

LOS ISÓTOPOS ESTABLES Y SUS APLICACIONES EN QUÍMICA ANALÍTICA

J. Ignacio García Alonso y Pablo Rodríguez González

Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo
Calle Julián Clavería, 8. 33006 OviedoE-mail: jiga@uniovi.es y rodriguezpablo@uniovi.es**1. Introducción: Los isótopos estables.**

En este artículo quisiéramos resumir nuestro trabajo de los últimos 25 años en el campo de los isótopos estables aunque centrándonos en los resultados más actuales. Por otro lado, este es un aspecto muy desconocido de la Química Analítica moderna por lo que intentaremos abarcar todas sus posibles aplicaciones desde la medida de las variaciones de las abundancias isotópicas en la naturaleza hasta el uso de isótopos estables enriquecidos en distintos campos científicos.

Existen 81 elementos en la naturaleza entre el hidrógeno ($Z=1$) y el bismuto ($Z=83$) y hay 281 isótopos estables de número másico desde 1 (^1H) hasta 209 (^{209}Bi). El elemento que más isótopos estables posee es el estaño (10) mientras que solamente 21 elementos de los 81 citados son monoisotópicos. Además es interesante resaltar que la mayoría de los elementos presentes en los seres vivos poseen un isótopo estable mayoritario (por ejemplo ^{12}C , 98.93%; ^{14}N , 99.63%) y al menos otro minoritario (^{13}C , 1.07%; ^{15}N , 0.37%). El oxígeno posee 3 isótopos estables, el hidrógeno 2 y el azufre 4.

La composición isotópica de los elementos así como sus pesos atómicos se pueden considerar constantes en la naturaleza para la mayoría de las aplicaciones cuantitativas en Química Analítica. Sin embargo, existen variaciones naturales debido a los llamados "efectos isotópicos" cinéticos y termodinámicos o debido al decaimiento radioactivo de otros elementos (por ejemplo, la formación de isótopos de plomo por el decaimiento de isótopos de torio y uranio). Estas variaciones isotópicas naturales se pueden medir hoy en día de forma exacta y precisa con espectrómetros de masas multicoletores y tienen aplicación en multitud de campos científicos desde la arqueología hasta la metabolómica.

2. Variaciones isotópicas naturales.

En nuestro grupo de investigación hemos trabajado sobre las variaciones isotópicas naturales tanto de elementos pesados (Sr, Hg, Pb) como ligeros (C, S) y sus distintos campos de aplicación. Por ejemplo, las variaciones isotópicas de plomo tienen aplicación en estudios de procedencia de muestras arqueológicas [1] mientras que las variaciones isotópicas de estroncio se pueden utilