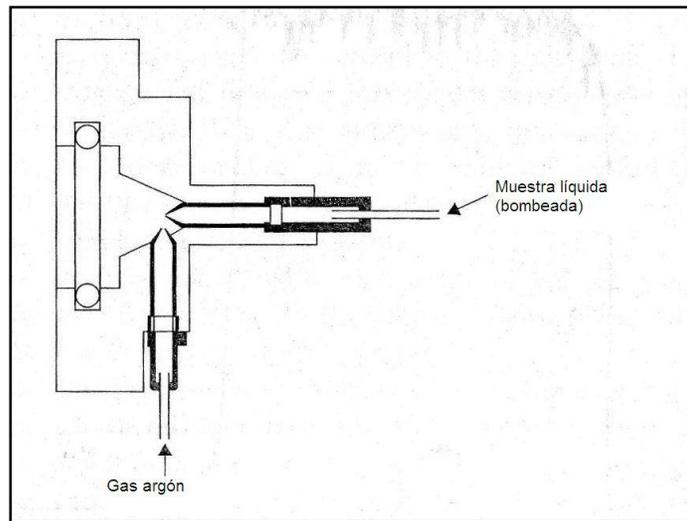


Ilustración 4. Diagrama del nebulizador de flujo cruzado. J. Dean. *PRACTICAL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROSCOPY*. Página 42, figura 3.2

3.3.3.1.2 Cámaras de nebulización ⁽¹¹⁾.

La introducción directa de los “aerosoles gruesos”, generados por los nebulizadores, al plasma extinguiría o produciría un enfriamiento del mismo, lo cual conduciría a severas interferencias de matriz. La incorporación de una cámara de nebulización tiene como consecuencia la producción de un aerosol más apropiado para ser introducido al plasma. Una cámara de nebulización tiene los siguientes efectos sobre el “aerosol grueso”: 1) reduce la cantidad de aerosol que alcanza el plasma, 2) disminuye el desorden de la muestra asociado con el proceso de nebulización y 3) reduce el tamaño de partícula del aerosol. Se ha determinado que el tamaño de partícula ideal para que los procesos ocurran en el plasma (atomización e ionización) es alrededor de $10\mu\text{m}$. Entre los diseños más usados se encuentran la cámara de *doble paso* o *tipo Scott* y la cámara *ciclónica*. La cámara de nebulización de *doble paso* está compuesta por dos tubos concéntricos, una entrada para el aerosol grueso que viene del nebulizador, una salida para el aerosol más fino y una salida de desechos. La Ilustración 5 representa una cámara de nebulización de este tipo. La cámara de nebulización tipo Scott se coloca de tal manera que permita que el líquido en exceso (aerosol condensado) fluya hacia la salida de desechos. El aerosol generado en el nebulizador es introducido en el tubo interno de la cámara y sale de ella hacia la antorcha del ICP. La interacción del aerosol grueso con la superficie interna de la cámara tipo Scott permite la producción de un aerosol más fino (por consiguiente, el líquido en exceso se desecha por el drenaje). Además de los

beneficios que una cámara de nebulización brinda, la cámara tipo Scott produce una estabilidad de señal más grande ⁽¹²⁾.

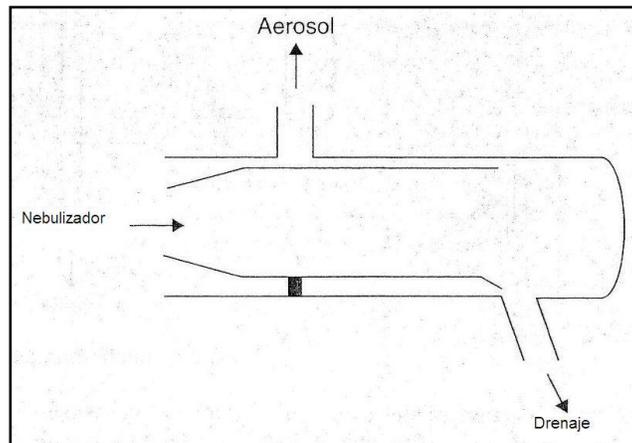


Ilustración 5. Diagrama de la cámara de nebulización de doble paso (tipo Scott). J. Dean. *PRACTICAL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROSCOPY*. Página 44, figura 3.5

3.3.3.2 Fuentes de ionización ⁽¹¹⁾.

La fuente de ionización es un componente esencial en todos los espectrómetros de masas, es el lugar donde la ionización de muestras sólidas, líquidas o gaseosas tiene lugar. En espectrometría de masas inorgánica, existen diversas fuentes de ionización las cuales están basadas en diferentes procesos de evaporación e ionización. Un requerimiento importante en análisis espectrométrico de cualquier muestra (sólida, líquida o gaseosa) es la producción de un rayo de iones constante de intensidad suficiente, generado en una fuente de ionización apropiada para los componentes de la muestra. Para el análisis de líquidos, el *Plasma Acoplado por Inducción* (que opera a presión atmosférica) es apropiado para la ionización de los analitos en la solución nebulizada gracias a que posee un sistema de introducción de muestra sencillo.

El proceso principal en la fuente de ionización de un espectrómetro de masas es la evaporación de muestras sólidas o desolvatación y vaporización de muestras líquidas, atomización de compuestos gaseosos e ionización de átomos y moléculas para generar iones que serán analizados mediante espectrometría de masas. Durante el proceso de ionización, se forman iones atómicos mono y multicargados, así como iones poliatómicos, en diferentes proporciones. En las fuentes de ionización se generan tanto iones positivos como negativos, pero en general se usan los iones monocargados positivamente con fines analíticos. Los iones poliatómicos generados en el proceso de ionización se convierten en un interferente importante (ArX^+ , $X=O, N, C$ o Ar en el ICP-MS y LA-ICP-MS).

3.3.3.2.1 Plasma Acoplado por Inducción ⁽¹¹⁾.

Una fuente de ionización como el Plasma Acoplado por Inducción se combina con un Espectrómetro de Masas para formar un ICP-MS, donde el ICP es la fuente de ionización. El plasma se encuentra a una presión atmosférica y se forma en un ambiente, casi, químicamente inerte de una corriente de gas noble. En la Ilustración 6 se representa una fuente de ionización del tipo Plasma Acoplado por Inducción, el cual incluye una antorcha de cuarzo y una bobina de alambre de cobre junto con los conos muestreador y discriminador lo cuales forman parte de la interfase entre el ICP (a presión atmosférica) y el Espectrómetro de Masas (a alto vacío).

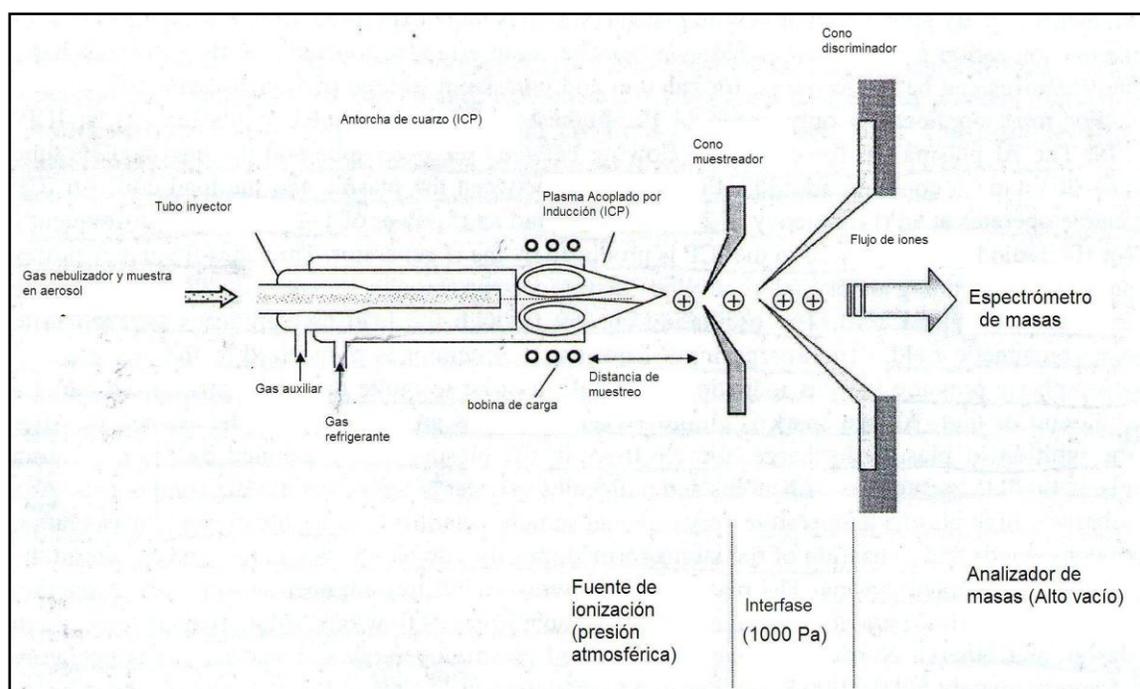
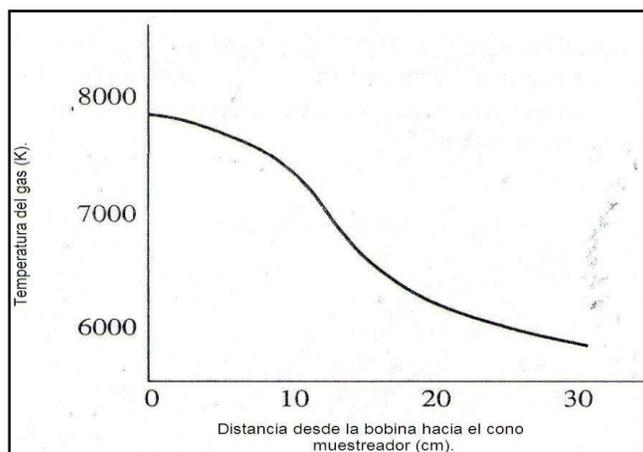


Ilustración 6. Diagrama del fuente de ionización (Plasma Acoplado por Inducción). J. Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Página 29, Figura 2.3

Como se explicó anteriormente, a partir de la muestra líquida que se requiere analizar, se forman pequeñas gotas en el nebulizador y en la cámara de aerosol. La muestra en forma de aerosol entra en la antorcha y después hacia el plasma. Las gotas forman partículas más pequeñas las cuales son vaporizadas tanto en átomos como en moléculas y, después, ionizadas en el ICP caliente. El ICP está sostenido por una antorcha que está compuesta por tres tubos de cuarzo concéntricos con diferentes diámetros. A través de los tubos concéntricos de la antorcha del ICP, usualmente, fluye gas argón como puede verse en la Ilustración 6. La muestra en forma de aerosol se transporta a lo largo del eje de la antorcha a través de su tubo interior con un flujo entre

0.5 y 1.21 L/min. El gas auxiliar fluye a través del tubo central con una velocidad entre 0.8 y 1.21 L/min. El flujo de gas argón auxiliar es aplicado para empujar el plasma sobre la parte superior del tubo interno de la antorcha para prevenir que éste se sobrecaliente. Entre el tubo externo y el tubo de en medio fluye el gas plasmógeno el cual enfría el tubo externo que se encuentra entre el plasma y la bobina de cobre. Un ICP opera con una radio frecuencia entre 27 y 40 MHz y con una potencia entre 1 y 2 kW. El campo de alta frecuencia en el ICP es producido por un generador de radio frecuencia. La potencia de radio frecuencia suministrada dirige una corriente a través de la bobina de cobre (la bobina se puede enfriar con un flujo de aire o agua). La corriente oscilante a través de la bobina produce un campo electromagnético oscilante. La energía suministrada por el generador de radio frecuencia es, así, transferida al gas argón (que se encuentra a presión atmosférica) por la inducción de la bobina de cobre. Con el fin de encender el plasma de argón se suministra una chispa de alto voltaje con la cual se generan los electrones en el gas argón. Después del encendido del plasma, los electrones en el plasma son acelerados por el campo magnético oscilante y colisionan con los átomos y moléculas para, así, ionizar los componentes del plasma. En la alta temperatura del Plasma Acoplado por Inducción tienen lugar la volatilización, desolvatación, atomización e ionización de los átomos formados, todo de una manera muy eficiente. La temperatura del plasma y la densidad electrónica son función de los parámetros experimentales utilizados (potencia de radio frecuencia, flujo del gas nebulizador, velocidad de entrada de la solución y diseño de la antorcha). Normalmente, el Plasma Acoplado por Inducción opera a una temperatura de 5000 – 8000 K mientras que la temperatura de los átomos excitados es más baja (4000 – 6000 K). La temperatura electrónica varía entre 8000 – 10000 K, la densidad electrónica está entre $1 - 3 \times 10^{15}/\text{cm}^3$. La temperatura del Plasma Acoplado por Inducción varía con la distancia desde la bobina hacia el cono muestreador, como se muestra en la Gráfica 1.

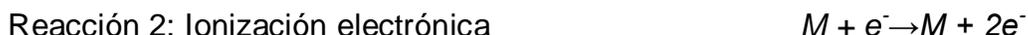


Gráfica 1. Temperatura del plasma como función de la distancia desde la bobina hacia el cono muestreador. J. Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Página 31, Figura 2.4

La energía de radio frecuencia se proporciona a los electrones, por lo que éstos son acelerados, e ionizan al gas noble, usado para transportar el aerosol nebulizado, a través de una ionización electrónica como se puede ver en la Reacción 1.



Con el fin de ionizar los átomos de Ar, los electrones transfieren su energía colisionando con los átomos en el plasma. Los principales procesos de ionización de un analito (M) en el Plasma de argón, son (reacciones 2-4):

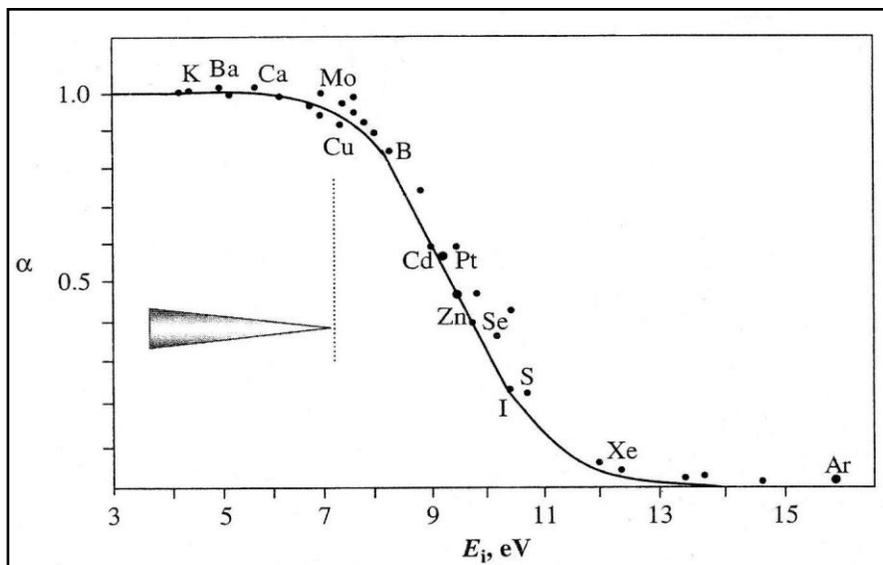


Donde Ar^{m*} es un átomo de argón excitado en un estado metaestable que se produce por la colisión de átomos libres con electrones acelerados. La ionización de Penning ocurre porque la energía de ionización del átomo neutro (M) es menor que la energía interna del átomo de argón en un estado metaestable (excitado, Ar^{m*}).

En la mayoría de los casos, el ICP-MS opera con un plasma “caliente” (8000 K) y una potencia de radio frecuencia entre 1200 – 1300 W. Bajo tales condiciones experimentales, los compuestos químicos contenidos en la muestra nebulizada se descomponen en sus constituyentes atómicos, los cuales se ionizan en el plasma en un alto grado. La eficiencia de ionización de un ICP depende de la energía de ionización, E_i , del elemento que se quiere analizar. Los elementos con una energía de ionización menor que 8 eV son ionizados con una eficiencia, α (α = número de iones atómicos monocargados/ número de átomos sin carga), cercana al 100 %. Con el incremento de la primera energía de ionización, la eficiencia de ionización disminuye. En la gráfica 2 se muestra la dependencia del grado de ionización (α) con la primera energía de ionización en el ICP. Aunque para muchos elementos el grado de ionización es cercano al 100 % sólo un átomo de entre 10^4 – 10^6 átomos de la muestra original es detectado debido a la gran pérdida de iones que ocurre durante su transporte desde el plasma pasando por el sistema de separación de masas (analizador de masas) y, hasta el detector de iones.

Después de la generación de iones en el ICP, los iones cargados positivamente son extraídos desde el plasma (presión ~ 100 kPa) gracias a una interfase, entre el cono muestreador y el cono discriminador, con menor presión (presión ~ 130Pa) como puede verse en la Ilustración 6. Después de esta interfase de baja presión los iones son extraídos por otra caída de presión hacia el analizador de masas, la cual es provocada por una bomba turbo molecular que genera un alto vacío. Los diámetros de los conos

muestreador y discriminador son de 0.8 – 1.2 mm y 0.4 – 1 mm, respectivamente. Y es aquí (anализador de masas) donde los iones son separados ⁽¹¹⁾.



Gráfica 2. Grado de ionización (α) como función de la primera energía de ionización, E_i . J. Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Página 32, Figura 2.5

3.3.3.3 Sistema analizador de iones ⁽¹¹⁾.

Como parte esencial de un Espectrómetro de Masas, el sistema analizador de iones tiene la tarea de separar los iones con diferentes relaciones masa/carga (m/z). El espectro de masas es una representación en dos dimensiones de la intensidad de señal de un ión como función de la relación m/z .

3.3.3.3.1 Analizador de masas cuadrupolar ⁽¹¹⁾.

El analizador de masas cuadrupolar, frecuentemente usado en Espectroscopia de masas, está formado por cuatro rodillos cilíndricos en un arreglo circular de radio r_0 .

Los iones extraídos de la fuente de ionización son acelerados a través del analizador de masas cuadrupolar en la dirección z , como se muestra en la Ilustración 7. El voltaje sobre los cuatro electrodos está compuesto de un voltaje de corriente directa (dc, por sus siglas en inglés) y uno de radio frecuencia (rf) $V \cos \omega t$ (con ω como frecuencia circular) así como de un voltaje superimpuesto de corriente directa, U .

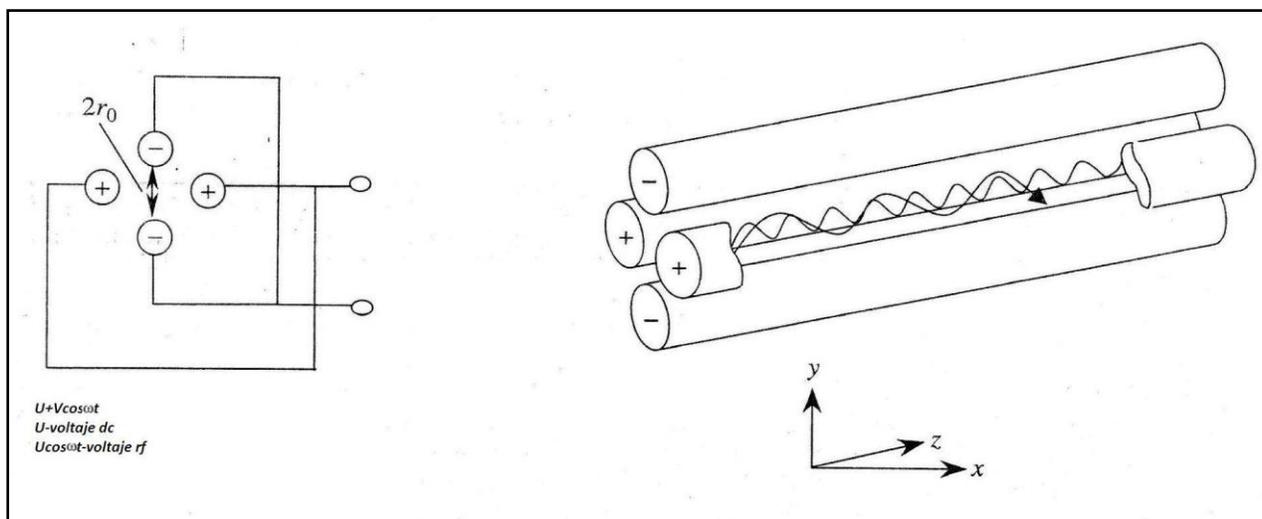


Ilustración 7. Representación esquemática de un analizador de masas cuadrupolar con electrodos cilíndricos. J. Becker. INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS. Página 88, Figura 3.7

Los iones inyectados en el cuadrupolo sobre su eje iónico óptico (en la dirección z) oscilan en el campo magnético cuadrupolar que resulta entre los cuatro rodillos cilíndricos. Los iones que se mueven a lo largo del eje z están bajo la influencia del campo eléctrico total que resulta de la aplicación de potencial en los rodillos, de acuerdo a las siguientes ecuaciones (5 y 6):

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \quad \text{ecuación 5}$$

y

$$-\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t) \quad \text{ecuación 6}$$

Los electrodos opuestos en el cuadrupolo tienen potenciales del mismo signo. El potencial eléctrico entre los rodillos está descrito por la ecuación 7.

$$\Phi(x, y) = \frac{(x^2 - y^2)}{r_0^2} \Phi_0 \quad \text{ecuación 7}$$

Donde “x” y “y” son desplazamientos a partir de la línea central, r_0 es la distancia desde el centro hasta un electrodo y Φ_0 es el potencial aplicado a un electrodo. Para el movimiento de los iones en la dirección “x”, la fuerza está dada por la ecuación 8.

$$F_x = -e \frac{2x}{r_0^2} \Phi_0 \quad \text{ecuación 8}$$

La fuerza incrementa linealmente desde cero en el centro del cuadrupolo hasta muy grande cerca de los rodillos. La fuerza en la dirección “x” es considera independiente de la fuerza en la dirección “y”, eso significa que los movimientos en ambas direcciones pueden ser considerados independientemente. El movimiento en un cuadrupolo puede ser descrito con las “ecuaciones de Mathieu”. Sustituyendo la ecuación 5 en la ecuación 8 y considerando que la aceleración de los iones en la dirección x está dada por $a_x = d^2x/dt^2$, entonces se obtiene una ecuación diferencial para el movimiento del ión, ecuación 9.

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -e \frac{2x}{r_0^2} (U - V \cos \omega t) \quad \text{ecuación 9}$$

Y reordenando la ecuación 9 se obtiene la ecuación 10.

$$\frac{d^2x}{d\xi^2} + (a_x - 2q_x \cos 2\xi)x = 0 \quad \text{ecuación 10}$$

Donde $\xi = \omega t/2$, $r_0 =$ radio del campo y a_x así como q_x son los parámetros de la ecuación de Mathieu y están definidos en las ecuaciones 11 y 12.

$$a_x = \frac{8e \cdot U}{m \cdot \omega^2 \cdot r_0^2} \quad \text{ecuación 11}$$

$$q_x = \frac{4e \cdot V}{m \cdot \omega^2 \cdot r_0^2} \quad \text{ecuación 12}$$

Los iones presentan oscilaciones estables sólo cuando las ecuaciones 11 y 12 se cumplen. Para el movimiento de un ión en la dirección “y”, el potencial tiene el signo contrario (ecuación 7). Se obtienen las mismas ecuaciones (ecuaciones 13 y 14) de Mathieu para el movimiento en “y” después de las sustituciones correspondientes.

$$a_y = -a_x \quad \text{ecuación 13}$$

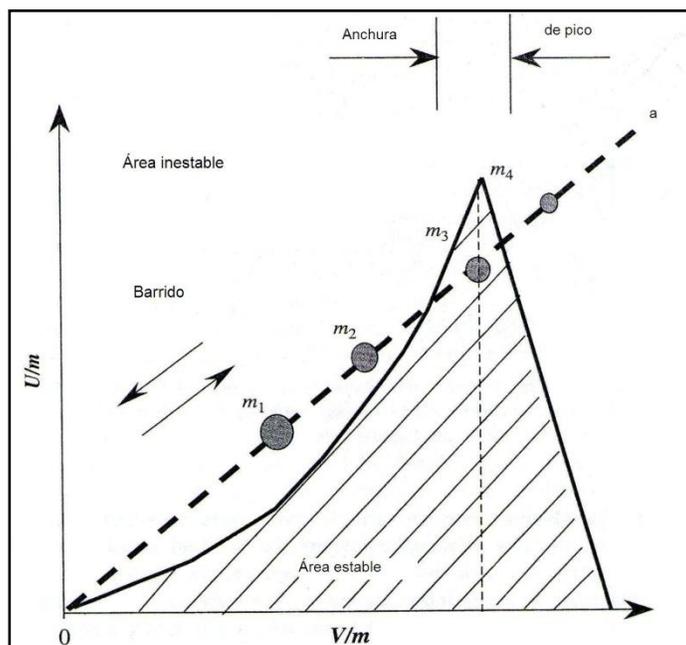
$$q_y = -q_x \quad \text{ecuación 14}$$

El movimiento de los iones a lo largo del eje “z” no está afectado por el campo eléctrico, y su velocidad no cambia. Las soluciones de la ecuación de Mathieu son complejas y son clasificadas en estables e inestables. La trayectoria de un ión es inestable si la amplitud de oscilación incrementa exponencialmente hasta que golpea un rodillo y se pierde (matemáticamente, “x” o “y” exceden r_0). Eso significa que, los iones

con oscilaciones inestables son “filtrados” por el cuadrupolo. La exploración de masas se lleva a cabo mediante un barrido del voltaje de radio frecuencia, V , y del voltaje superimpuesto, U . Para fines de estas medidas, el cociente U/V se mantiene constante (pendiente 0-a) como se puede ver en la Gráfica 3 (diagrama de estabilidad para un analizador de masas cuadrupolar lineal). Si se tienen iones con diferentes masas $m_1 > m_2 > m_3 > m_4$ moviéndose, debido al barrido de los voltajes U y V , sobre la línea a través de la parte estable del diagrama de estabilidad. Como puede verse en la Gráfica 3, los iones de masa m_3 que se encuentran dentro del área estable pueden ser detectados usando un sistema apropiado de detección de iones mientras que los iones con masas m_1 , m_2 y m_4 son “filtrados”; un analizador de masas cuadrupolar, es por lo tanto, un filtro de masas. La precisión y exactitud de los resultados analíticos dependen de la resolución del analizador de masas cuadrupolar, que está representada por la pendiente de la recta 0-a dada por el cociente entre el voltaje de corriente directa entre el voltaje de radio frecuencia (U/V). Con un pico de estabilidad de menor anchura en la región estable la resolución del cuadrupolo aumenta.

Los analizadores de masas cuadrupolares poseen una resolución variable que incrementa con el incremento de masa. En general, cierta resolución se aplica (fijando U/V de manera conveniente) cuando una masa m puede ser separada de sus masas vecinas $m+1$ o $m-1$ (resolución de una unidad de masa). La resolución ($m/\Delta m$) de un analizador cuadrupolar, usualmente, se encuentra entre 300 y 400.

Los iones resueltos de esta forma ahora son registrados por un sistema de detección de iones.



Gráfica 3. Diagrama de estabilidad para un analizador de masas cuadrupolar. J. Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Página 89, Figura 3.8

3.3.3.4 Sistema de detección de iones.

Cuando los iones separados dejan el sistema analizador de masas los iones son recolectados y detectados usando un sistema de detección de iones apropiado el cual está insertado dentro de la región que se encuentra a ultra alto vacío en el ICP-MS.

3.3.3.4.1 Multiplicador de Electrones Secundarios ⁽¹¹⁾.

El Multiplicador de Electrones Secundarios (SEM, por sus siglas en inglés) es uno de los detectores más utilizados dentro de los equipos de Espectrometría de Masas gracias a que aumenta la sensibilidad en varios órdenes de magnitud en comparación con otros sistemas detectores de iones.

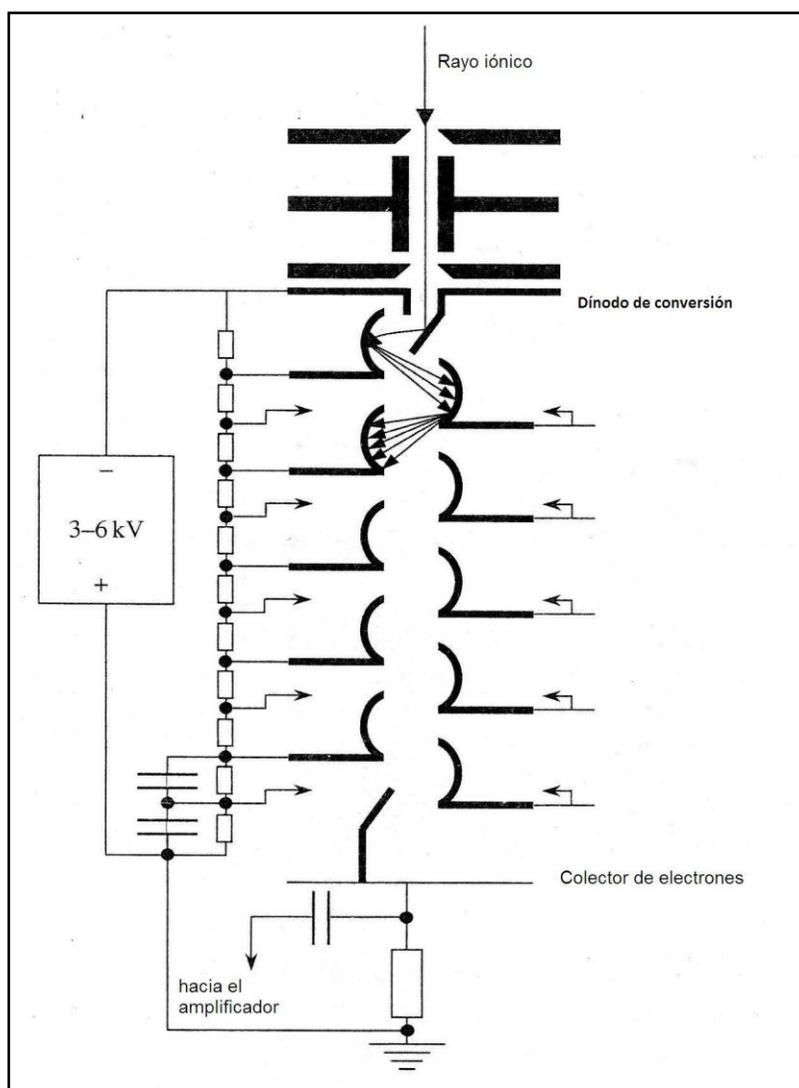


Ilustración 8. Principio de funcionamiento básico del Multiplicador de Electrones Secundarios (SEM). J. Becker. INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS. Página 106, figura 4.2.

El principio de operación de un Multiplicador de Electrones Secundarios es el siguiente. Los iones positivos inciden sobre el primer plato, o dínodo de conversión, lo que provoca la formación de electrones secundarios. Esto significa que en un Multiplicador de Electrones Secundarios la corriente de iones positivos es convertida en una corriente de electrones en el dínodo de conversión. Los electrones secundarios que se generaron son, en seguida, acelerados y dirigidos hacia la superficie del segundo dínodo donde chocan por lo que, una vez más, una multitud de electrones secundarios son generados. En un sistema Multiplicador de Electrones se tienen entre 10 y 14 dínodos por lo que al final la ganancia en corriente eléctrica es enorme. Con el fin de obtener el mayor rendimiento posible de electrones secundarios a partir de un ión positivo que entró al sistema, los dínodos están conectados a potenciales positivos cada vez más grandes. Un Multiplicador de Electrones Secundarios moderno, cuenta con dos modos de detección, un contador de pulsos propiamente dicho y un integrador de señales que funciona sólo para altas tasas de recuento. Este circuito integrador produce señales menos estables, pero cuando se utiliza con señales suficientemente intensas los resultados son satisfactorios. En la Ilustración 8 se esquematiza el principio básico del Multiplicador de Electrones Secundarios.

3.4 Desventajas en la determinación de metales por ICP-MS.

Hay dos desventajas principales en la determinación de analitos a través del ICP-MS, una es la gran cantidad de interferencias que pueden, pero no siempre, presentarse y la segunda es la deriva instrumental que tiene el equipo, sin embargo hay diferentes maneras de solucionar estas dificultades.

3.4.1 Interferencias.

Las interferencias que ocurren durante la determinación analítica mediante ICP-MS pueden clasificarse, de acuerdo a su origen, en interferencias espectrales y no espectrales. Las interferencias espectrales (isobáricas y moleculares) resultan del hecho de que otros isótopos elementales o moléculas tienen la misma masa que los analitos de interés. Las interferencias moleculares pueden ocurrir como resultado de los ácidos usados para preparar la muestra y/o por el gas argón del plasma. Además, es posible la formación de óxidos, hidróxidos y especies doblemente cargadas. Las interferencias no espectrales o interferencias de matriz provocan crecimiento o disminución de las señales.

3.4.1.1 Interferencias isobáricas ⁽¹²⁾.

Este tipo de interferencias se tienen bien caracterizadas y son el resultado de que aproximadamente el 70% de los elementos en la tabla periódica tienen más de un isótopo. Usualmente se evitan eligiendo un isótopo alternativo para hacer análisis cuantitativo. Este tipo de interferencias se pueden mitigar utilizando ecuaciones de corrección. Las ecuaciones de corrección utilizadas para minimizar las interferencias isobáricas son las que se pueden ver en la Tabla 9.

3.4.1.2 Interferencias poliatómicas ⁽¹²⁾.

Las interferencias moleculares tienen diversos orígenes y se pueden dividir en poliatómicas y especies doblemente cargadas. Las interferencias poliatómicas son el resultado de las interacciones de diversos elementos con la solución acuosa, el gas del plasma (Ar) o el tipo de ácidos usados en la preparación de la muestra. Las interferencias poliatómicas para ^{51}V son $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$; $^{34}\text{Si}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$; $^{14}\text{N}^{37}\text{Cl}^+$; $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ y para ^{55}Mn es $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$. Las interferencias poliatómicas pueden ser minimizadas a través del ajuste instrumental de equipo ICP – MS, principalmente, el ajuste del flujo del gas nebulizador. Las interferencias por especies doblemente cargadas son el resultado de una segunda ionización de los iones en el plasma, como las mediciones se hacen respecto de la relación masa/carga, si la carga del ión cambia también lo hace la relación masas/carga. También por el ajuste del flujo del gas nebulizador se pueden minimizar este tipo de interferencias.

3.4.1.3 Interferencias no espectrales ⁽¹²⁾.

Las interferencias no espectrales son el resultado de los problemas relacionados con la matriz de la muestra. Este tipo de interferencia provoca una pérdida de sensibilidad de elementos particulares. En el ICP se pueden presentar problemas si no se escoge adecuadamente el sistema de introducción de muestra, por ejemplo, se puede bloquear el nebulizador por causas de este tipo. Los sólidos pueden, también, acumularse sobre el cono muestreador en la interface del ICP – MS. Los dos problemas anteriores pueden provocar señales erróneas de los analitos. Para remediar este tipo de interferencias se hace lo siguiente: 1) elección correcta de un nebulizador, 2) dilución acuosa de la matriz de la muestra, 3) uso de Estándares Internos (E.I), 4) utilizar el método el método de las adiciones estándar.

3.4.2 Deriva instrumental ⁽¹²⁾.

La deriva instrumental es la variación de las intensidades de señal con respecto al tiempo. Estas variaciones pueden deberse a cambios en el suministro de corriente eléctrica, variaciones en la velocidad de introducción de muestra o partículas suspendidas en la muestra. Para corregir la deriva instrumental en las determinaciones hechas con el ICP-MS, se utiliza el método del estándar interno (E.I.). Es difícil seleccionar el estándar interno (E.I.) adecuado para los analitos seleccionados por lo que se escogen algunos metales que pudieran comportarse en el ICP-MS como lo harían nuestros analitos y así poder aplicar el método de estándar interno al procedimiento experimental. Para que un metal, prospecto de E.I., se comporte de manera similar al analito en el ICP-MS y además que no afecte la determinación (significa que: no genere interferencias isobáricas o poliatómicas) tiene que cumplir con las siguientes características: tener una masa isotópica parecida al isótopo del analito, tener una energía de ionización parecida a la del isótopo del analito y debe ser un metal que no esté presente en la matriz de interés ⁽¹⁴⁾.

Las energías de ionización de los analitos seleccionados son las siguientes:

Tabla 1. Energías de ionización de los analitos ⁽⁸⁾.

Analito	Energía de ionización. (kJ/mol)
⁵¹ V	650,0
⁵⁵ Mn	717,4

Tabla 2. E.I. propuestos con energías de ionización y abundancia natural ⁽⁸⁾.

Analito	E.I. Propuesto	Energía de ionización (kJ/mol)	Abundancia natural (%)
⁵¹ V	⁷² Ge	762.0	27.54
	⁷⁴ Ge	762.0	36.28
	⁸⁹ Y	616.0	100.00
	⁴⁵ Sc	631.0	100.00
	⁶⁹ Ga	578.0	60.11
	⁷¹ Ga	578.0	39.89
⁵⁵ Mn	⁴⁵ Sc	631.0	100.00
	⁶⁹ Ga	578.0	60.11
	⁷¹ Ga	578.0	39.89
	⁷² Ge	762.0	27.54
	⁷⁴ Ge	762.0	36.28
	¹⁰⁴ Ru	711.0	18.62

3.5 Preparación de muestra.

Para muestras sólidas, destruir la muestra es la práctica común y con esto, liberar los metales presentes en ella. La forma en que las muestras entran al ICP-MS es líquida.

3.5.1 Descomposición de muestra ⁽¹²⁾.

Una forma común de destruir la muestra es a través de una digestión en medio ácido, lo cual involucra el uso de ácidos minerales o agentes oxidantes (algunas veces mezclas de ellos). La elección de los ácidos empleados depende de las características de la muestra. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de los ácidos minerales utilizados para efectuar un proceso de digestión en medio ácido.

Una vez que se hizo la elección del ácido, la muestra se coloca en un vaso adecuado para la etapa de descomposición. La elección del tipo vaso, sin embargo, depende de la fuente que se utilizará para calentarlo. Hay diversas formas de calentar los vasos que contienen a la muestras, pero la forma más común es la digestión asistida por horno de microondas como fuente de calentamiento.

Hay dos tipos de sistemas de calentamiento con microondas comercialmente disponibles, existen sistemas de vaso abierto y de vaso cerrado. En el estilo abierto, se calientan hasta 6 vasos simultáneamente. Las muestras (con un ácido mineral o combinación de ellos) son puestas dentro de los vasos de vidrio (tienen la apariencia de tubos de ensayo grandes) y los vasos son colocados dentro del horno y calentados. El uso de vasos abiertos para la digestión puede traer problemas adicionales asociados con la pérdida de especies elementales por volatilización. En el estilo con vasos cerrados, todos los vasos son soportados por un carrusel que se coloca dentro del horno de microondas. Esta forma de digestión previene la pérdida de muestra y por tanto de especies elementales por volatilización del contenido en el vaso.

Durante la digestión las muestras son transformadas de sólido a líquido. En el proceso el carbono de la materia orgánica es transformado y liberado de ella en forma de dióxido de carbono, mientras que el nitrógeno de la muestra es liberado en forma de óxidos de nitrógeno. Si el ácido mineral utilizado es ácido nítrico, los metales contenidos en la muestra forman nitratos solubles en la solución resultante ⁽¹²⁾.

Tabla 3. Ejemplo de ácidos minerales comúnmente usados para descomponer muestras con ayuda de un horno de microondas. J. Dean. PRACTICAL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROSCOPY. Página 23, tabla 2.2

Ácidos minerales utilizados comúnmente para la digestión por vía húmeda.		
Ácido (s)	Punto de ebullición (°C)	Comentarios
Clorhídrico (HCl)	110	Útil para sales de carbonatos, fosfatos, algunos óxidos y algunos sulfóxidos. Es un agente reductor débil. No se utiliza para disolver materia orgánica.
Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	338	Es un agente oxidante sobre minerales, metales, aleaciones, óxidos e hidróxidos; a veces se utiliza combinado con HNO ₃ . Nunca debe ser almacenado en recipientes de PTFE
Nítrico (HNO ₃)	122	Oxida muchas de las muestras que no pueden ser disueltas por el HCl; libera los elementos traza en forma de nitratos solubles. Útil para digestión de metales, aleaciones y muestras biológicas.
Perclórico (HClO ₄)	203	A temperaturas fumantes, es un oxidante fuerte para materia orgánica. Normalmente, las muestras son preparadas previamente con HNO ₃ antes de agregar el HClO ₄ .
Fluorhídrico (HF)	112	Para la digestión de materiales con bases de sílica; forma SiF ₆ ²⁻ en la solución ácida. Solo debe contenerse en recipientes de plástico.
Agua regia (nítrico/clorhídrico)	--	Se llama agua regia a una mezcla 1:3 vol/vol de HNO ₃ /HCl. En la mezcla se forma un intermediario reactivo, NOCl. Es útil para digerir metales, aleaciones, sulfuros y otros minerales. Mejor conocida por su capacidad para disolver Au, Pd y Pt.

3.6 Calidad de un método analítico ⁽¹⁵⁾.

Evaluar los parámetros de desempeño de un método analítico, es una tarea muy importante. Generalmente, esta tarea está estrechamente ligada con el desarrollo del método y muchos de los parámetros de desempeño se evalúan como parte del desarrollo experimental. Esta tarea tiene como propósito confirmar que el método analítico tiene los parámetros de desempeño consistentes con los que requiere la aplicación. En un laboratorio los métodos no normalizados, los métodos que se diseñan o desarrollan, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, deben ser evaluados

mediante ciertos parámetros de desempeño y si es posible se deben validar completamente cada uno de los métodos utilizados dentro del laboratorio de análisis. Para evaluar el desempeño de un método analítico, se pueden utilizar una o más de las siguientes técnicas:

Calibración utilizando Materiales de Referencia Certificados (MRC) o patrones de referencia.

Comparación con resultados obtenidos mediante otros métodos.

Comparaciones interlaboratorio.

Evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado.

Evaluación de la incertidumbre de los resultados.

Los valores de los parámetros de desempeño evaluados a través de cualquiera de las técnicas anteriores, deben responder adecuadamente a las necesidades de los usuarios o clientes que soliciten el análisis.

3.7 Parámetros de desempeño.

Los siguientes parámetros dan información acerca de la calidad del método analítico.

Límite de detección (LoD) ⁽¹⁵⁾: cuando se realizan mediciones donde el analito se encuentra en concentraciones bajas, como en el análisis de elementos traza, es muy importante conocer cual es la concentración a partir de la cual (hacia concentraciones más pequeñas) resulta problemática la detección del analito. Para este propósito conocer la aproximación “blanco + 3s” es suficiente. Donde “blanco” es el promedio de las concentraciones de un grupo de blancos de muestra y s es la desviación estándar de la concentración de dichos blancos de muestra. Hay algunos casos en los que los blancos de muestra son muy difíciles de preparar, en estos casos se puede aproximar un blanco de muestra con un blanco de reactivos. A partir de la lectura de los blancos reactivos se puede obtener el LoD.

Límite de cuantificación (LoQ) ⁽¹⁵⁾: es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad. El límite de detección corresponde al “blanco + 10s” donde “blanco” es el promedio de las concentraciones de un grupo de blancos de muestra y s es la desviación estándar de la concentración de dichos blancos. Igual que para el LoD, este se puede calcular a partir de la lectura de blancos de reactivos siempre que sea difícil obtener blancos de muestra.

Intervalo lineal ⁽¹⁵⁾: es el intervalo de concentraciones del analito sobre el cual el método puede aplicarse. Dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tiene una relación lineal con la concentración del analito. El límite inferior del intervalo lineal está dado por el límite de cuantificación. Los cálculos de regresión, por ellos mismos, son insuficientes para establecer la linealidad. Con este fin, una inspección visual de la curva de calibración y del análisis de los residuales es suficiente.

Intervalo de trabajo ⁽¹⁵⁾: es el intervalo de concentraciones del analito sobre el cual el método puede aplicarse. El límite inferior del intervalo lineal corresponde al límite de cuantificación y el límite superior está caracterizado por los tipos de muestras y el Material de Referencia Certificado.

Exactitud ⁽¹⁵⁾: este parámetro de desempeño se mide a través de la veracidad y la precisión.

Veracidad ⁽¹⁵⁾: la evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia. Los Materiales de Referencia Certificados (MRC) se aceptan como proveedores de valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del MRC. Para verificar la veracidad utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor citado del material de referencia.

Precisión ⁽¹⁵⁾: las medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y la reproducibilidad. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un periodo de tiempo corto, es decir, es la clase de variabilidad que se espera cuando una muestra se analiza por duplicado. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación respecto del tiempo).

Sensibilidad ⁽¹⁵⁾: es efectivamente la pendiente de la curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponda a un cambio en la concentración del analito. Se establece dentro del intervalo lineal del método.

Recuperación ⁽¹⁵⁾: debido a que usualmente no se conoce la cantidad de un analito en particular que está presente en una porción de prueba, es difícil estar seguros de que tan exitoso ha sido el método para extraer el analito de la matriz. Una forma de determinar la eficiencia de cuantificación es realizar estudios de recuperación sobre materiales de referencia adecuados.

Selectividad ⁽¹⁵⁾: ésta garantiza la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Usualmente, la selectividad se investiga mediante el estudio de la capacidad que el método de prueba tiene para medir el analito de interés ó a través de la comparación del método de prueba con otros métodos o técnicas independientes.

Robustez ⁽¹⁵⁾: es una medida de la efectividad del método analítico cuando no se aplica de manera perfecta. En cualquier método analítico habrá ciertas etapas que son muy importantes y que si no se llevan a cabo con suficiente cuidado pueden tener un efecto muy severo sobre el desempeño del método. Esto incluye aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño.

4. EXPERIMENTACIÓN.

4.1 Material y reactivos.

- HNO₃ Instra (69,0 – 70,0%) J.T. Baker.
- H₂O₂ Ultrex (30%) J.T. Baker.
- HNO₃ (R.A.).
- Detergente libre de fosfatos, HYCLIN®.
- Estándar de Mn, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Estándar de V, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Estándar de Y, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Estándar de Sc, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Estándar de Ru, 1000 mg/L, Pure Atomic Spectroscopy Standard.
- Estándar de Ga, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Estándar de Ge, 1000 mg/L, High Purity Standards.
- Material de Referencia Certificado (MRC), hígado de bovino 1577c, National Institute of Standards and Technology (NIST). **VER ANEXO I.**
- Material de Referencia Certificado (MRC), hígado de bovino en solución, High – Purity Standards, lote: 529004. **VER ANEXO III.**
- 7 tanques de argón de Ultra Alta Pureza (UAP) 5,0 (99,999 %).
- Charolas de poliestireno (3x5cm).

- Matraces aforados de 10 y 5 mL.
- Espátula.
- Papel filtro No. 42, Whatman.
- Micropipetas (20 – 200 μ L, 100 – 1000 μ L y 500 - 5000 μ L).
- Recipientes de plástico de 10, 20, 50 y 100 mL.
- Puntas para micropipeta, micropipetas antes especificadas.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Pipetas beral de 3 mL.
- Embudos de polipropileno para filtración rápida.
- Bolsas de plástico con sello hermético.
- Agua desionizada (18M Ω /cm; 0 ppm de NaCl)

4.2 Equipos e instrumentos.

- Estufa de secado. Marca: Heraeus.
- Hornos de microondas para digestión en sistema cerrado. Marcas: MILESTONE Microwave Laboratory Systems, MLS 1200 mega y CEM Microwave Technology Ltd, MDS 2000.
- Balanza analítica. Marca: Sartorius, bp221s.
- Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción (ICP-MS). Marca: Perkin Elmer SCIEX, Elan DRC-e, Axial Field Technology.
- Desionizador de agua. Marca: Barnstead, modelo: WA 52001

4.3 Procedimiento experimental general.

Éste consiste de cuatro etapas generales: 1) lavado de material, 2) tratamiento físico y químico de muestras, 3) dilución gravimétrica y 4) cuantificación de analitos mediante ICP-MS.

4.3.1 Lavado de material.

Cuando se determinan concentraciones de metales, o cualquiera otra sustancia química, a los niveles de trazas o ultratrazas es muy fácil obtener resultados erróneos por contaminación de las muestras, debido a que los materiales utilizados pueden modificar enormemente las pequeñas concentraciones de los analitos que se desean cuantificar. Por este motivo, no sólo se ve afectada la cuantificación en sí misma sino que también se pueden afectar los equipos de análisis químico utilizados para dicha cuantificación. El ICP-MS, por ejemplo, tiene una tolerancia máxima de sólidos disueltos totales (TDS, por sus siglas en inglés) menor al 0.2% ya que los tubos capilares del sistema de introducción de muestra pueden obstruirse por partículas de polvo presentes en el material, y no sólo el sistema de introducción, también el ICP-MS puede dejar de funcionar correctamente ya que los conos muestreador y discriminador tienen diámetros muy pequeños (0.6-1.2 mm) y partículas grandes pueden obstruirlos ⁽¹⁶⁾.

Para evitar los problemas de usar material sin tratamiento de limpieza previo, se recomienda lavar el material que tiene contacto con las muestras y el Material de Referencia Certificado, de la siguiente manera:

- 1) Lavar con agua corriente todo el material.
- 2) Introducir los materiales a una solución de detergente neutro libre de fosfatos, HYCLIN® al 15% en este caso, al menos durante 8 horas.
- 3) Retirar los materiales de la solución detergente y enjuagarlos con abundante agua corriente.
- 4) Introducir los materiales en una solución de ácido nítrico (R.A.) al 30% al menos durante 8 horas.
- 5) Retirar los materiales de la solución ácida y enjuagarlos 10 veces con agua desionizada.
- 6) Dejar secar los materiales en un lugar limpio y protegido del polvo del ambiente.
- 7) Cuando el material esté seco, almacenar los recipientes bien cerrados y en bolsas de plástico herméticas.

Después de este proceso de limpieza el material puede ser utilizado para la determinación de elementos traza.

Los conos muestreador y discriminador fueron lavados con jabón libre de fosfatos y enjuagados con agua desionizada después de cada sesión experimental.

4.3.2 Tratamiento físico del Material de Referencia Certificado y de las muestras.

El Material de Referencia Certificado (MRC) no necesita tratamiento físico previo al tratamiento químico, pues comercialmente está disponible en forma de un polvo fino y seco. Para que no se hidrate se recomienda mantenerlo cerrado, a temperatura ambiente y en un lugar seco ⁽¹⁷⁾.

Material de Referencia Certificado (MRC): Hígado de bovino. 1577c.

Proveedor: National Institute of Standards and Technology (NIST).

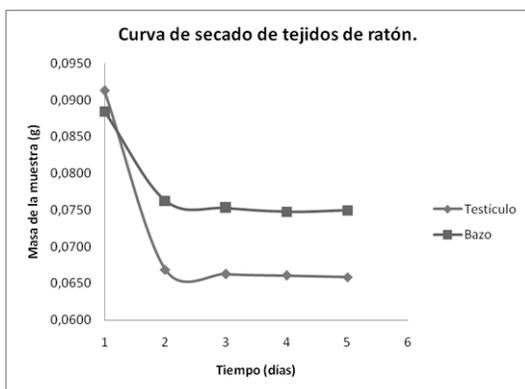
Tabla 4. Concentraciones certificadas de diversos metales en el MRC (1577c) ⁽¹⁷⁾. Ver ANEXO I.

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Ag ^(A,B,b,C)	µg/kg	5.9 ± 1.6	Mn ^(A,a,b,D,d)	mg/kg	10.46 ± 0.47
As ^(C)	µg/kg	19.6 ± 1.4	Mo ^(A,a,b,C,D,d)	mg/kg	3.30 ± 0.13
Ca ^(A,a,D,d)	mg/kg	131 ± 10	Na ^(A,a,d)	%	0.2033 ± 0.0064
Cd ^(C,E)	µg/kg	97.0* ± 1.4	Ni ^(B,b,c)	µg/kg	44.5 ± 9.2
Co ^(A,a,b)	mg/kg	0.300 ± 0.018	Pb ^(E)	µg/kg	62.8 ± 1.0
Cr ^(A)	µg/kg	53 ± 14	S ^(a,D,d,F)	%	0.749 ± 0.034
Cu ^(A,a,C,D,d)	mg/kg	275.2 ± 4.6	Se ^(A,E)	mg/kg	2.031 ± 0.045
Fe ^(A,a,D)	mg/kg	197.94 ± 0.65	Sr ^(B,b,d)	µg/kg	95.3 ± 4.2
K ^(A,a,d,F)	%	1.023 ± 0.064	V ^(c,d,G)	µg/kg	8.17 ± 0.66
Mg ^(A,a,D,d)	mg/kg	620 ± 42	Zn ^(A,a,D,E,h)	mg/kg	181.1 ± 1.0

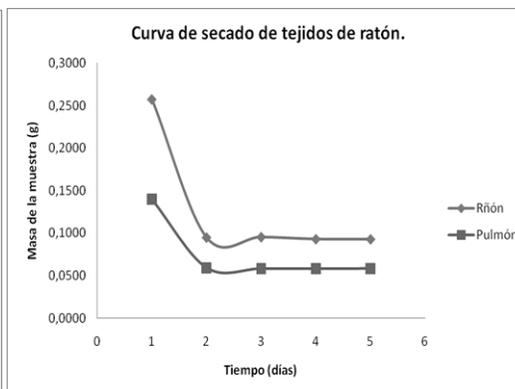
Las muestras de los diferentes tejidos de ratón estuvieron contenidas en frascos de plástico o vidrio y conservadas con formol. Estas muestras fueron proporcionadas por la Dra. Teresa I. Fortoul de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Muestras: Hígado, riñón, testículo, pulmón, timo y bazo de ratón.

Las muestras se separaron del formol mediante un decantado, y se colocaron en charolas de poliestireno limpias. Las charolas con las muestras fueron introducidas a la estufa de secado, Heraeus, a una temperatura de 80°C hasta que se encontraran a peso constante. Después de monitorear el peso de diversas muestras se estableció el tiempo de secado en una semana, de acuerdo a las curvas de secado de las gráficas 4 y 5.



Gráfica 4. Curvas de secado.



Gráfica 5. Curvas de secado.

4.3.2.1 Tratamiento químico del Material de Referencia Certificado (1577c, NIST).

Después de que las muestras alcanzaron un peso constante, se dio un tratamiento químico a las muestras y al MRC (1577c, NIST) con el fin de eliminar la materia orgánica de la que están compuestas y, a su vez, liberar los metales presentes en ellas en forma de sales solubles ⁽¹²⁾. En este caso los metales (V y Mn) contenidos en las muestras se liberan en la solución en forma de nitratos solubles debido a que se utiliza ácido nítrico en la digestión (ver Tabla 3). El efecto del ácido nítrico sobre la materia orgánica se ve potenciado por la elevada temperatura que el horno de microondas proporciona a la mezcla ⁽¹²⁾. De acuerdo a la literatura ^(18, 20) y a la concentración de los analitos en el MRC se determinaron los siguientes pasos para la digestión del mismo.

- 1) Sobre charolas de poliestireno limpias pesar 0.5 g de MRC (Hígado de bovino, 1577c, NIST) en la balanza analítica, 4 réplicas.
- 2) Colocar las masas de MRC (1577c, NIST) en vasos de teflón. El horno de microondas MILESTONE cuenta con un carrusel de 6 vasos de teflón.
- 3) Agregar alícuotas de una solución estándar de V de concentración conocida en dos de los vasos del carrusel. Esto se hace por que la cantidad de V en el MRC (1577c, NIST) es al menos mil veces menor que la cantidad de Mn. Lo cual es un problema cuando se intenta cuantificar por cualquier técnica analítica. Ver Tabla 4.
- 4) Agregar con una pipeta beral 2 mL de HNO₃ (70% v/v, INSTRA) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, ULTREX).

5) Preparar dos blancos reactivos. Adicionar a dos vasos de teflón 2 mL de HNO₃ (70% v/v, INSTRA) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, ULTREX). Con el fin de conocer la aportación a la concentración de los analitos debida a los reactivos utilizados.

6) Digerir el MRC (1577c, NIST) en el horno de microondas MILESTONE con el programa de digestión de la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de digestión para el horno de microondas MILESTONE.

Programa de digestión		
Etapa	Tiempo (min)	Potencia (W)
1	1	250
2	2	0
3	5	300
4	5	600
Rotor-control: ON. Twist:OFF. Ventilador: 20 min.		

7) Después de la digestión del MRC (1577c, NIST), dejar enfriar los vasos de teflón durante 20 minutos.

8) Una vez que los vasos alcanzaron la temperatura ambiente, filtrar la solución líquida obtenida (papel filtro Whatman, No. 42) en matraces aforados de 10 mL y llevar al aforo con agua desionizada.

9) trasvasar las soluciones resultantes a recipientes plásticos limpios y refrigerar hasta su lectura en el ICP – MS.

El procedimiento se efectuó 4 veces. En la primera digestión no se hicieron adiciones de V, en las siguientes 3 veces se hicieron adiciones conocidas de V a tres diferentes concentraciones. De esta manera en cada carrusel, excepto en el primero se tuvieron dos vasos con blancos reactivos, dos vasos con MRC (1577c, NIST) sin adicionar y dos vasos con MRC (1577c, NIST) adicionados, lo anterior con la intención de cuantificar adecuadamente los dos analitos (V y Mn).

Las cantidades de HNO₃ y H₂O₂ fueron seleccionadas con base en la literatura ^(18, 22).

4.3.2.2 Tratamiento químico de las muestras.

1) Retirar las muestras del horno de secado y registrar el peso de cada una de ellas.

2) Colocar cada muestra en un vaso de teflón. Dejar un vaso sin muestra para preparar el blanco de reactivos.

3) Si la muestra pesa más de 0.4 g, agregar 2 mL de ácido nítrico (INSTRA) y 1 mL de peróxido de hidrógeno (ULTREX) al vaso de teflón. Si la muestra pesa menos de 0.4 gramos, agregar 1 mL de ácido nítrico (INSTRA) y 0.5 mL de peróxido de hidrógeno (ULTREX) al vaso de teflón. Se preparan los blancos reactivos tomando en cuenta las cantidades de ácido y peróxido de hidrógeno agregados a las muestras de la serie.

4) Colocar los vasos en el carrusel y digerirlos. Si se utiliza el horno de microondas MILESTONE se trabaja con el programa de digestión mostrado en la Tabla 5, si la digestión se hace con el horno de microondas CEM se utiliza el programa de digestión de la Tabla 6.

5) Dejar enfriar los vasos durante 20 minutos. Filtrar (papel filtro Whatman, No. 42) y aforar en matraces volumétricos. Si la muestra tiene una masa menor que 0.4 g entonces se utilizan matraces aforados de 5 mL. Si la muestra tiene una masa mayor que 0.4 g se utilizan matraces aforados de 10 mL.

6) Las muestras filtradas se trasvasan a recipientes plásticos limpios y se refrigeran para su posterior análisis.

La refrigeración de las muestras que después fueron analizadas en el ICP-MS es vital, si se almacenan a temperatura ambiente (~25°C) se puede evaporar el disolvente lentamente, lo que provocaría un cambio en la concentración de los analitos y por tanto un error en los resultados finales. Esto es muy importante si se hace notar que se trata de concentraciones en el nivel de partes por billón (µg/L).

Tabla 6. Programa de digestión horno de microondas CEM.

Programa de digestión.			
Paso	1	2	3
Potencia	90	90	90
Presión (PSI)	25	60	100
Tiempo (min)	10	10	10
Rampa (min)	5	5	5
Ventilador (rpm)	10	10	10

Las cantidades de HNO₃ y H₂O₂ fueron seleccionadas con base en la literatura ^(18, 22).

4.3.3 Dilución gravimétrica.

Las muestras se diluyeron con el fin de disminuir el efecto matriz (la matriz puede suprimir o magnificar la señal de algunos analitos ⁽¹²⁾). Las diluciones se preparan de manera gravimétrica con la finalidad de aportar la menor incertidumbre posible debida al proceso de dilución de las muestras y el MRC (1577c, NIST) pues al hacerlo de esta manera se tiene una mayor precisión en los volúmenes agregados de muestra, E.I. y agua desionizada. Lo anterior se hace considerando que la densidad de cualquier solución utilizada es igual a un gramo por mililitro ($\rho=1\text{g/mL}$). El ICP-MS es un equipo muy sensible y no es conveniente hacer las diluciones volumétricas y, con esto, aumentar la incertidumbre en la concentración de las muestras y los Materiales de Referencia Certificados.

En el presente trabajo se prepararon diluciones 1:25, 1:50 y 1:60 del MRC (1577c, NIST) así como diluciones 1:2 y 1:10 de las muestras. Cada solución debe contener a los estándares internos (E.I.) propuestos. A partir de soluciones de E.I. multielemental (Ge, Ga, Y, Sc y Ru) con concentraciones, aproximadamente de 10 mg/L y 0.2 mg/L, se agregan cantidades adecuadas para que cada solución contenga a los E.I. a una concentración de 20 $\mu\text{g/L}$. Las soluciones de E.I., las diluciones y las soluciones de V (para las muestras de MRC (1577c, NIST) adicionadas) fueron preparadas gravimétricamente.

Procedimiento:

- 1) Colocar un recipiente plástico limpio dentro de la balanza analítica y registrar su masa. Tomar una alícuota de la muestra o el MRC (1577c, NIST), según sea el caso y colocarla dentro del recipiente plástico, registrar la nueva masa.
- 2) Agregar una masa adecuada de las soluciones multielementales de E.I. (10 mg/L ó 0.2 mg/L) y diluir hasta la masa requerida. Registrar la masa final.

Se debe tener cuidado de preparar una cantidad suficiente de cada solución, para que el ICP-MS realice la cuantificación de los analitos. Por lo menos se requieren 5 mL.

También se prepararon de manera gravimétrica las curvas de calibración, con el propósito de aportar una incertidumbre menor a la curva de calibración debida a una preparación volumétrica. Se prepararon curvas de V y Mn entre 0 y 65 $\mu\text{g/L}$ a partir de diluciones hechas de las soluciones estándar de 1000 mg/L. También se prepararon curvas de ambos analitos de 0 a 300 $\mu\text{g/L}$, a partir de diluciones hechas de las soluciones estándar de 1000 mg/L, con el fin de explorar el intervalo lineal de ambos analitos. Se agregó, también, una cantidad adecuada de la solución de E.I. (multielemental) a cada estándar de la curva de calibración preparado de tal forma que cada E.I. propuesto tenga una concentración de 20 $\mu\text{g/L}$ en cada una de las soluciones de la curva de calibración.

Procedimiento:

- 1) Sobre un recipiente plástico limpio, se pesó en la balanza analítica la cantidad adecuada de las soluciones de V y Mn, de la solución multielemental de E.I., de ácido nítrico y de agua desionizada. Las diversas curvas de calibración se prepararon de acuerdo a las tablas 7 y 8.
- 2) Se repitió el paso anterior hasta que la curva de calibración estuvo completa.

De acuerdo a este procedimiento se prepararon las curvas de calibración de 0 a 65 µg/L y de 0 a 300 µg/L.

Se tomó nota de las cantidades experimentales que fueron agregadas con el fin de conocer la concentración exacta de cada sustancia en cada estándar de las curvas de calibración. También se tomó nota de las soluciones preparadas y de las diluciones, tanto del MRC (1577c, NIST) como de las muestras, con el mismo fin.

Tabla 7. Cantidades que se deben agregar para la elaboración de las curvas de calibración de 0 a 65 µg/L.

Estándar	Concen. V y Mn (µg/L) (aproximada)	masa (g)				
		V/Mn (~300µg/L)	E.I. (~300 µg/L)	HNO3 (10% v/v)	agua desionizada	masa total
1	0	0.0000	1.3333	2.0000	16.6667	20.0000
2	1	0.0667	1.3333	2.0000	16.6000	20.0000
3	3	0.2000	1.3333	2.0000	16.4667	20.0000
4	10	0.6667	1.3333	2.0000	16.0000	20.0000
5	25	1.6667	1.3333	2.0000	15.0000	20.0000
6	35	2.3333	1.3333	2.0000	14.3333	20.0000
7	65	4.3333	1.3333	2.0000	12.3333	20.0000

Tabla 8. Cantidades que se deben agregar para la preparación de la curva de calibración de 0 a 300 µg/L.

Estándar	Concen. V y Mn (µg/L) (aproximada)	Masa (g)				
		V/Mn (~300/10000 µg/L)	E.I. (~300 µ g/L)	HNO3 (10% v/v)	Agua desionizada	Total
1	0	0.0000	6.0000	9.0000	75.0000	90.0000
2	1	0.3000	6.0000	9.0000	74.7000	90.0000
3	5	1.5000	6.0000	9.0000	73.5000	90.0000
4	10	3.0000	6.0000	9.0000	72.0000	90.0000
5	30	0.2700	6.0000	9.0000	74.7300	90.0000
6	60	0.5400	6.0000	9.0000	74.4600	90.0000
7	80	0.7200	6.0000	9.0000	74.2800	90.0000
8	120	1.0800	6.0000	9.0000	73.9200	90.0000
9	160	1.4400	6.0000	9.0000	73.5600	90.0000
10	200	1.8000	6.0000	9.0000	73.2000	90.0000
11	260	2.3400	6.0000	9.0000	72.6600	90.0000
12	300	2.7000	6.0000	9.0000	72.3000	90.0000

En la preparación de los estándares 1 a 4 se utilizan soluciones de V y Mn con una concentración Aproximada de 300 µg/L. A partir del estándar 5 se utiliza una solución de V y Mn con concentraciones aproximadas de 10000 µg/L.

4.3.4 Cuantificación de analitos mediante ICP-MS y tratamiento de datos.

4.3.4.1 Elección de los isótopos de los analitos.

Para escoger los isótopos de los analitos que se cuantificaron en el ICP-MS se tuvieron en cuenta varios factores, como: la abundancia del isótopo, las interferencias isobáricas que el isótopo presenta y las interferencias poliatómicas que puedan causar problemas al isótopo analito escogido. La forma en que las interferencias isobáricas se minimizan, es por medio de ecuaciones de corrección. Las ecuaciones de corrección están reportadas en la literatura y puesto que cada isótopo tiene las mismas interferencias isobáricas pueden usarse las mismas ecuaciones de corrección ⁽²¹⁻²⁵⁾. Las interferencias poliatómicas o interferencias de matriz, pueden mitigarse modificando ciertos parámetros instrumentales, por ejemplo, el flujo del gas nebulizador, es decir, el flujo del gas argón. El flujo adecuado de gas argón reduce las interferencias poliatómicas que generalmente se presentan en forma de óxidos ⁽¹³⁾. En la Tabla 9 se presentan los analitos seleccionados con sus interferencias poliatómicas y con las ecuaciones de corrección utilizadas para corregir las interferencias isobáricas.

Tabla 9. Interferencias poliatómicas y ecuaciones de corrección para interferencias isobáricas.

Analito	Interferencias poliatómicas	Ecuaciones de corrección para interferencias isobáricas.
⁵¹ V	³⁵ Cl ¹⁶ O	$^{51}\text{V} = ^{51}\text{V} - 0,001 ^{35}\text{Cl}$
⁵⁵ Mn	⁴⁰ Ar ¹⁵ N, ⁴⁰ Ar ¹⁴ NH, ³⁷ Cl ¹⁸ O, ³⁹ K ¹⁶ O	$^{55}\text{Mn} = ^{55}\text{Mn} - 0,00014 ^{35}\text{Cl}$

Se determinó la concentración de los analitos usando el método del estándar interno mediante el ICP-MS. De acuerdo al siguiente procedimiento:

Procedimiento para la determinación de V y Mn mediante ICP-MS. Después de encender el equipo ICP-MS (**ver ANEXOII**).

- 1) Se hacen lecturas de la solución llamada “*daily*” para verificar que las condiciones son las mejores para realizar las lecturas. Esto se hace media hora después de encendido el equipo, tiempo necesario para que el plasma se estabilice. Se hace la lectura de la solución “*daily*” con diferentes flujos del gas nebulizador con el fin de minimizar las interferencias poliatómicas.
- 2) Se introducen al equipo las soluciones estándar de la curva de calibración.

- 3) Se introducen al equipo los blancos reactivos y las muestras, tanto de MRC (1577c, NIST) como tejidos de ratón, primero las soluciones más diluidas y al final las más concentradas.

4.3.4.2 Tratamiento de datos.

Los datos obtenidos del ICP-MS son intensidades de señal (en cuentas por segundo, cps) de algunos isótopos de aquellos elementos de los cuales se desea conocer la concentración en cada una de las soluciones introducidas al equipo. El reporte del ICP-MS incluye la Intensidad Promedio Medida (M.I.M., por sus siglas en inglés) de un total de tres réplicas. Conociendo las intensidades de señal de cada isótopo (porque las proporciona el equipo) en cada solución y las concentraciones exactas de cada sustancia en las mismas (porque se lleva un control de cada una de las soluciones preparadas gravimétricamente), se pueden elaborar las curvas de calibración de los analitos con los diferentes E.I. y también conocer la concentración de los analitos, tanto en el MRC (1577c, NIST) como en las muestras mediante la comparación con la curva de calibración.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se realizaron 7 sesiones experimentales con el equipo ICP-MS para evaluar los parámetros que dan información acerca de la calidad del método y para determinar la concentración de los analitos en las muestras y el MRC.

5.1 Condiciones instrumentales de análisis.

Para seleccionar las condiciones instrumentales más adecuadas de trabajo se analiza la solución llamada “*daily*”, ésta solución tiene los elementos químicos necesarios para que a través de su determinación mediante ICP-MS se puedan determinar las mejores condiciones instrumentales. El “*daily*” se tiene que leer siempre que se requiera trabajar con el equipo. En el informe de lectura del “*daily*” se obtienen las intensidades para las señales causadas por $^{140}\text{Ce}^+$, $^{156}\text{CeO}^+$, $^{138}\text{Ba}^+$ y $^{138}\text{Ba}^{2+}$. Además se obtienen las desviaciones estándar relativas (RSD, por sus siglas en inglés) y las intensidades de señal para ^{24}Mg , ^{115}In y ^{238}U . Se hizo una variación del flujo del gas nebulizador para minimizar los óxidos totales y como consecuencia las interferencias poliatómicas pues, como se dijo antes, las interferencias poliatómicas son causadas generalmente por óxidos. Una medida de los óxidos totales es el cociente de señales de óxidos de cerio

156 y cerio 140 ($^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$) y se toma como un valor aceptable una relación con valor menor o igual a 0.03 con lo cual se asegura que se han minimizado las interferencias poliatómicas. Del cociente de las señales producidas por $^{138}\text{Ba}^+$ y $^{138}\text{Ba}^{2+}$ ($^{138}\text{Ba}^+ / ^{138}\text{Ba}^{2+}$) se puede obtener una buena idea de la cantidad de especies doblemente cargadas con respecto de las monocargadas, este cociente también debe ser menor o igual a 0.03. Se debe recordar que el ICP-MS es un espectrómetro de masas y es sensible a las diferentes relaciones masa sobre carga (m/z) y las lecturas se realizan con la condición de que todas las especies presentes estén cargadas positivamente debido a la pérdida de un electrón, es decir, $z=1$. Si las especies se ionizan por segunda vez en el plasma, entonces esta relación se hace diferente y por tanto se tienen diferentes lecturas. Otros parámetros importantes son las intensidades de señal que se obtienen para los isótopos ^{24}Mg , ^{115}In y ^{238}U con sus respectivos %RSD (desviación estándar relativa). Por un lado la intensidad de la señal de ^{24}Mg nos indica la capacidad que el ICP-MS está teniendo para detectar relaciones masa sobre carga (m/z) bajas, este parámetro debe ser mayor a cinco mil cps (cuentas por segundo) para poder llevar a cabo las lecturas. La intensidad de la señal del ^{115}In da una idea de la capacidad que el ICP-MS está teniendo para detectar relaciones masa sobre carga (m/z) medias, este parámetro debe ser mayor a veinticinco mil cps para poder realizar las lecturas. La intensidad de la señal ^{238}U debe dar una idea de la capacidad que está teniendo el ICP-MS para detectar especies con relaciones masa sobre carga (m/z) altas y este parámetro debe ser mayor a veinte mil cps para poder realizar las lecturas. Por otro lado las desviaciones estándar relativas (%RSD) nos refieren a la variación que se tuvo entre cada réplica de la lectura y estos parámetros deben ser menores al 2% para que las lecturas realizadas sean confiables ⁽¹⁴⁾.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para la lectura del “daily” en el ICP-MS variando el flujo del gas nebulizador.

Tabla 10. Resultados para la lectura de la solución “daily” con diferentes flujos del gas nebulizador.

Flujo del gas nebulizador (L/min)	$^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$	$^{138}\text{Ba}^{2+} / ^{138}\text{Ba}^+$	%RSD ($^{24}\text{Mg}^+ / ^{115}\text{In}^+ / ^{238}\text{U}^+$)	Intensidad de señal ($^{24}\text{Mg}^+ / ^{115}\text{In}^+ / ^{238}\text{U}^+$)
1.00	201.000	0.020	4.9/0.7/1.3	41270.4/125691.2/7875.3
0.80	0.040	0.062	1.0/0.6/0.5	32081.1/76951.8/51100.1
0.80	0.038	0.060	0.5/0.8/0.9	28903.3/72230.2/48758.1
0.70	0.036	0.248	3.7/3.4/4.0	2796.4/6080.6/3751.1
0.70	0.032	0.187	3.6/3.3/3.0	3214.6/7002.2/4293.3
0.70	0.018	0.038	1.1/0.5/0.8	6868.1/16215.8/11656.9
0.70	0.017	0.036	1.1/0.6/0.5	6774.7/16508.6/11853.3
0.70	0.018	0.035	1.5/0.6/0.7	6901.6/17238.7/12359.2
0.70	0.017	0.035	0.9/0.6/1.0	7127.1/17293.2/12503.1
0.70	0.019	0.032	1.2/0.5/1.4	13091.0/24873.6/17051.2
0.60	0.015	0.040	0.6/1.1/1.2	5802.9/10693.5/6951.9
0.60	0.030	0.486	2.2/3.2/3.2	1978.1/4065.2/2237.4
0.60	0.015	0.040	1.2/0.9/0.8	5880.2/10728.9/7001.1

Resultado se encuentra el flujo para el cual se obtienen los mejores parámetros.

Observando la Tabla 10 se puede afirmar, con base en los puntos anteriormente aclarados, que las mejores condiciones para realizar las lecturas son aquellas en las que el flujo de gas nebulizador tiene un valor de 0.7 L/min. Pues se alcanzan las mejores relaciones para $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ y para $^{138}\text{Ba}^{2+} / ^{138}\text{Ba}^+$, así como los mejores valores de %RSD e intensidades de señal, necesarias para una buena lectura con el ICP-MS.

En la Tabla 11 se muestran las demás condiciones instrumentales utilizadas para realizar las lecturas de las soluciones en el ICP – MS.

Tabla 11. Condiciones instrumentales del ICP - MS para realizar las lecturas.

Descripción	Valor
Flujo del gas nebulizador	0.70 L/min
flujo del gas auxiliar	1.20 L/min
Flujo del gas plasmógeno	13.50 L/min
Potencia de RF ICP	1100.00 W
Conos discriminador y muestreador	Níquel

En seguida se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de desempeño: límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal, intervalo de trabajo, exactitud, sensibilidad, recuperación, selectividad y robustez, además se muestra un estudio de deriva instrumental.

5.2 Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ).

Fueron calculados como se presentó en la introducción de este documento. Se determinaron las concentraciones de V y Mn en los blancos reactivos de las series que contenían muestras de MRC (1577c, NIST). La guía EURACHEM propone que estas lecturas deben realizarse sobre blancos de muestras, es decir, sobre tejidos de ratón (hígado, riñón, pulmón, bazo, testículo o timo) que tuviera todo excepto los analitos ⁽¹⁵⁾ pero esto es virtualmente imposible ya que el Mn tiene funciones biológicas fundamentales dentro del organismo de humanos y ratones, se trata de un elemento esencial. El V no es considerado un metal esencial pero también sería muy difícil encontrar tejidos que no contengan V ya que potencializa el efecto de algunas sustancias, como la insulina, muy importantes en el cuerpo humano y de los ratones. La guía EURACHEM afirma que si no se cuenta con este tipo de blancos de muestra es posible aproximar el LoD y el LoQ a partir de la lectura de blancos reactivos. En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados para la lectura de tres series, cada serie contenía dos blancos reactivos, dos muestras de MRC (1577c, NIST) y dos muestras de

MRC (1577c, NIST) con adiciones conocidas de V. **NOTA:** para la evaluación del LoD, LoQ, recuperación, sesgo y veracidad se utilizaron MRC (1577c, NIST) digeridos en el horno de microondas para digestión en sistema cerrado MILESTONE, MLS 1200 mega. El porcentaje de recuperación calculado en muestras digeridas en los dos sistemas de digestión se presenta más adelante (pruebas de robustez).

Tabla 12. Determinación de la concentración de V en diferentes blancos reactivos.

Muestra	tipo	[V] (µg/L)
RHD15-1	blanco	1.571
RHD15-2	blanco	1.488
RHD14-1	blanco	1.634
RHD14-2	blanco	1.630
RHD13-1	blanco	1.715
RHD13-2	blanco	1.717
	promedio	1.626
	s	0.088

Tabla 13. Determinación de la concentración de Mn en diferentes blancos reactivos.

Muestra	tipo	[Mn] (µg/L)
RHD15-1	blanco	0.100
RHD15-2	blanco	0.098
RHD14-1	blanco	0.084
RHD14-2	blanco	0.090
RHD13-1	blanco	0.099
RHD13-2	blanco	0.098
	promedio	0.095
	s	0.006

Con base en los datos observados en la tablas 12 y 13 se calculan los límites de detección (LoD) y cuantificación (LoQ) de acuerdo con las ecuaciones 15 y 16 sugeridas por la guía EURACHEM.

$$LoD = \text{blanco} + 3s \quad \text{ecuación 15}$$

$$LoQ = \text{blanco} + 10s \quad \text{ecuación 16}$$

Donde la palabra “blanco” es el promedio de las concentraciones de los analitos en los blancos reactivos y “s” es la desviación estándar de dichas mediciones. La EURACHEM sugiere un mínimo de 6 blancos reactivos diferentes para la determinación del LoD y LoQ. En la Tabla 14 se muestran los límites de detección y cuantificación para ambos analitos.

Tabla 14. Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ) para los dos analitos.

Analito	LoD ($\mu\text{g/L}$)	LoQ ($\mu\text{g/L}$)
V	1.889	2.503
Mn	0.114	0.159

A partir de los resultados mostrados en las tablas 12 y 13 se puede afirmar que el lavado del material utilizado a lo largo del procedimiento analítico fue adecuado. Como puede verse los promedios de las concentraciones de los analitos en los blancos reactivos y su respectiva desviación estándar, $[V]=1.626 \mu\text{g/L}$; $s=0.088 \mu\text{g/L}$ y $[Mn]=0.095 \mu\text{g/L}$; $s=0.006 \mu\text{g/L}$, son pequeños y homogéneos lo cual indica que el proceso de lavado cumplió con su objetivo.

5.3 Intervalo lineal.

Las muestras que fueron determinadas analíticamente presentan cantidades de ambos analitos, en su mayoría, muy bajas. La concentración de los analitos en el MRC (Bovine Liver 1577c, NIST) también es baja ($Mn=10.46 \text{ mg/kg}$ y $V=8.17 \mu\text{g/kg}$). Una curva de calibración de $0 \mu\text{g/L}$ a $300 \mu\text{g/L}$ de V y Mn fue leída en el ICP-MS como una forma de explorar el intervalo lineal.

Se elaboraron las curvas de calibración de los analitos con el método del estándar interno con cada uno de los estándares internos propuestos. De esta manera se tienen las curvas de calibración para V y Mn (una por cada isótopo propuesto como E.I., ver Tabla 2, no se tomó en cuenta el Ru pues, en ese momento, se trataba de un estudio preliminar). Cabe destacar que todas las curvas de calibración parecen comportarse linealmente a lo largo de todo el intervalo de concentraciones, como puede verse por los coeficientes de correlación (r) mostrados en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación (r) de las curvas obtenidas para V.

Analito	E.I.	Ecuación $y=mx+b$			r
			m	b	
^{51}V	^{69}Ga	$y=$	0.024	-0.022	0.99991
	^{71}Ga	$y=$	0.035	-0.008	0.99997
	^{89}Y	$y=$	0.012	-0.008	0.99992
	^{45}Sc	$y=$	0.014	-0.014	0.99983
	^{72}Ge	$y=$	0.074	-0.090	0.99995
	^{74}Ge	$y=$	0.055	-0.071	0.99985

Las curvas con mayor correlación se encuentran resaltadas en la tabla.

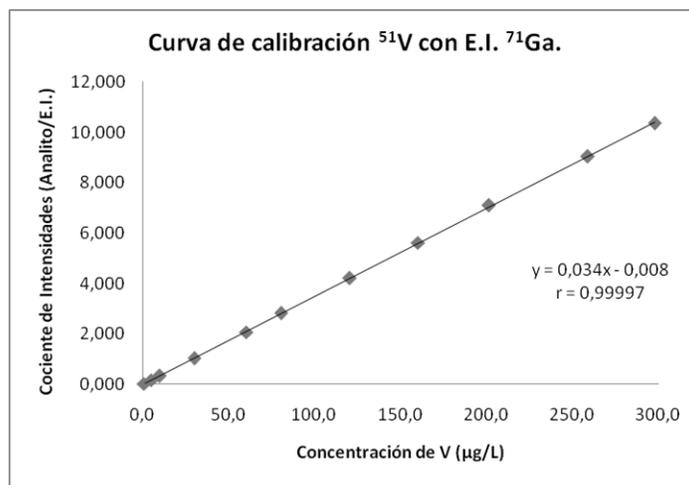
Tabla 16. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación (r) de las curvas obtenidas para Mn.

Analito	E.I.	Ecuación $y=mx+b$			r
			m	b	
⁵⁵ Mn	⁶⁹ Ga	y=	0.025	-0.015	0.99988
	⁷¹ Ga	y=	0.036	-0.005	0.99989
	⁴⁵ Sc	y=	0.014	-0.009	0.99976
	⁷² Ge	y=	0.076	-0.057	0.99995
	⁷⁴ Ge	y=	0.056	-0.059	0.99983

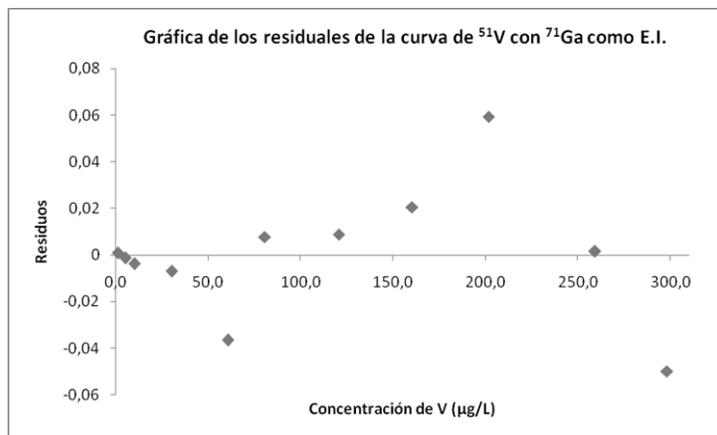
Las curvas con mayor correlación se encuentran resaltadas en la tabla.

Como se puede observar, las curvas de calibración para ambos analitos presentan una correlación muy buena. Lo anterior puede hacernos suponer que cualquier isótopo propuesto puede funcionar adecuadamente como E.I. pero, aunque todas las curvas son buenas, también debe hacerse notar que el objetivo del E.I. es que minimice los efectos del aumento o disminución de la señal a través de un comportamiento similar al del analito. Los resultados presentados en las tablas 15 y 16 son resultado de lecturas consecutivas y hechas en un periodo de tiempo muy corto (~20 minutos) y la deriva instrumental (aumento o disminución de las señales a lo largo del tiempo) puede no ser importante cuando se hacen lecturas consecutivas. Pero a partir de los resultados mostrados en las tablas 15 y 16 se puede decir que los analitos tienen un comportamiento lineal desde los límites de cuantificación hasta ~300 µg/L. Para esto la EURACHEM asegura que se deben inspeccionar de manera visual las curvas de calibración y hacer un análisis de la gráfica de residuales ⁽¹⁵⁾.

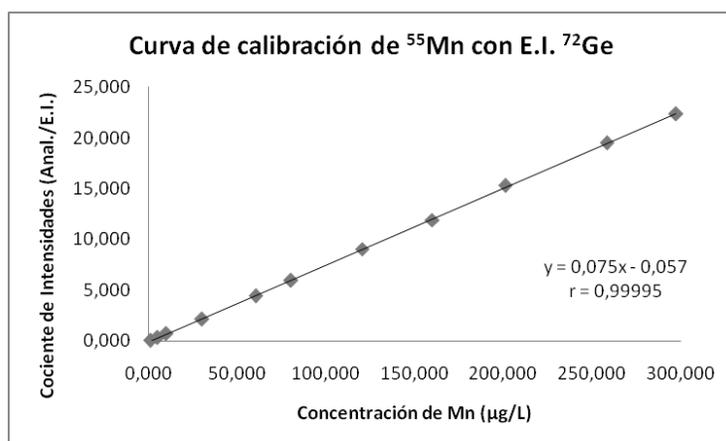
A continuación se presentan dos curvas de calibración, una para cada analito y sólo con un E.I. de los anteriormente propuestos. Esto es únicamente con el fin de mostrar el intervalo lineal que poseen ambos analitos.



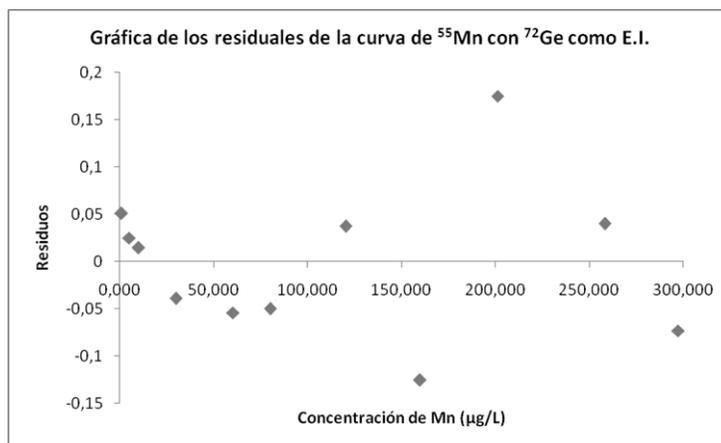
Gráfica 6. Intervalo lineal para V.



Gráfica 7. Residuales de la curva de calibración de ^{51}V con E.I. ^{71}Ga



Gráfica 8. Intervalo lineal para Mn.



Gráfica 9. Residuales de la curva de calibración de ^{55}Mn con E.I. ^{72}Ge .

Es de notarse en las curvas de calibración de las gráficas 6 y 8, que los analitos presentan intervalos lineales, al menos, hasta ~300 µg/L. Este intervalo lineal es muy grande si se compara con los intervalos lineales que se obtienen mediante otras técnicas como GFAAS (*Graphite Furnance Atomic Absorption Spectrometry*, por sus siglas en inglés), por ejemplo.

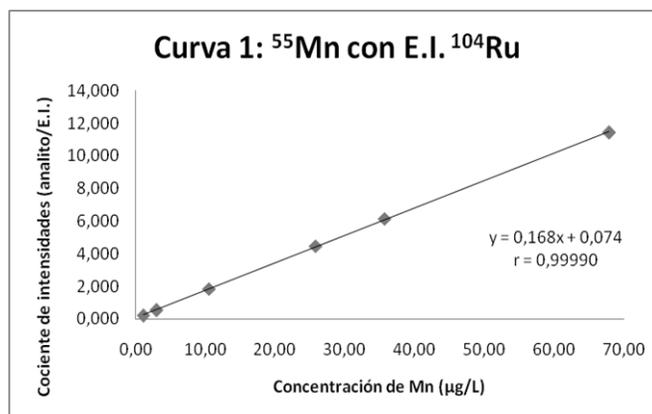
En las gráficas de los residuales 7 y 9 se puede observar que los errores cometidos en la preparación de la curva de calibración son aleatorios pues no se muestra una tendencia en las gráficas de los residuales para ninguno de los dos analitos. Con base en las gráficas 6 a 9 y los coeficientes de correlación (r) mostrados (tablas 15 y 16) se puede afirmar que los analitos se comportan de manera lineal dentro de los intervalos de concentraciones mostrados en la Tabla 17, donde los límites inferiores para cada analito son sus respectivos límites de cuantificación y el límite superior son las concentraciones hasta las cuales se exploró el comportamiento de los analitos en el ICP-MS.

Tabla 17. Intervalo lineal para V y Mn.

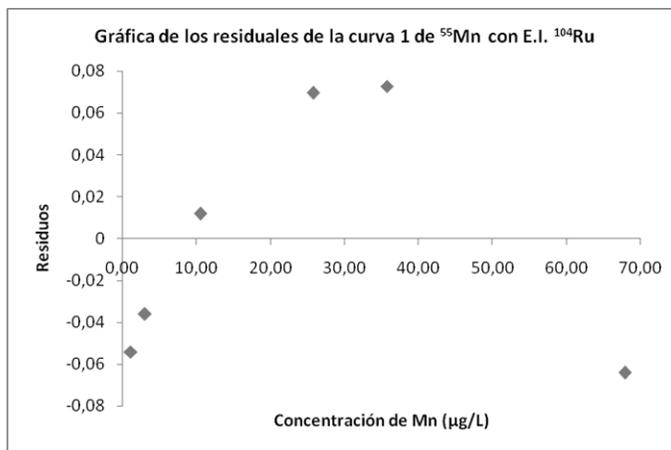
Analito	Intervalo lineal (µg/L)
V	2.503 - 298.026
Mn	0.159 - 297.300

5.4 Intervalo de trabajo.

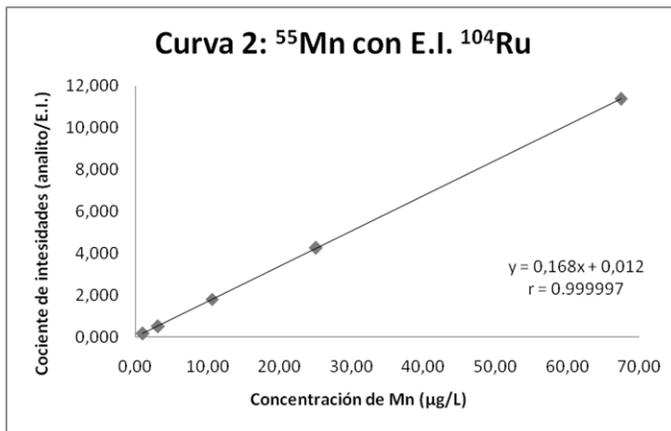
El intervalo de trabajo se definió desde los límites de cuantificación hasta, aproximadamente, el doble de las concentraciones de los analitos (V y Mn) en el MRC (1577c, NITS) una vez que fueron diluidos. Se presentan tres curvas preparadas independientemente para cada uno de los analitos. Las curvas de calibración son presentadas con los E.I. que resultaron ser los mejores, según los cálculos de recuperación, sesgo y precisión mostrados más adelante.



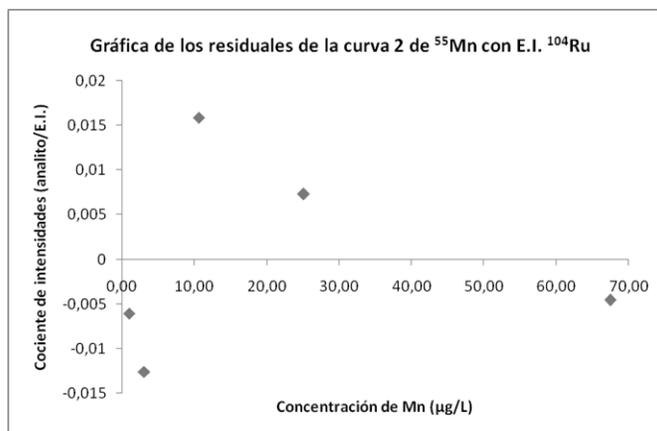
Gráfica 10. Curva de calibración 1 de ⁵⁵Mn con ¹⁰⁴Ru como E.I.



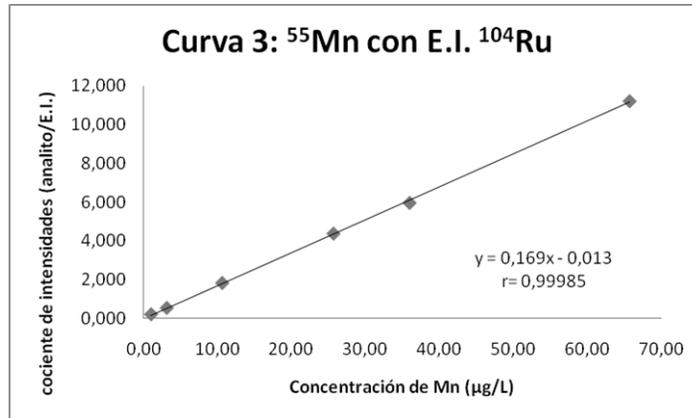
Gráfica 11. Residuales de la curva de calibración 1 de Mn.



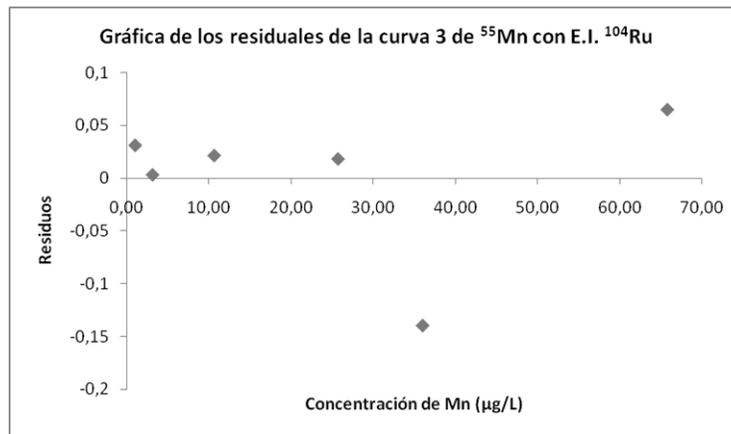
Gráfica 12. Curva de calibración 2 de ^{55}Mn con ^{104}Ru como E.I.



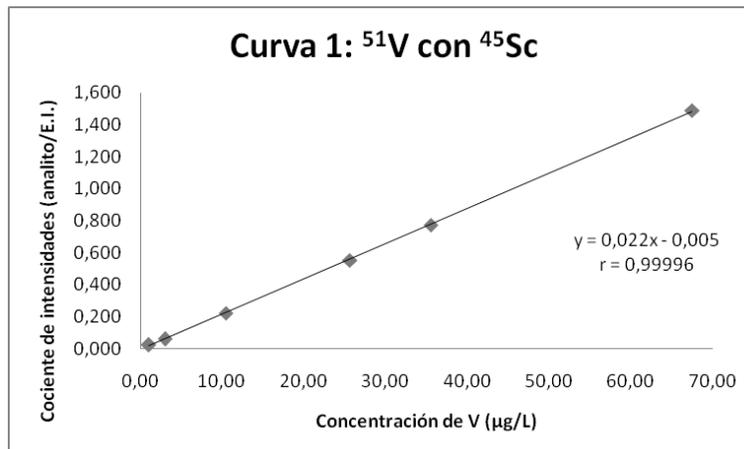
Gráfica 13. Residuales de la curva de calibración 2 de Mn.



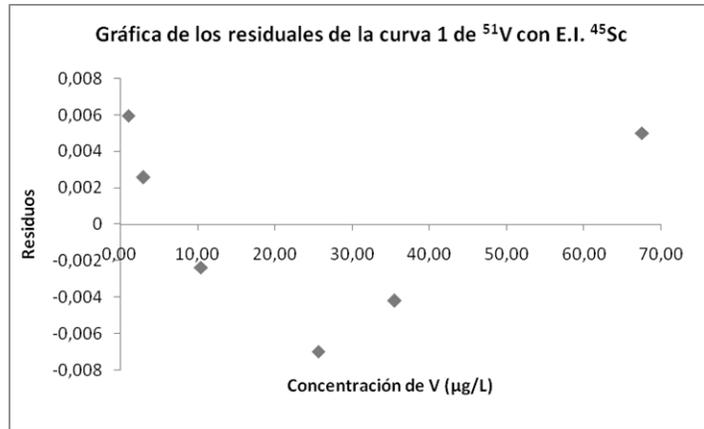
Gráfica 14. Curva de calibración 2 de ^{55}Mn con ^{104}Ru como E.I.



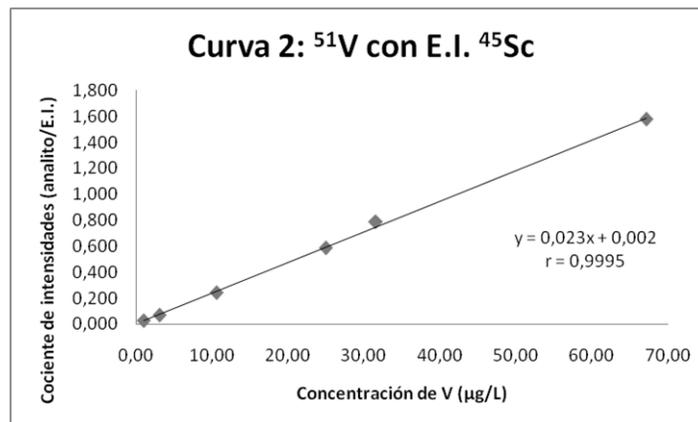
Gráfica 15. Residuales de la curva de calibración 3 de Mn.



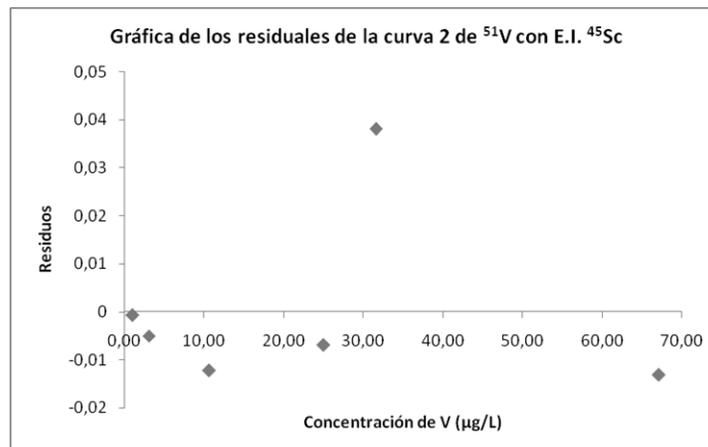
Gráfica 16. Curva de calibración 1 de ^{51}V con ^{45}Sc como E.I.



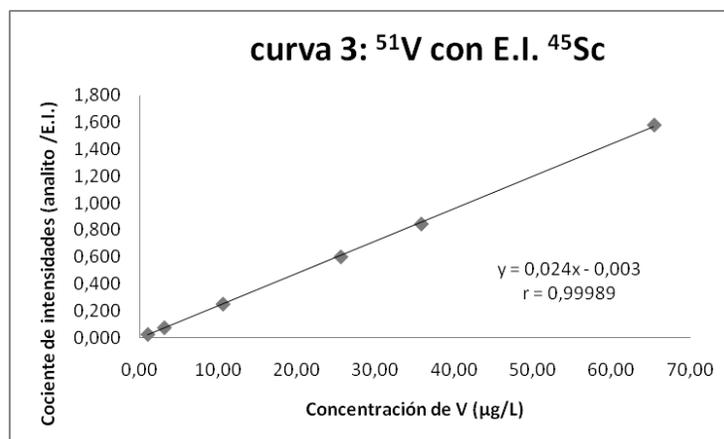
Gráfica 17. Residuales de la curva de calibración 1 con ^{51}V y ^{45}Sc como E.I.



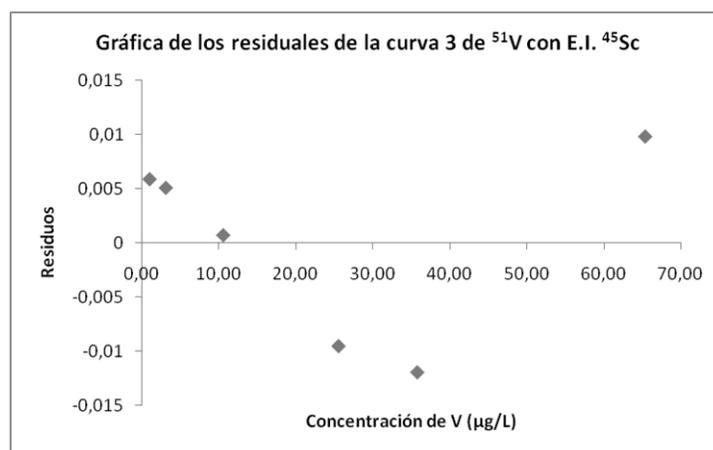
Gráfica 18. Curva de calibración 2 de ^{51}V con ^{45}Sc como E.I.



Gráfica 19. Residuales de la curva de calibración 2 de ^{51}V con ^{45}Sc como E.I.



Gráfica 20. Curva de calibración 3 de ⁵¹V con ⁴⁵Sc como E.I.



Gráfica 21. Residuales de la curva 3 de ⁵¹V con ⁴⁵Sc como E.I.

De las gráficas 10, 12, 14, 16, 18 y 20 se puede observar que, como ya se sabía a partir del amplio intervalo lineal antes presentado, las curvas de calibración son lineales y el coeficiente de correlación (r) que presentan también es una evidencia de ello. De las gráficas 11, 13, 15, 17, 19 y 21 se puede observar que los errores no presentan tendencia alguna, pues se encuentran distribuidos aleatoriamente alrededor de la recta horizontal, lo cual indica que los errores en la preparación de las curvas son aleatorios y no sistemáticos, confirmando así, la linealidad. En la Tabla 18 se muestran los intervalos de trabajo para cada uno de los analitos.

Tabla 18. Intervalo de trabajo para los analitos.

Analito	Intervalo de trabajo (µg/L)
V	2.503 - 66.663
Mn	0.159 - 67.025

Los límites inferiores de los intervalos de trabajo presentados en la Tabla 18 corresponden a los límites de cuantificación respectivos de cada analito mientras que los límites superiores son un promedio de las concentraciones de las tres curvas leídas con el fin de establecer el intervalo de trabajo.

5.5 Recuperación.

En las tablas 19 y 20 se muestran los resultados de recuperación obtenidos para los analitos, V y Mn, en el MRC (1577c, NIST) con los diferentes E.I. propuestos. Como se especificó en el procedimiento experimental, se determinó la concentración de Mn que contenía el MRC (1577c, NIST), pues se encuentra en cantidad suficiente para cuantificarlo adecuadamente mediante el ICP-MS. Sin embargo la concentración de V en el MRC (1577c, NIST) es muy pequeña (es al menos 1000 veces menor que la concentración de Mn, ver Tabla 4), tanto que tras el proceso de digestión y dilución tiene una concentración menor al límite de cuantificación. Por lo anterior se prepararon muestras adicionadas con cantidades conocidas y suficientes de V para el cálculo de recuperación, veracidad y precisión.

Tabla 19. Recuperación promedio de V con los diferentes E.I.

Analito	E.I.	Recuperación (%)
⁵¹ V	⁴⁵ Sc	91.98
	⁶⁹ Ga	89.56
	⁷¹ Ga	88.50
	⁷² Ge	89.17
	⁷⁴ Ge	89.14

Tabla 20. Recuperación promedio de Mn con los diferentes E.I.

Analito	E.I.	Recuperación (%)
⁵⁵ Mn	⁶⁹ Ga	84.96
	⁷¹ Ga	83.55
	⁷² Ge	83.46
	⁷⁴ Ge	83.68
	¹⁰⁴ Ru	86.26

Como puede observarse en las tablas 19 y 20 los valores de recuperación promedio obtenidos con los diferentes E.I. son muy cercanos unos con otros, sin embargo los isótopos que funcionaron mejor como E.I. en la cuantificación de V y Mn son ⁴⁵Sc y ¹⁰⁴Ru, respectivamente. En las tablas 21 y 22 se muestran las concentraciones

obtenidas de V y Mn en las diversas muestras de MRC (1577c, NIST). Donde “*IN SITU*” hace referencia a la solución que fue introducida al equipo ICP-MS (solución hecha por dilución), “Digerida” hace referencia a la solución obtenida después del proceso de digestión y “sólida” hace referencia a la concentración en la muestra sólida.

Tabla 21. Concentración teórica y experimental de V en las diferentes muestras de MRC.

	Muestra	Concentración de V		
		(µg/L)		(mg/kg)
		<i>IN SITU</i>	Digerida	sólida.
Experimentales	RHD15-3	23.40	1728.48	20.03
	RHD15-4	22.89	1722.23	20.00
	RHD14-3	23.34	1449.00	18.09
	RHD14-4	21.76	1338.09	16.72
	RHD13-3	21.62	656.95	10.06
	RHD13-4	21.36	660.42	10.11
Teóricos	RHD15-3	24.36	1799.85	20.85
	RHD15-4	23.81	1791.32	20.80
	RHD14-3	24.28	1507.87	18.82
	RHD14-4	24.42	1501.72	18.77
	RHD13-3	24.78	752.87	11.53
	RHD13-4	24.48	756.88	11.59

Tabla 22. Concentración teórica y experimental de Mn en las muestras MRC.

	Muestra	Concentración de Mn		
		(µg/L)		(mg/kg)
		<i>IN SITU</i>	Digerida	sólida.
Experimentales	RHD15-3	14.24	440.80	8.74
	RHD15-4	14.88	459.42	9.11
	RHD15-5	14.46	452.31	8.96
	RHD15-6	14.73	461.31	9.15
	RHD14-3	14.64	454.81	9.08
	RHD14-4	14.90	463.20	9.25
	RHD14-5	14.64	455.18	9.09
	RHD14-6	14.25	440.47	8.80
Teóricos	RHD15-3	17.05	527.60	10.46
	RHD15-4	17.08	527.39	10.46
	RHD15-5	16.89	528.23	10.46
	RHD15-6	16.85	527.50	10.46
	RHD14-3	16.86	523.73	10.46
	RHD14-4	16.85	523.94	10.46
	RHD14-5	16.83	523.52	10.46
	RHD14-6	16.94	523.42	10.46

A partir de los datos en las tablas 21 y 22 se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo a la ecuación 17.

$$\%Recuperación = \frac{C_{experimental}}{C_{teórica}} \times 100\% \quad \text{ecuación 17}$$

Donde $C_{experimental}$ es la concentración del analito determinada experimentalmente y $C_{teórica}$ es la concentración teórica del analito (reportada en el certificado del MRC o conocida en el caso de ser muestras adicionadas).

Dado lo anterior, se puede reportar el porcentaje de recuperación en la cuantificación de V y Mn usando como E.I. a los isótopos ^{45}Sc y ^{104}Ru , respectivamente, como un promedio y su respectiva desviación estándar expandida con un factor de cobertura ($k=2$) para un nivel de confianza del 95%, como se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Recuperación promedio para V y Mn con el E.I. que mostró mejores resultados. Los resultados se expresan con un factor de cobertura, $k=2$, para un nivel de confianza del 95%.

Analito	E.I.	Recuperación (%)
V	^{45}Sc	91.98 ± 9.10
Mn	^{104}Ru	86.26 ± 3.36

Con los resultados en la tabla anterior (23) puede asegurarse que el tratamiento químico hecho sobre el MRC disuelve la materia orgánica y libera a la solución digerida los metales contenidos en la muestra sin que el ácido nítrico y el peróxido de hidrógeno generen interferencias adicionales en la determinación de los analitos.

5.6 Selectividad.

De acuerdo a la guía EURACHEM ⁽¹⁵⁾ la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés. Una prueba objetiva de que el analito está siendo cuantificado adecuadamente es el porcentaje de recuperación. En la Tabla 23 de la sección 5.5 se puede observar que la recuperación para V y Mn es 91.98% y 86.26%, respectivamente. De acuerdo con la AOAC ⁽⁶⁾ (*Association of Official Agricultural Chemists*) los límites de recuperación cuando se trabaja con concentraciones del orden de partes por millón y partes billón ($\mu\text{g/g}$ y $\mu\text{g/kg}$) son 80-115% y 70-125%, respectivamente. Teniendo en cuenta que las recuperaciones para los dos analitos están dentro de los límites propuestos por la AOAC, se puede afirmar que el método analítico es selectivo ya que los analitos (V y Mn) se cuantificaron satisfactoriamente.

5.7 Exactitud. Ésta se mide a través de la veracidad y la precisión ⁽¹⁵⁾.

5.7.1 Veracidad.

La veracidad es el sesgo que la media de una serie de medidas presenta con respecto del valor verdadero. Para el caso de Mn se calcula el promedio de las concentraciones del analito encontradas experimentalmente en la muestra sólida (ver Tabla 22) y se contrasta contra el valor certificado, de acuerdo a la *ecuación 18*.

$$\text{sesgo} = \bar{C}_{\text{experimental}} - C_{\text{teórica}} \quad \text{ecuación 18}$$

Donde $\bar{C}_{\text{experimental}}$ es el promedio de las concentraciones del analito encontradas experimentalmente y $C_{\text{teórica}}$ es la concentración reportada en el certificado del MRC.

Dado lo anterior y los valores de la Tabla 22, se tiene lo siguiente:

$$\text{sesgo}_{\text{Mn}} = -1.44 \text{ mg/kg}$$

El signo negativo del sesgo quiere decir que el error se debe a una deficiencia en la cuantificación de Mn en el MRC.

Para el caso del V se determinó la concentración de V en 6 muestras adicionadas e independientes. Las adiciones hechas tienen diferente concentración por lo que no tiene sentido determinar el sesgo en la muestra sólida, sin embargo, las diluciones *IN SITU* (soluciones que se leyeron en el ICP-MS) se prepararon de tal forma que las concentraciones de V fueran muy parecidas (ver Tabla 21) por lo que para medir el sesgo del método en la determinación de V se hizo un promedio de las concentraciones teóricas de V en las soluciones *IN SITU* y un promedio de las concentraciones experimentales de V en las mismas disoluciones. Dado lo anterior y los resultados de la Tabla 21, se tiene lo siguiente.

$$\text{sesgo}_{\text{V}} = -1.96 \text{ } \mu\text{g/L}$$

El signo negativo del sesgo quiere decir que el error se debe a una deficiencia en la cuantificación de V en el MRC.

5.7.2 Precisión.

Se determina la precisión de repetibilidad (precisión más pequeña esperada) la cual da una idea de la variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo determinado y en periodos de tiempo cortos. Para determinar la precisión repetibilidad en la cuantificación de Mn, se calculó el promedio y la desviación estándar

de las concentraciones determinadas experimentalmente en la muestra sólida con los datos presentados en la Tabla 22. Se presenta la concentración promedio experimental de Mn y su desviación estándar expandida con un factor de cobertura, $k=2$, para un nivel de confianza del 95% como medida de la precisión.

$$[\text{Mn}] = (9.02 \pm 0.35) \text{ mg/kg}$$

Para determinar la precisión de repetibilidad en la cuantificación de V se calculó el promedio de concentraciones en las disoluciones *IN SITU* y su desviación estándar, pues como se dijo anteriormente, no tiene sentido calcular la precisión en otra solución (en la solución digerida, por ejemplo) o en la muestra sólida ya que son muestras con adiciones de V muy diferentes y no se tendría una medida adecuada de la precisión en esos puntos. De acuerdo a los datos en la Tabla 21 se calcula el promedio de concentraciones en la disolución *IN SITU* y se expresa con su desviación estándar expandida con un factor de cobertura, $k=2$, para un nivel de confianza del 95% como medida de la precisión de repetibilidad.

$$[\text{V}] = (22.40 \pm 1.83) \text{ } \mu\text{g/L}$$

5.8 Sensibilidad.

Ésta es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito ⁽¹⁵⁾. Según esta definición, la sensibilidad sería la pendiente de la curva de calibración utilizada, pero hay que tener en cuenta que se trabajó con el método del estándar interno. Si se reporta la sensibilidad como las pendientes de las curvas de calibración no se estaría tomando en cuenta que en el eje de las ordenadas se tiene al cociente de las intensidades de señal del analito entre el E.I. lo cual no estaría de acuerdo con la definición anterior. La sensibilidad puede calcularse de dos formas, que son esencialmente iguales. La primera de ellas es a partir de las pendientes de las curvas de calibración utilizadas para reportar el intervalo lineal (gráficas 10, 12, 14, 16, 18 y 20), puesto que se sabe que la pendiente de esas curvas de calibración tiene la forma de la ecuación 19.

$$m = \frac{\Delta I_A}{\bar{I}_{E.I.} * \Delta[A]} \quad \text{ecuación 19}$$

Donde ΔI_A es el cambio en la intensidad de señal provocada por el analito, $\Delta[A]$ es el cambio en la concentración del analito e $\bar{I}_{E.I.}$ es el promedio de intensidades de señal provocadas por el estándar interno, se trata del promedio porque la pendiente es un parámetro que caracteriza a toda la línea recta y no exclusivamente en un punto de la misma. De la ecuación 19 es fácil notar que la relación que realmente indica la sensibilidad es la que se presenta en la ecuación 20, por lo que la multiplicación (de acuerdo a la ecuación 21) de la pendiente de una curva de calibración por el promedio

de intensidades de señal provocadas por el E.I. sería la forma adecuada de encontrar la verdadera sensibilidad que el ICP-MS tiene para cada analito.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\Delta I_A}{\Delta[A]} \quad \text{ecuación 20}$$

$$\text{sensibilidad} = \frac{\Delta I_A}{\bar{I}_{E.I.} * \Delta[A]} * \bar{I}_{E.I.} = m * \bar{I}_{E.I.} \quad \text{ecuación 21}$$

Otra forma de calcular la sensibilidad es a través de la gráfica de I_A vs $[A]$, es decir, sin el uso de E.I. para elaborar la gráfica. La pendiente de dicha curva sería, efectivamente, la sensibilidad. El problema de esta forma de calcular la sensibilidad es que se haría con una curva de calibración que no necesariamente es lineal, ya que la deriva instrumental es corregida por la presencia del E.I.

En la Tabla 24 se muestran los resultados de sensibilidad calculados en las tres curvas presentadas para cada analito con el fin de establecer el intervalo lineal. Se calcularon según la ecuación 21.

Tabla 24. Sensibilidad del equipo para los dos analitos.

Analito	sensibilidad (cps*L/μg)			
	curva 1	curva 2	curva 3	promedio
Mn	834.205	814.004	867.950	838.720
V	958.689	890.723	852.367	900.593

5.9 Robustez.

Para evaluar la robustez, y de acuerdo con la guía EURACHEM, se deben aplicar variaciones deliberadas al método con el fin de evaluar su efecto sobre la precisión y la exactitud (pruebas de robustez). Las variaciones deben hacerse sobre los puntos que son más importantes durante el procedimiento analítico. Uno de los puntos importantes durante la aplicación del presente método analítico es el proceso de digestión por lo que se realizó la digestión del Material de Referencia Certificado (*Bovine Liver Solution*, High - Purity Standards, lote: 529004. **VER ANEXO III**) en dos hornos de microondas diferentes (MILESTONE y CEM). Se utilizaron los mismos programas de digestión que los utilizados para las muestras, es decir, los especificados en las tablas 5 y 6.

Debido a que la concentración de V en el Material de Referencia Certificado (529004, HPS) es muy pequeña ⁽²⁷⁾ (Abajo del límite de detección considerando las cantidades utilizadas y las diluciones hechas), se hicieron adiciones conocidas de V a dos de los seis vasos del horno de microondas MILESTONE y a 4 de los vasos del horno de

microondas CEM. También se hicieron adiciones conocidas de Mn sobre el MRC (529004, HPS) ya que éste MRC tiene 7 años de antigüedad y posiblemente estaría degradado. Las adiciones de Mn se hicieron sobre los mismos vasos que las adiciones de V en los dos hornos de microondas. En la Tabla 25 se muestran las concentraciones promedio de los analitos determinadas experimentalmente, se muestran los resultados para las muestras de MRC (529004, HPS) con adición y sin adición. En la Tabla 26 se muestran los porcentajes de recuperación promedio obtenidos para cada analito y para cada horno de microondas. En las tablas 25 y 26 la abreviación N.D. quiere decir no detectable y significa que las concentraciones encontradas experimentalmente están por abajo del límite de cuantificación (LoQ).

Tabla 25. Concentraciones experimentales promedio de los analitos en las muestras de MRC (529004, HPS) digeridas con los dos hornos de microondas.

	Concentración experimental promedio ($\mu\text{g/L}$)			
	MRC sin adición		MRC adicionadas	
Horno	V	Mn	V	Mn
CEM	N.D.	4.44	106.69	85.02
MILESTONE	N.D.	4.71	94.13	83.13
LoQ (V)=2.503 $\mu\text{g/L}$				

Tabla 26. Recuperaciones promedio de los analitos en las muestras de MRC (529004, HPS) digeridas con los dos hornos de microondas.

	Recuperación promedio (%)			
	MRC sin adición		MRC adicionadas	
Horno	V	Mn	V	Mn
CEM	N.D.	90.83	105.97	84.90
MILESTONE	N.D.	90.82	97.38	86.43
LoQ (V)=2.503 $\mu\text{g/L}$				

De los resultados de recuperación mostrados en la tabla anterior se puede afirmar que ambos sistemas de digestión funcionan adecuadamente, ya que el error relativo es menor al 15% en todos los casos lo cual concuerda con los límites propuestos por la AOAC ⁽⁶⁾. Además, con base en las recuperaciones promedio obtenidas en las muestras de MRC sin adición, se puede asegurar que el Material de Referencia Certificado Bovine Liver Solution (lote: 529004, High-Purity Standards) no se ha degradado.

En las tablas 27 y 28 se muestra los resultados para el cálculo de la veracidad y la precisión en la determinación de V y Mn en MRC (529004, HPS) que fue digerido en los dos hornos de microondas (MILESTONE y CEM).

Tabla 27. Resultados del cálculo de la veracidad en la determinación de V y Mn en MRC (529004, HPS) digerido en dos hornos de microondas.

	Sesgo (µg/L)			
	MRC sin adición		MRC adicionadas	
Horno	V	Mn	V	Mn
CEM	N.D.	-0.61	6.05	-15.12
MILESTONE	N.D.	-0.47	-5.10	-13.12
LoQ (V)=2.503 µg/L				

Tabla 28. Resultados para el cálculo de la precisión en la determinación de V y Mn en MRC (529004, HPS) digerido en dos hornos de microondas. Los resultados presentados son un promedio con su respectiva desviación estándar expandida por un factor de cobertura, k=2, para un nivel de confianza del 95%.

	Precisión (µg/L)			
	MRC sin adición		MRC adicionadas	
Horno	V	Mn	V	Mn
CEM	N.D.	4.44±0.81	106.69±13.20	85.02±8.52
MILESTONE	N.D.	4.71±0.64	94.12±0.27	83.13±0.98
LoQ (V)=2.503 µg/L				

Como puede observarse en la Tabla 27 la veracidad no se ve afectada por el uso de diferentes hornos de microondas para llevar a cabo el proceso de digestión. Los sesgos observados para ambos analitos tienen magnitudes similares. El analito que presenta un mayor sesgo es el Mn y es también el que presenta un porcentaje de recuperación menor, como puede verse en la Tabla 26, sin importar cual horno de microondas fue utilizado para el proceso de digestión. De igual forma en la Tabla 28 se puede observar que el hecho de usar el horno de microondas MILESTONE para hacer la digestión del MRC aporta una mayor precisión a la cuantificación de los analitos pero el uso del horno de microondas CEM también tiene una precisión adecuada y, como puede verse en la Tabla 26, las recuperaciones obtenidas son similares sin importar cual horno de microondas se utilice.

5.10 Deriva instrumental.

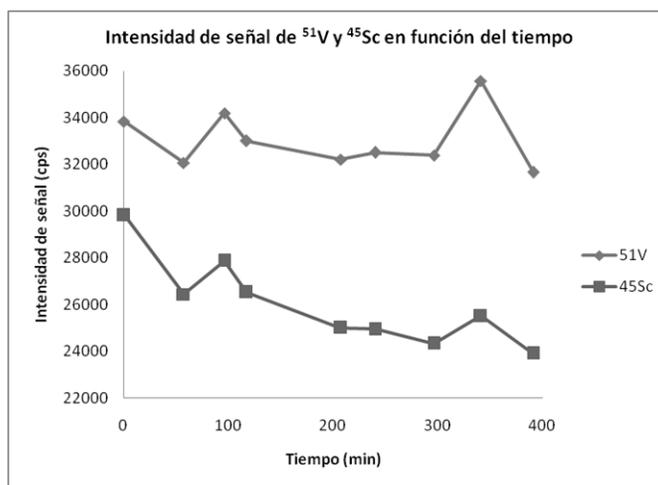
Los resultados de recuperación mostrados en la sección 5.5 son suficientes para afirmar que ^{45}Sc y ^{104}Ru son los mejores isótopos para ser usados como estándares internos en la determinación de V y Mn, respectivamente. Sin embargo, se preparó una disolución de V, Mn, Sc y Ru que fue leída en el ICP-MS a diferentes tiempos con el fin de evaluar el comportamiento de las señales como función del tiempo. En la Tabla 29 se muestran las concentraciones de cada uno de los elementos en la disolución.

Tabla 29. Concentración de cada sustancia química en la solución para monitorear la deriva instrumental.

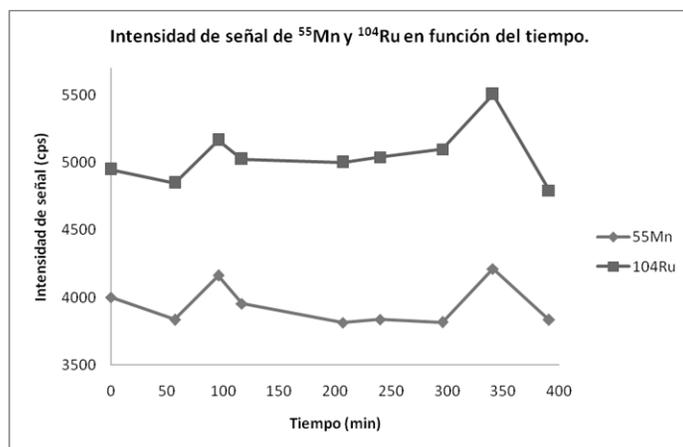
Sustancia	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
V	37.82
Mn	4.19
Sc	19.45
Ru	20.37

Las concentraciones mostradas en la Tabla 29 son diferentes por que cada sustancia genera una intensidad de señal muy diferente en el ICP-MS y con el fin de poder hacer una comparación efectiva entre los E.I. propuestos y sus respectivos analitos se agregaron cantidades adecuadas para que las respuestas generadas en el ICP-MS fueran parecidas o al menos tuvieran el mismo orden de magnitud.

En las gráficas 22 y 23 se muestran las intensidades de señal de ^{51}V con ^{45}Sc y ^{55}Mn con ^{104}Ru , respectivamente, en función del tiempo.



Gráfica 22. Intensidad de señal de ^{51}V y ^{45}Sc en función del tiempo.

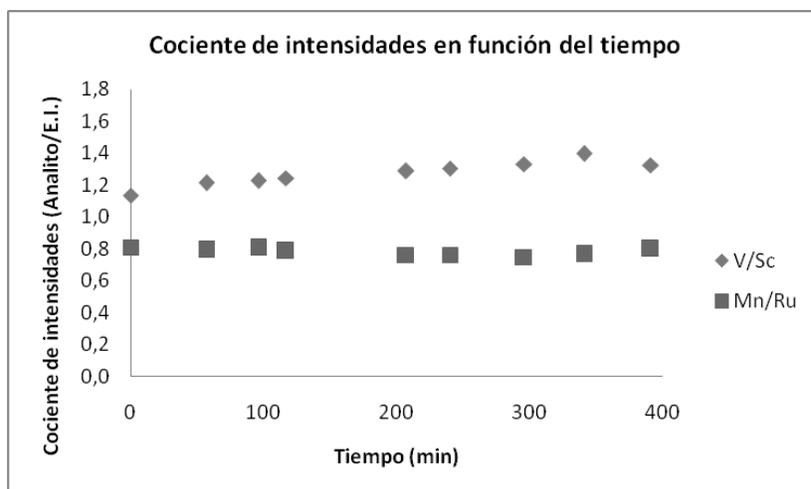


Gráfica 23. Intensidad de señal de ^{55}Mn y ^{104}Ru en función del tiempo.

En la Gráfica 22 puede notarse que el aumento o disminución de la intensidad de señal en función del tiempo (deriva instrumental) es igual para ambos isótopos, es decir, el ^{51}V y el ^{45}Sc tienen un comportamiento similar en el ICP-MS por lo que el ^{45}Sc es un buen E.I. para la cuantificación de V ya que al comportarse de manera parecida el cociente entre sus intensidades se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo como se muestra en la Tabla 30 y en la Gráfica 24. Por otro lado en la Gráfica 23 se puede observar que la intensidad de señal del ^{55}Mn y del ^{104}Ru varían aproximadamente de la misma forma a lo largo del tiempo, lo anterior también indica que el ^{104}Ru es un buen E.I. para la cuantificación de Mn pues se comporta de manera similar, es decir, el cociente de sus intensidades se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo, como puede verse en la Tabla 30 y en la Gráfica 24.

Tabla 30. Cociente de intensidades en función del tiempo.

tiempo (min)	Cociente de intensidades de señal.	
	V/Sc	Mn/Ru
0	1.1	0.8
57	1.2	0.8
96	1.2	0.8
117	1.2	0.8
207	1.3	0.8
240	1.3	0.8
296	1.3	0.7
341	1.4	0.8
391	1.3	0.8



Gráfica 24. Cociente de intensidades (Analito/E.I.) en función del tiempo.

De acuerdo a los cálculos presentados desde la sección 5.1 hasta la 5.10 se presenta la Tabla 31 la cual contiene un resumen con los parámetros obtenidos. Además se puede decir que el método es selectivo según los resultados mostrados en la sección 5.6 y robusto de acuerdo con los valores mostrados en la sección 5.9

Tabla 31. Resumen, parámetros de desempeño.

Parámetro	Analito	
	Manganeso	Vanadio
Límite de detección (LoD)	0.114 µg/L	1.889 µg/L
Límite de cuantificación (LoQ)	0.159 µg/L	2.503 µg/L
Intervalo lineal	0.159 - 297.300 µg/L	2.503 - 298.026 µg/L
Intervalo de trabajo	0.159 - 67.025 µg/L	2.503 - 66.663 µg/L
Recuperación	86.26 ± 3.36 %	91.98 ± 9.10 %
Veracidad	- 1.44 mg/kg	- 1.96 µg/L
Precisión	9.02 ± 0.35 mg/kg	22.40 ± 1.83 mg/kg
Sensibilidad	838.720 cps*L/µg	900.593 cps*L/µg

5.11 Aplicación del método analítico desarrollado a muestras reales.

Una vez optimizada la parte instrumental de la metodología se procede a determinar los analitos de interés en las muestras reales. Las muestras recibieron el tratamiento físico y químico descrito en la sección 4.3.2 y 4.3.2.2, respectivamente. También fueron diluidas gravimétricamente según el procedimiento descrito en la sección 4.3.3 antes de ser introducidas al equipo ICP-MS para su lectura.

Matrices: Pulmón, riñón, testículo, bazo, hígado y timo de ratón de laboratorio.

Analitos: V y Mn.

Técnica: Espectrometría de Masas.

Equipo: Espectrómetro de Masas – Plasma Acoplado por Inducción.

Estándares Internos: ^{45}Sc y ^{104}Ru .

Primero se introducen los blancos reactivos de cada serie y en seguida las soluciones con las muestras reales, empezando por las más diluidas y terminando con las más concentradas. Como se dijo anteriormente el equipo entrega un informe para cada solución en el cual se reportan las Intensidades Medidas Promedio (M.I.M. por sus siglas en inglés) de cada isótopo como puede observarse en la Ilustración 9.

Sample Information				
Report Title: QUANTITATIVE ANALYSIS REPORT				
Sample Date/Time: Wednesday, April 24, 2013 16:20:06				
Sample ID: 20-8-1				
Method File: C:\Elandata\Method\HGRLZ\HGRLZtejidos171020123reprocmthmoenosisotopos.mth				
Dataset File:				
Measurement Unit: cps				
Number of Replicates: 3				
Summary				
Meas. Intens.	MeanMassAnalyte	Conc. Mean	Net Intens. Mean	Meas. Intens. RSD
35060.815	45Sc		35060.815	0.776
9255.710	55Mn		9255.710	1.601
7328.953	51V		7328.953	0.377
12953.890	63Cu		12953.890	1.235
5906.679	104Ru		5906.679	2.036
44803.396	64Zn		44803.396	1.063

Ilustración 9. Reporte entregado por el ICP-MS para cada solución.

Se presenta el cálculo de la solución “20-8-1” de la Ilustración 9 como ejemplo de la determinación de la concentración de uno de los analitos.

Ejemplo: Cálculo de la concentración de Mn en la solución “20-8-1”, como puede observarse en la Ilustración 9, para el analito ^{55}Mn el equipo (ICP-MS) reportó una M.I.M (Measurement Intensity Mean o Intensidad Medida Promedio) de 9255.710 cps y para su E.I. ^{104}Ru una intensidad de 5906.679 cps.

Se hace el cociente de la intensidad promedio del analito entre la intensidad promedio del E.I.

$$\frac{I_A}{I_{E.I.}} = \frac{9255.710}{5906.679} = 1.567 \quad \text{ecuación 22}$$

El valor del cociente obtenido se compara con su respectiva curva de calibración (curva de calibración de ^{55}Mn con ^{104}Ru), en este caso dicha curva de calibración es la que se presenta en la *ecuación 23*.

$$\frac{I_A}{I_{E.I.}} = 0.168[\text{Mn}] + 0.074 \quad \text{ecuación 23}$$

Como puede observarse, el cociente obtenido en la *ecuación 22* corresponde al término del lado izquierdo de la *ecuación 23*, sustituyendo el valor del cociente de la *ecuación 22* en la *ecuación 23* y despejando la concentración de manganeso se obtiene lo escrito en la *ecuación 24*, la cual proporciona la concentración de manganeso en la disolución *IN SITU*, es decir la solución que se introdujo al equipo.

$$[\text{Mn}] = \frac{1.567 - 0.074}{0.168 \text{ L}/\mu\text{g}} = 8.887 \mu\text{g/L} \quad \text{ecuación 24}$$

Puesto que la pendiente de la curva de calibración tiene unidades de L/ μg , el resultado obtenido en la *ecuación 24* tiene unidades de $\mu\text{g/L}$. Esta concentración todavía tiene que ser corregida por el blanco de reactivos para lo cual se resta el promedio de la concentración de Mn en los blancos reactivos ($[\text{Mn}] = 0.925 \mu\text{g/L}$) de la serie a la cual pertenece la muestra. Con lo anterior la concentración de manganeso en la solución "20-8-1" es de $7.962 \mu\text{g/L}$. Con esta concentración y con el factor de dilución (1.9673) se obtiene la concentración del analito en la muestra "digerida" de acuerdo a las ecuaciones 25 y 26.

$$[\text{Mn}]_{\text{digerida}} = fd * [\text{Mn}]_{\text{IN SITU}} \quad \text{ecuación 25}$$

$$[\text{Mn}]_{\text{digerida}} = 1.9673 * (7.962 \mu\text{g/L}) = 15.664 \mu\text{g/L} \quad \text{ecuación 26}$$

Una vez conocida la concentración digerida y conociendo la masa de la muestra sólida (0.0089 g), se reporta la concentración del analito, Mn, en la muestra sólida de acuerdo a las ecuaciones 27 y 28.

$$[\text{Mn}]_{\text{sólida}} = [\text{Mn}]_{\text{digerida}} \left(\frac{\text{Volúmen de aforo (mL)}}{\text{masa de muestra (g)}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) \quad \text{ecuación 27}$$

$$[\text{Mn}]_{\text{sólida}} = 15.664 \mu\text{g/L} * \left(\frac{5.00 \text{ mL}}{0.0089 \text{ g}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 8.80 \mu\text{g/g} \quad \text{ecuación 28}$$

Siguiendo este sencillo procedimiento se calcularon las concentraciones de Mn y V en cada una de las 146 muestras.

Se determinó la concentración de V y Mn en 6 tejidos de ratón diferentes (como se especificó en la página 59).

En la Tabla 32 se pueden observar los intervalos de concentración encontrados en cada uno de los tejidos. En la tabla 32 la abreviación N.D. quiere decir no detectable y significa que las concentraciones encontradas experimentalmente están por abajo del límite de cuantificación (LoQ).

Tabla 32. Intervalo de concentración de los analitos en cada uno de los tejidos de ratón.

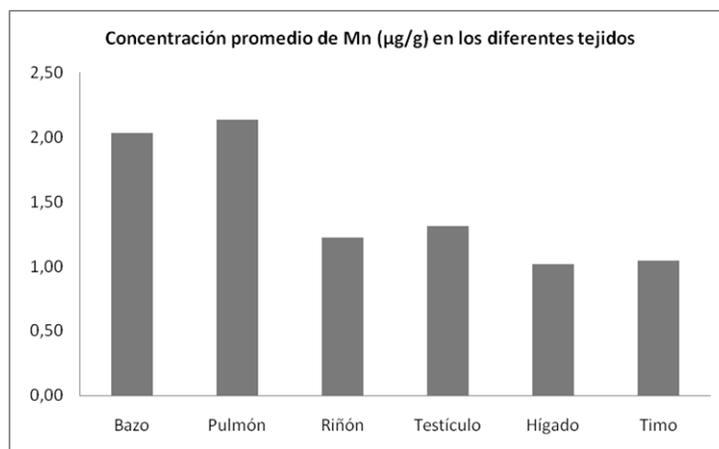
Tejido	Intervalo de concentraciones ($\mu\text{g/g}$)	
	Mn	V
Bazo	0.08 - 4.05	0.12 - 3.79
Pulmón	0.18 - 8.78	0.38 - 6.78
Riñón	0.10 - 2.46	0.50 - 2.84
Testículo	0.44 - 2.40	N.D. -3.73
Hígado	0.04 - 2.13	0.04 - 2.64
Timo	N.D. - 1.79	N.D. - 1.54
LoQ (Mn)=0.159 $\mu\text{g/L}$ LoQ (V)=2.503 $\mu\text{g/L}$		

En la Tabla 33 se muestran los promedios de concentración obtenidos para cada analito en cada uno de los diferentes tejidos.

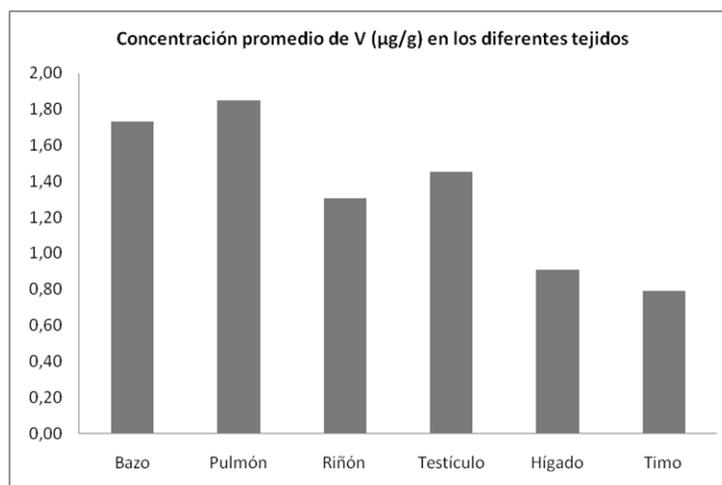
Tabla 33. Concentración promedio de los analitos en cada uno de los diferentes tejidos.

Tejido	Promedio de concentración ($\mu\text{g/g}$)	
	Mn	V
Bazo	2.03	1.73
Pulmón	2.14	1.85
Riñón	1.23	1.30
Testículo	1.31	1.45
Hígado	1.01	0.91
Timo	1.05	0.79

En las gráficas 25 y 26 se muestran las concentraciones promedio de los analitos en las diferentes muestras.



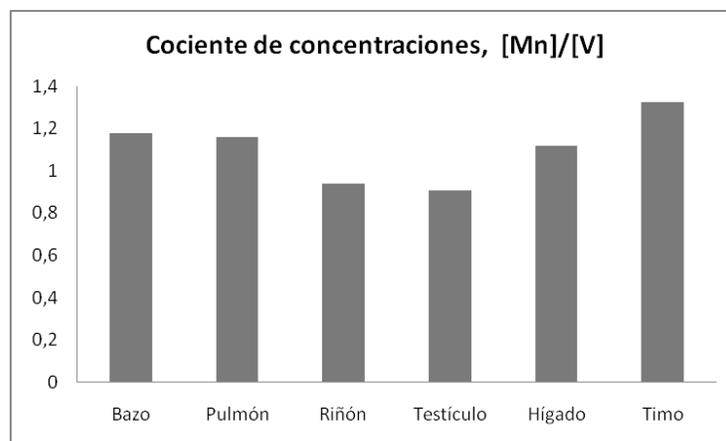
Gráfica 25. Concentración promedio de Mn en los diferentes tejidos.



Gráfica 26. Concentración promedio de V en los diferentes tejidos.

Como puede observarse en la Gráfica 25 los tejidos que presentan una mayor concentración de Mn son el bazo y el pulmón de los ratones de laboratorio, el tejido que tiene la menor concentración de Mn es el hígado. En el caso del V los tejidos que presentan una mayor concentración son, también, el bazo y el pulmón y el tejido que presenta una menor concentración de V es el timo, según la Gráfica 26.

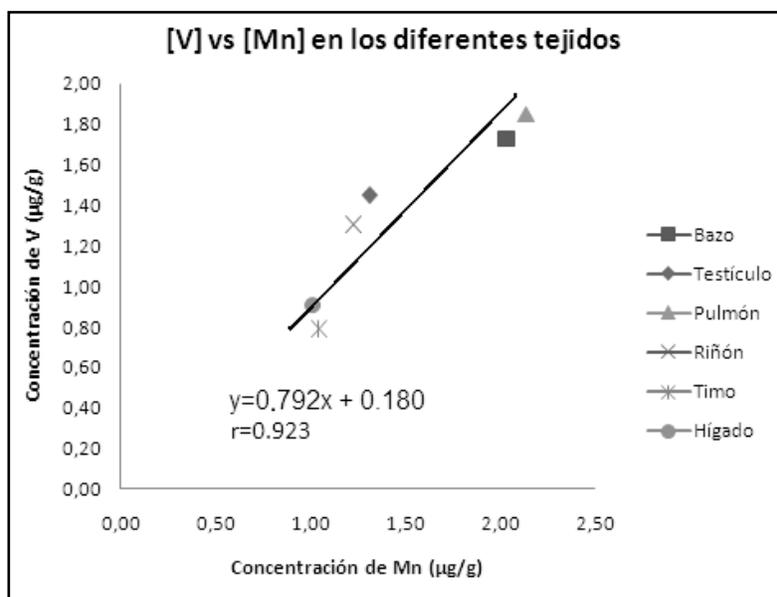
En la Gráfica 27 se muestran los cocientes de las concentraciones promedio de los analitos, $[Mn]/[V]$.



Gráfica 27. Cociente de las concentraciones promedio de los analitos en los diferentes tejidos.

En la Gráfica 27 se puede observar que el cociente de las concentraciones promedio es muy parecido en todos los tejidos, es decir, que todos los tejidos tienen la misma proporción de concentraciones de los analitos, en estos casos la proporción es cercana a la unidad.

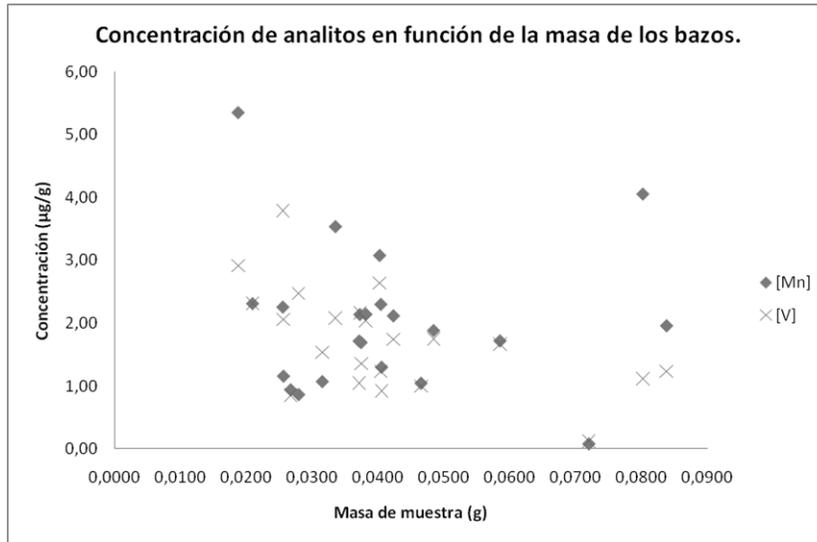
En la Gráfica 28 se muestran las concentraciones promedio de V como función de las concentraciones promedio de Mn para cada uno de los tejidos.



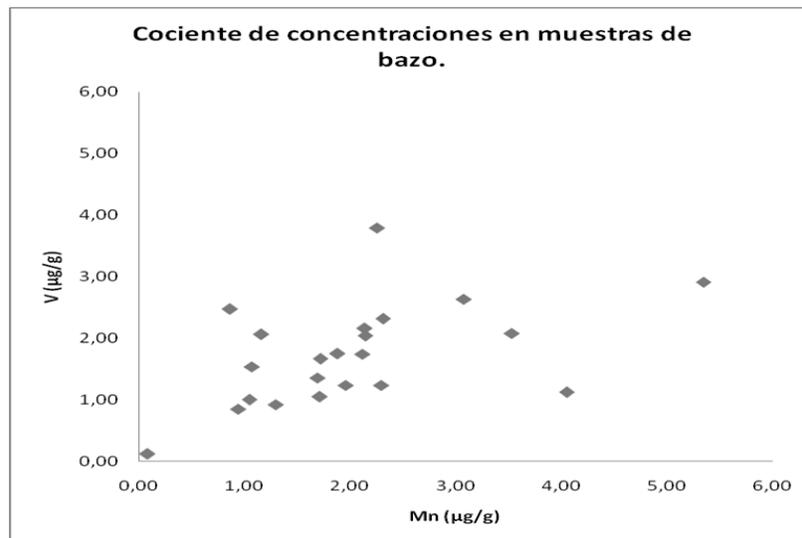
Gráfica 28. Concentración de V como función de la concentración de Mn en los diferentes tejidos.

En la Gráfica 28 se percibe que los tejidos que tienen una mayor cantidad de Mn tienen, también, una mayor cantidad de V. La recta de tendencia lineal tiene un coeficiente de correlación, r , de 0,923 lo cual apoya la afirmación anterior.

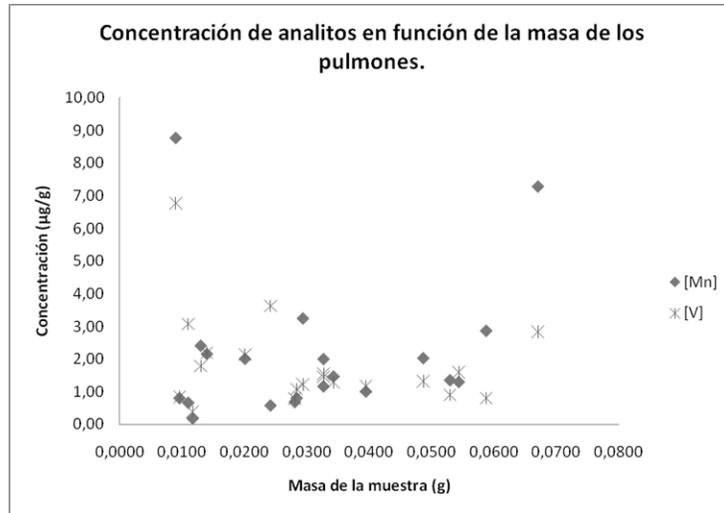
A continuación se presentan dos gráficas por tejido. La primera es la concentración de los analitos en función de la masa de la muestra y la segunda es el cociente de los analitos en cada muestra.



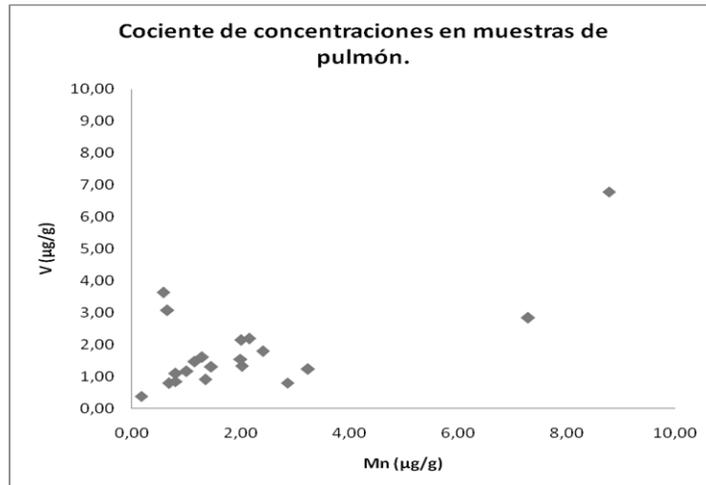
Gráfica 29. Concentración de analitos en función de la masa de los bazos.



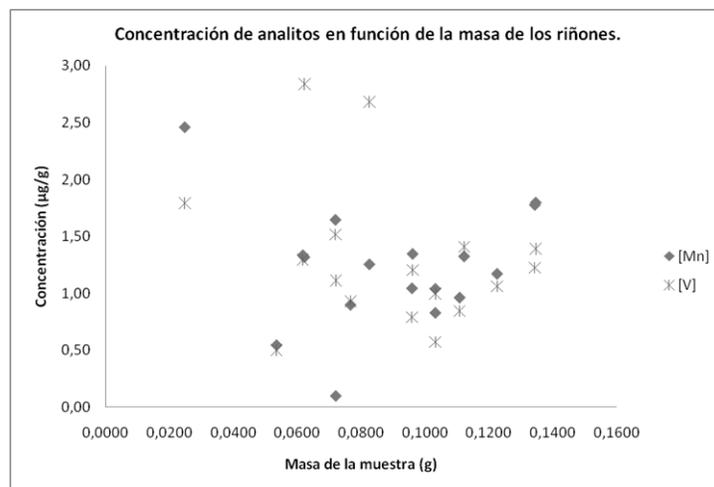
Gráfica 30. Cociente de las concentraciones de los analitos en las muestras de bazo.



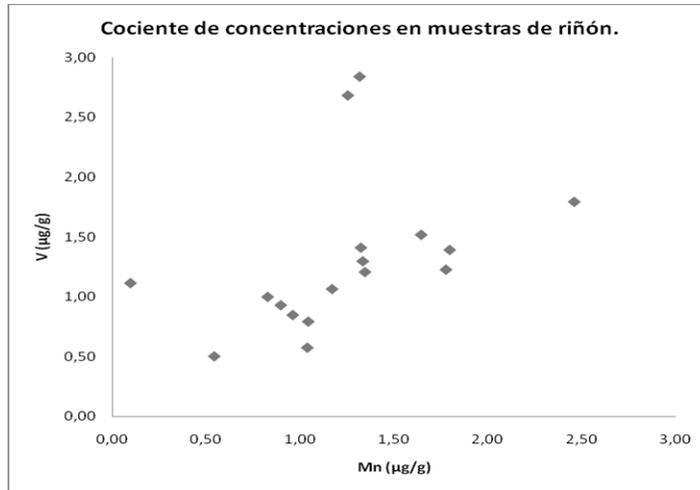
Gráfica 31. Concentración de analitos en función de la masa de las muestras de pulmón.



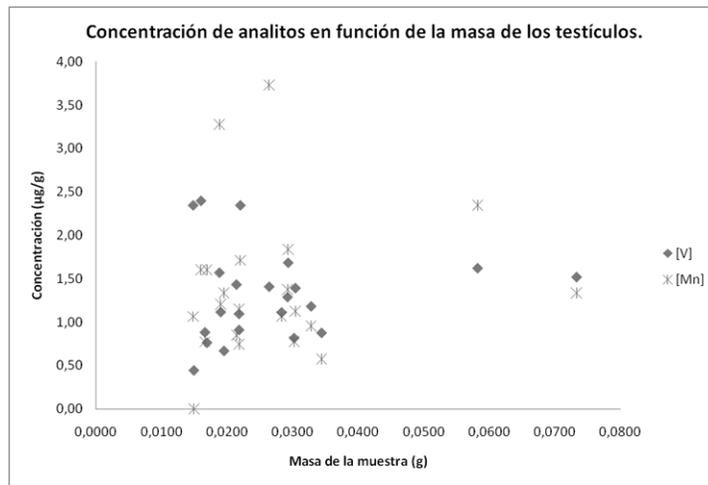
Gráfica 32. Cociente de las concentraciones de los analitos en las muestras de pulmón.



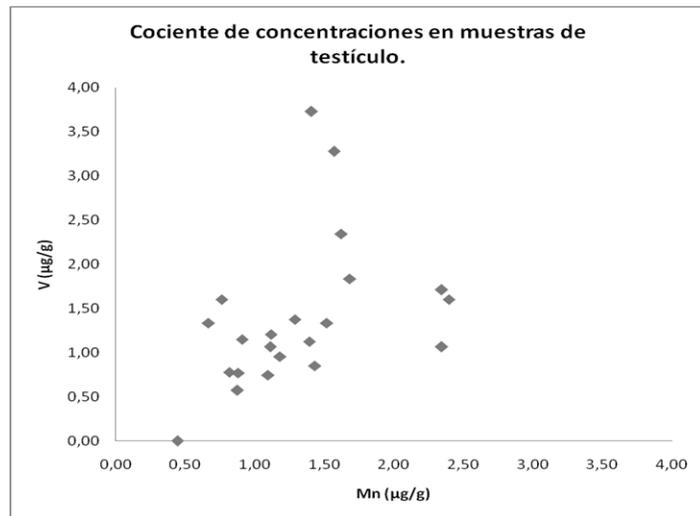
Gráfica 33. Concentración de analitos en función de la masa de las muestras de riñón.



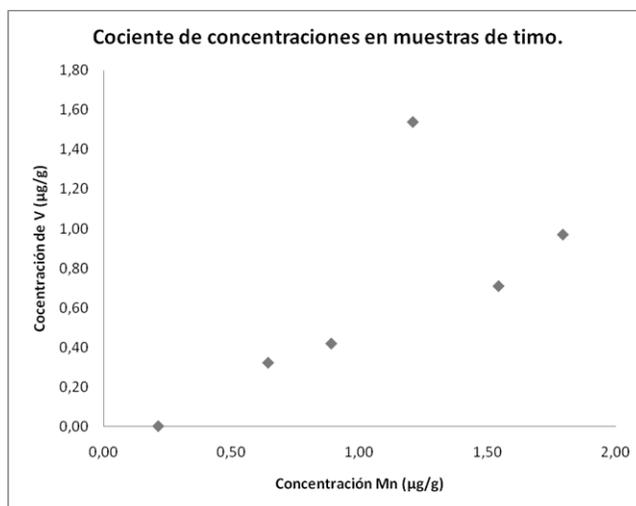
Gráfica 34. Cociente de las concentraciones de los analitos en las muestras de riñón.



Gráfica 35. Concentración de analitos en función de la masa de las muestras de testículo.



Gráfica 36. Cociente de las concentraciones de los analitos en las muestras de testículo.



Gráfica 40. Cociente de las concentraciones de los analitos en las muestras de timo.

Como puede verse en las gráficas 29, 31, 33, 35 y 39 no parece haber relación alguna entre la concentración de los analitos con la masa de las muestras. En la gráfica 37 es claro que la concentración de analitos (V y Mn) decrece como función de la masa de las muestras de hígados.

En las gráficas 30, 32, 34, 36, 38 y 40 parece haber una tendencia, que no es muy clara, pero indica que las muestras con mayor contenido de Mn tienen un contenido mayor de V. Esta tendencia apoya la afirmación de que, en promedio, las concentraciones de analitos eran proporcionales y que los tejidos que tenían una mayor concentración de Mn tenían, también, una mayor concentración de V.

6. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los datos obtenidos en la evaluación de los parámetros de desempeño analítico se puede asegurar que la metodología analítica desarrollada y descrita a lo largo de este documento es satisfactoria analíticamente, desde el tratamiento físico y químico de las muestras y del MRC hasta la determinación analítica mediante el ICP – MS. El método analítico desarrollado es susceptible de aplicarse sin problema sobre muestras biológicas, específicamente sobre tejidos de ratón (pulmón, riñón, testículo, hígado, bazo y timo).

Se reconoció la importancia de la adecuada limpieza del material utilizado y se demostró que este procedimiento fue llevado a cabo de manera correcta.

Se demostró que el tratamiento químico hecho sobre las muestras y el Material de Referencia Certificado destruye la materia orgánica y libera a la solución digerida los metales contenidos en la muestra sin que los ácidos utilizados generen interferencias

adicionales en la determinación. También se puede asegurar que el empleo de equipos de microondas para digestión por vía húmeda diferentes, no afecta al buen desempeño del tratamiento químico.

La dilución es una forma de reducir la concentración de los componentes de la muestra y por tanto ayuda a disminuir las posibles interferencias asociadas con la matriz. Por otro lado el empleo de la dilución gravimétrica aumenta la precisión con la que se determinan los factores de dilución los cuales son muy importantes para la determinación de la concentración de los analitos en las muestras.

Se puede afirmar que el método del E.I. es una solución adecuada para corregir la deriva instrumental. Los isótopos ^{45}Sc y ^{104}Ru se comportan de manera similar a sus respectivos analitos (^{51}V y ^{55}Mn) dentro del ICP – MS. Una de las formas de buscar los E.I. adecuados es a través de la comparación de las energías de ionización y las masas isotópicas de los posibles E.I. con las de los analitos, sin embargo solamente se puede tener certeza de que el E.I. se comporta adecuadamente hasta que se observa de manera experimental, como es el caso del ^{104}Ru que tiene una energía de ionización parecida a la del ^{55}Mn (711.0 kJ/mol y 717.4 kJ/mol, respectivamente) pero que no tiene una masa isotópica similar.

Con el flujo adecuado del gas nebulizador se pueden minimizar satisfactoriamente las interferencias poliatómicas debidas a especies moleculares o a especies doblemente cargadas. Esto se midió a través de los cocientes $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ y $^{138}\text{Ba}^{2+} / ^{138}\text{Ba}^+$ caracterizados a diferentes flujos del gas nebulizador. Por lo anterior se puede decir que se lograron optimizar las condiciones instrumentales bajo las cuales se debe trabajar con el ICP – MS para realizar adecuadamente la determinación de vanadio y manganeso en matrices biológicas usando el método del estándar interno (E.I.).

Dado lo anterior se puede hablar del exitoso empleo de equipos muy avanzados tecnológicamente, como lo es el ICP – MS, para la determinación de analitos en concentraciones muy bajas y con una calidad analítica adecuada.

Por tanto se puede afirmar que se conoce adecuadamente el funcionamiento del ICP-MS por lo que se pudo desarrollar satisfactoriamente una metodología analítica adecuada para las muestras reales. Se notó la importancia de tener limpios los conos de níquel, muestreador y discriminador, ya que éstos pueden acumular contaminantes que obstruyan el paso de la muestra hacia el analizador de masas. También es importante cambiar periódicamente las mangueras capilares que son parte del sistema de introducción de muestra ya que éstas pierden su tensión con el tiempo y el sistema de introducción de muestras deja de funcionar correctamente. Estos detalles importantes permitieron que también se pudiera aplicar satisfactoriamente el método analítico en muestras reales. Es importante hacer notar que la interpretación de los resultados en las

muestras reales no es del interés de este documento, lo importante es demostrar que se puede aplicar el método desarrollado para la determinación de los analitos (V y Mn) sin contratiempos.

Pese a que las muestras reales eran muy pequeñas se logró realizar la determinación de los dos analitos en la gran mayoría de ellas. El hecho de poder hacer análisis químico en cantidades de muestra muy pequeñas, sobre todo cuando las muestras son únicas, es analíticamente muy importante.

En cuanto a las muestras se puede decir que los tejidos que presentan una mayor concentración promedio de Mn y V son el bazo y el pulmón mientras que el hígado y el timo presentan la menor concentración promedio de ambos analitos. La relación que hay entre las concentraciones promedio de los analitos en las muestras es muy cercana a la unidad, es decir, aproximadamente hay la misma cantidad de V que de Mn en las muestras.

En la literatura se reporta que la concentración promedio de Mn en tejidos de mamífero está entre 0.3 – 2.9 $\mu\text{g/g}$ ⁽⁷⁾. Las concentraciones promedio de Mn encontradas experimentalmente, caen dentro del rango reportado en la literatura.

Puesto que el V es considerado un metal tóxico para los seres humanos, y algunos animales, no se tienen bien caracterizadas las concentraciones promedio en los tejidos analizados en el presente trabajo.



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1577c

Bovine Liver

Standard Reference Material (SRM) 1577c consists of tissue derived from healthy steers. The material was collected and prepared under strict protocols designed to preserve the original composition, and to minimize contamination. SRM 1577c is intended primarily for use in evaluating the accuracy of analytical methods for selected elements in animal tissues and other biological materials. A unit of the SRM consists of one bottle containing 20 g of freeze-dried liver powder.

Certified Values: Certified values for the mass fraction content of 20 elements are provided in Table 1. The certified values are based on results from either a primary analytical technique carried out at NIST, or the combined results from two or more chemically independent analytical techniques obtained at NIST and collaborating expert laboratories [1]. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1].

Reference Values: Reference values for the mass fraction content of eight additional elements are provided in Table 2. Reference values are non-certified values that are the best estimates of the true values. However, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1].

Information Values: Information values for the mass fraction content of two elements are provided in Table 3. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the SRM user, but for which insufficient information is available to assess adequately the uncertainty associated with the value, or is a value derived from a limited number of analyses [1].

Expiration of Certification: The certification of SRM 1577c is valid, within the measurement uncertainties specified, until **01 October 2018**, provided the SRM is handled in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Return of the attached registration card will facilitate notification.

The coordination of the investigations and technical measurements leading to the certification of this material was under the leadership of R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division.

Consultation on the statistical design of the experimental work and evaluation of the data was provided by S.D. Leigh of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the preparation of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 15 June 2009

Collection and preparation of SRM 1577c were performed by M.P. Cronise and C.N. Fales of the NIST Measurement Services Division, and E.A. Mackey, R.O. Spatz, and R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division. The bovine liver material was collected at Texas A&M University (College Station, TX) with the assistance of W.D. James of the Center for Chemical Characterization and Analysis, and R.R. Riley of the E.M. (Manny) Rosenthal Meat Science and Technology Center.

The technical measurements were performed by S.J. Christopher, R.R. Greenberg, S.E. Long, E.A. Mackey, K.E. Murphy, B.J. Porter, S.A. Rabb, R.O. Spatz, B.E. Tomlin, L.J. Wood, L.L. Yu, and R. Zeisler of the NIST Analytical Chemistry Division, and the following collaborating laboratories and analysts: China Institute of Atomic Energy, Beijing, China: C. Xiao, B. Ni, W. Tian; Massachusetts Institute of Technology, Nuclear Reactor Laboratory, Cambridge, MA: J. Che, L.-W. Hu; Nuclear Physics Institute ASCR, Rež, Czech Republic: J. Kučera; Texas A&M University, College Station, TX, Department of Chemistry: W.D. James and College of Veterinary Medicine: R.J. Taylor; University of São Paulo, Institute of Chemistry, São Paulo, Brazil: C.S. Nomura, P.V. Oliveira; and USDA Beltsville Agricultural Research Center, Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD: J. Harnly, E. Greene.

NOTICE AND WARNING TO USERS¹

Storage: The material should be stored in its original container at room temperature (10 °C to 30 °C). SRM 1577c should not be exposed to intense sources of radiation, including ultraviolet light from lamps or sunlight.

Handling: This material was derived from healthy steers. These animals were inspected by a Veterinary Medical Officer and did not show signs of infectious, contagious, and/or communicable disease. Normal caution and care should be exercised during the material's handling and use. Users should be aware of sources of contamination. To avoid contamination a Class 100 clean-air environment is recommended.

Instructions for Use: Prior to removal of test portions for analysis, the contents of the bottles should be mixed. The recommended minimum size is 100 mg; see "Homogeneity Assessment" below. The mass fractions of constituents in SRM 1577c are reported on a dry-mass basis. Desiccator drying over CaSO₄ (e.g., Drierite) to stable mass (approximately 10 days) is recommended.

PREPARATION AND ANALYSIS

Sample Collection and Preparation: The liver tissue was collected and processed under observation of principles for "true and representative" sampling as documented in the protocols for human and marine mammal tissues of the National Biomonitoring Specimen Bank [2]. The liver tissue was harvested from 31 steers that were slaughtered at Texas A&M University College of Veterinary Medicine. This material is intended for "in vitro" diagnostic use only. The supplier of this material has reported that this material was produced under sanitary conditions and was derived from clinically healthy animals. The animals were slaughtered for the purpose of teaching bovine anatomy and how to butcher. The meat from these animals was prepared for retail under the supervision of a State of Texas meat inspector to ascertain the health of the animals. The livers were excised whole, placed on a clean Teflon sheet, and inspected. Each liver was rinsed with HPLC-grade water to remove excess blood, bile, and any other extraneous material. The outer membrane and major blood vessels were removed with titanium blade knives, and the tissue was cut into portions of approximately 10 cm³; 120 kg of fresh tissue was obtained from this process, frozen in clean Teflon bags, and then shipped to NIST. The tissue was thawed and homogenized at NIST with a food processor equipped with titanium blades. The resulting paste was poured into glass trays, frozen, and lyophilized. The dry material was blended again in the food processor before being jet-milled. The resulting fine powder was radiation sterilized and bottled.

Homogeneity Assessment: The homogeneity of SRM 1577c was assessed by analyzing test portions of approximately 100 mg with high-precision instrumental neutron activation analysis (INAA).

Twelve bottles were randomly selected from the lot and two 100 mg test portions were taken for INAA from different locations in each bottle. The results for all elements reported by INAA (see Tables 1 and 2) did not reveal

any significant components of uncertainty due to heterogeneity; therefore the recommended minimum sample size is 100 mg. The values and uncertainties reported in this Certificate are valid for a 100 mg minimum sample size. Analysis of smaller amounts may be subject to additional uncertainties due to heterogeneity.

Analyses with solid-sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS) using test portions in the range of 20 µg to 70 µg showed homogeneity for distribution of Cd, Cu, Pb, and Zn within the uncertainty of the method. For 1 mg test portions, an uncertainty component from heterogeneity of 1 % to 2 % relative was estimated from the experimental data for these elements.

Analytical Approach: All elements for which certified and reference values are provided were determined by using at least one of the following methods carried out at NIST: INAA, radiochemical neutron activation analysis (RNAA), prompt gamma activation analysis (PGAA), pre-concentration and pre-separation neutron activation analysis (PNAA), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and ICP optical emission spectrometry (ICP-OES). NIST values for Cd, Pb, and Se were obtained by using isotope dilution (ID) ICP-MS, and for Hg by isotope dilution cold vapor (ID/CV) ICP-MS. The measurements were complemented by results provided by collaborating scientists from research laboratories using ICP-MS, ICP-OES, INAA, RNAA, and SS-GFAAS.

Certified Values and Uncertainties: Certified values were derived from the NIST analytical results and the results provided by collaborating laboratories. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty, with coverage factor 2 (approximately 95 % confidence). The reporting follows the ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements [3,4,5].

For each element, there is a NIST result with an uncertainty that is complete in terms of coverage of recognized sources of uncertainties. Except for the elements measured by a single NIST primary method, these results are combined with results with similarly complete uncertainties from collaborating laboratories, and in certain cases several results without complete uncertainties. The uncertainties of these results were augmented for probable bias on the basis of the differences among the results obtained by different methods [3].

Table 1. Certified Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Ag ^(A,B,b,C)	µg/kg	5.9 ± 1.6	Mn ^(A,a,b,D,d)	mg/kg	10.46 ± 0.47
As ^(C)	µg/kg	19.6 ± 1.4	Mo ^(A,a,b,C,D,d)	mg/kg	3.30 ± 0.13
Ca ^(A,a,D,d)	mg/kg	131 ± 10	Na ^(A,a,d)	%	0.2033 ± 0.0064
Cd ^(C,E)	µg/kg	97.0* ± 1.4	Ni ^(B,b,c)	µg/kg	44.5 ± 9.2
Co ^(A,a,b)	mg/kg	0.300 ± 0.018	Pb ^(E)	µg/kg	62.8 ± 1.0
Cr ^(A)	µg/kg	53 ± 14	S ^(a,D,d,F)	%	0.749 ± 0.034
Cu ^(A,a,C,D,d)	mg/kg	275.2 ± 4.6	Se ^(A,E)	mg/kg	2.031 ± 0.045
Fe ^(A,a,D)	mg/kg	197.94 ± 0.65	Sr ^(B,b,d)	µg/kg	95.3 ± 4.2
K ^(A,a,d,F)	%	1.023 ± 0.064	V ^(c,d,G)	µg/kg	8.17 ± 0.66
Mg ^(A,a,D,d)	mg/kg	620 ± 42	Zn ^(A,a,D,E,h)	mg/kg	181.1 ± 1.0

*Alternate statistical method [6]

Analytical techniques used for assignment of certified values; capital letters indicate that the method was used by NIST.

- (A,a) Instrumental neutron activation analysis (INAA)
- (B,b) Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)
- (C,c) Radiochemical neutron activation analysis (RNAA)
- (D,d) Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- (E) Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICP-MS)
- (F) Prompt gamma activation analysis (PGAA)
- (G) Pre-concentration pre-separation neutron activation analysis (PNAA)
- (h) Solid-sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS)
- (I) Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (ID/CV ICP-MS)

Reference Values and Uncertainties: Reference values are based on results from one method carried out at NIST or at NIST and in several collaborating laboratories. The methods of combining the results of different methods from different laboratories were applied as above. These results do not fulfill the criteria for certification because they lack a full estimate of method bias. The reporting follows the ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement [5].

Table 2. Reference Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Cl ^(A,a)	%	0.287 ± 0.013	N ^(F)	%	10.30 ± 0.34
Cs ^(A,a)	µg/kg	21.7 ± 1.4	P ^(D,d)	%	1.175 ± 0.027
H ^(F)	%	7.35 ± 0.24	Rb ^(A,a)	mg/kg	35.3 ± 1.1
Hg ^(I)	µg/kg	5.36 ± 0.17	Sb ^(a,C)	µg/kg	3.13 ± 0.31

Note: Analytical techniques used for assignment of reference values are provided following Table 1.

Information Values: Information values are given to assist users in the assays of two non-certified elements that may be of interest in method development and other investigations. These information values are based on results that did not allow complete assessment of all sources of uncertainty.

Table 3. Information Values for Mass Fractions (on a Dry-Mass Basis) of Selected Elements

Element	Unit	Mass Fraction
Li ^(d)	µg/kg	12
Si ^(d)	mg/kg	6

Note: Analytical techniques used for assignment of information values are provided following Table 1.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Particle size:

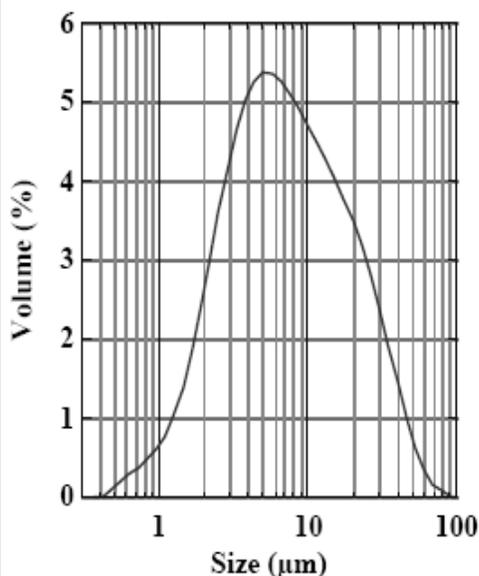


Figure 1. Particle size distributions in SRM 1577c determined in aqueous suspension via laser light scattering instrumentation (Malvern Mastersizer 2000). Calculated 10, 50, and 90 percentile particle sizes (percent volume of particles smaller than the value) for SRM 1577c are: $d_{0.1} = 2.31 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 7.57 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 28.5 \mu\text{m}$. Uncertainties in these values are estimated at $\pm 10\%$ relative (2s).

REFERENCES

- [1] May, W.E., Gills, T.E., Parris, R., Beck, II, C.M., Fassett, J.D., Gettings, R.J., Greenberg, R.R., Guenther, F.R., Kramer, G., MacDonald, B.S., and Wise, S.A., *Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*, NIST Special Publication 260-136, (1999); available at <http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/upload/SP260-136.PDF>.
- [2] Zeisler, R., *The Sampling and Analysis of Human Livers*, J. Res. Nat. Bur. Stand., 91 (1986) 75-85.
- [3] Levenson, M.S., Banks, D.L., Eberhardt, K.R., Gill, L.M., Guthrie, W.F., Liu, H.K., Vangel, M.G., Yen, J.H., and Zhang N.F., *An Approach to Combining Results from Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*, J. Res. Nat. Inst. Stand. Technol. 105, (2000), 571-579.
- [4] Rukhin, A.L., Vangel, M.G., *Estimation of a Common Mean and Weighted Means Statistics*, J. Am. Stat. Assoc. 93, (1998), 301-308.
- [5] *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland, (1993); see also Taylor, B.N. and Kuyatt, C.E., *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*, NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington DC, (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [6] Schiller, S. and Eberhardt, K., *Combining Data from Independent Chemical Analysis Methods*, *Spectrochim. Acta*, 46B, (1991), 1607-1613.

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-2200; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

ANEXO II

PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL ICP – MS.

ANTES DE TRABAJAR CON EL EQUIPO ASEGURATE DE QUE TIENES TODO LO NECESARIO.

PARA EMPEZAR A TRABAJAR CON EL EQUIPO:

- 1.- Encender el *mini Split* 15-30 minutos antes de encender el equipo ICP – MS.
- 2.- Encender el equipo ICP – MS y todo lo relacionado (tablero eléctrico, regulador de corriente, CPU, impresora, conexión a internet, recirculador, extractor, cilindro de gases).
- 3.- Estabilizar el equipo ICP – MS durante 15 minutos antes de iniciar la verificación instrumental y el análisis posterior.
- 4.- Una vez cumplido este requisito ya puedes empezar a trabajar, asegúrate que en todo momento se mantenga la puerta cerrada. No deben permanecer dentro más de tres personas.

Importante: asegúrate que el cilindro de argón marque más de 500 psi para obtener resultados confiables.

PARA FINALIZAR.

Recuerda: guardar tus resultados.

- 1.- Asegúrate de que nadie más vaya a ocupar el ICP – MS.
- 2.- Si ya no se va a ocupar el ICP – MS, enjuaga el sistema de introducción de muestra.
- 3.- Apaga el equipo y todo lo relacionado (ver punto 2, “PARA EMPEZAR A TRABAJAR CON EL EQUIPO”)

MANTÉN LIMPIO TU LUGAR DE TRABAJO.

RECUERDA QUE EL BUEN USO DEL EQUIPO ICP – MS ES PARA BENEFICIO COMÚN.

SI TIENES ALGUNA DUDA **PREGUNTA.**

ATT. LEAA (LAB. 103)



P.O. Box 41727
 Charleston, SC 29423
 TEL: (843) 767-7900
 FAX: (843) 767-7906

CAT.NO.CRM-BL

Certificate of Analysis

HPS Certified Reference Material Bovine Liver Solution Lot # 529004

<u>Source</u>	<u>Source Purity</u>	<u>Matrix</u>	<u>Standard Concentration</u>
High Purity Metals, Salts, or Oxides	99.99+%	HNO ₃ , 4%	µg/mL ± 0.5% See Elements and Concentrations on Back

This spectrometric standard solution has been prepared from high-purity reference materials. Subboiled high-purity acid has been used to place the materials in solution and to stabilize the standard. The matrix is as noted above in 18 megaohm deionized water. The reference materials have been assayed by optical emission spectrometry and atomic absorption spectrometry.

The standard has been prepared gravimetrically by weighing the reference material to 5 significant figures. Volumetric glassware has been calibrated gravimetrically to 5 significant figures.

The Standard Concentration has been verified by ICP-OES against an independent source which is directly traceable to National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Material No. 3100 Series prior to shipping.

This standard is valid for six months from the shipping date provided the solution is kept tightly capped and stored under normal laboratory conditions.

Exp Date: APR 2006
 MSDS ATTACHED

A handwritten signature in cursive script that reads "Theodore C. Rains".

Theodore C. Rains, Ph.D.
 President

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EXAMEN

PROFESOR

MATERIA

NOMBRE DEL ALUMNO

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL
Bovine Liver Solution
Element List
($\mu\text{g/mL}$)

Aluminum	0.2
Arsenic	0.0005
Barium	0.01
Bromide	0.09
Cadmium	0.003
Calcium	1.2
Chloride	25
Chromium	0.001
Cobalt	0.002
Copper	2
Iron	3
Lead	0.003
Magnesium	6
Manganese	0.1
Nickel	0.002
Phosphorus	110
Potassium	100
Rubidium	0.2
Selenium	0.01
Silicon	0.2
Sodium	25
Sulfur	80
Vanadium	0.0005
Zinc	1.5

HIGH-PURITY STANDARDS

P.O. Box 41727
Charleston, SC 29423

Phone: (843) 767-7900
Fax: (843) 767-7906

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

CRM Bovine Liver Solution
Cat. No. CRM BL

Issue Date: 10-20-05

SECTION I - Product Identification/Hazardous Ingredients

Formula: N/A Concentration: µg/mL Molecular Weight: N/A

TSCA: YES CAS NO: 7697-37-2

Component: Trace Metals, Salts, or Oxides in 4% HNO₃ + Balance H₂O TLV/TWA: 8 h Not Estab.; 5 mg/m³

STEL: N/A PEL: N/A Toxicity: N/A

SECTION II - Physical/Chemical Characteristics

Boiling Point: 100°C Vapor Pressure (mm): N/A Vapor Density (air+1): N/A

Freezing Point: N/A Specific Gravity (H₂O = 1): N/A Solubility in H₂O: Complete

Appearance/Odor: Clear, odorless solution

SECTION III - Fire and Explosion Hazard Data

Flash Point: N/A Auto Ignition Temperature: N/A Lower Explosion Level: N/A

NFPA - Rating: N/A Extinguishing Media: Use appropriate

Special Fire-Fighting Procedures: Firefighters should wear proper protective equipment and self-contained breathing apparatus with full face piece operated in positive pressure mode.

Unusual Fires Explosion Hazards: N/A

Toxic Gases Produced: NO_x

7. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Biesalski, Grimm. *POCKET ATLAS OF NUTRITION*. Ed. Thieme. Stuttgart-New York. 2006.
- (2) Vazqu ez, De Cos, López-Nomdedeu. *ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN, MANUAL TEÓRICO-PR CTICO*. Ed. Díaz de Santos. España 2005.
- (3) Faller, Sch nke, Sch nke. *ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CUERPO HUMANO*. Ed. Paidotribo. España 2006.
- (4) Thews, Mutschler, Vaupel. *ANATOM A, FISIOLOG A Y PATOFISIOLOG A DEL HOMBRE*. Ed. Revert . España 1983.
- (5) Rodríguez-Mercado, Altamirano-Lozano. *VANADIO: CONTAMINACI N, METABOLISMO Y GENOTOXICIDAD*. Rev. Int. Contam. Ambient. **22** (4) 173-189, 2006.
- (6) AOAC. *GUIDELINES FOR SINGLE LABORATORY VALIDATION OF CHEMICAL METHODS FOR DIETARY SUPPLEMENTS AND BOTANICALS*. 2002.
- (7) Aschner Judy. *NUTRITIONAL ASPECTS OF MANGANESE HOMEOSTASIS. MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE*. **26** (2005) 353-362.
- (8) Spencer, Bodner, Richard. *QUÍMICA, ESTRUCTURA Y DIN MICA*. Ed. Patria. México, 2007.
- (9) ICPS. *INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (1998). VANADIUM*. Environmental Health Criteria, World Health Organization, Ginebra, No. 81.
- (10) Huhhey, Keiter, Keiter. *QUÍMICA INORG NICA. PRINCIPIOS DE ESTRUCTURA Y REACTIVIDAD*. Ed. Alfaomega. México, 2005.
- (11) Johanna Sabine Becker. *INORGANIC MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLE AND APPLICATIONS*. Ed. John Wiley and sons. UK, 2007.
- (12) Dean John. *PRACTICAL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROSCOPY*. Ed. John Wiley and sons. UK, 2005.
- (13) American Chemical Society Specifications. *REAGENT CHEMICALS, SPECIFICATIONS AND PROCEDURES*. Oxford University Press. 10th edition. 2006.
- (14) Litter, Armienta, Farías (editores). *METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARS NICO EN AGUAS Y SUELOS*. Ed. CYTED. Argentina 2009.
- (15) Guía EURACHEM. *MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO. GUÍA DE LABORATORIO PARA LA VALIDACI N DE MÉTODOS Y TEMAS RELACIONADOS*. CENAM, 2da ed. México, 2005.
- (16) Robert Thomas. *SPECTROSCOPY TUTORIAL. A BEGINNER'S GUIDE TO ICP-MS*. Spectroscopy **16** (3) 56-60 (2011).

- (17) Certificate of analysis. *STANDARD REFERENCE MATERIAL. BOVINE LIVER 1577c*. NIST.
- (18) Dirce Pozebon. *BIOMONITORING OF ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS IN SMALL BIOLOGICAL TISSUES*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **23** (2008) 1281-1284.
- (19) D. de Muynck. *DEVELOPMENT OF A METHOD BASED ON INDUCTIVELY COUPLED – PLASMA MASS SPECTROMETRY FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PHOSPHORUS, CALCIUM AND STRONTIUM IN BONE AND DENTAL TISSUE*. *Spectrochimica Acta Part B*. **69** (2009) 408-415.
- (20) K. Chen. *DETERMINATION OF CALCIUM, IRON AND ZINC IN MILK POWDER BY REACTION CELL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY*. *Analytica Chimica Acta* **470** (2002) 223-228.
- (21) Scott D. *A DYNAMIC REACTION CELL FOR INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (ICP-MS). PART III*. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 1261-1269.
- (22) S. Dílio. *DETERMINATION OF TRACE ELEMENTS IN SERUM BY DYNAMIC REACTION CELL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY DEVELOPMENT OF A METHOD WITH A DESOLVATING SYSTEM NEBULIZER*. *Analytica Chimica Acta* **573** (2006) 432-438.
- (23) A. Ataro. *QUANTIFICATION OF TRACE ELEMENTS IN RAW COW'S MILK BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (ICP-MS)*. *Food Chemistry*. **11** (2008) 243-248.
- (24) Chudzinska M. *APPLICATION OF ICP-MS METHOD OF DETERMINATION OF 15 ELEMENTS IN HONEY WITH CHEMOMETRIC APPROACH FOR THE VERIFICATION OF THEIR AUTHENTICITY*. *Food and Chemical Toxicology* **49** (2011) 2741-2749.
- (25) Elene P. *THE USE OF INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (ICP-MS) FOR THE DETERMINATION OF TOXIC AND ESSENTIAL ELEMENTS IN DIFFERENT TYPES OF FOOD SAMPLES*. *Food Chemistry* **112** (2000) 727-732.
- (27) Certificate of analysis. *STANDARD REFERENCE MATERIAL. BOVINE LIVER SOLUTION*. Lote: 529004. High – Purity standards.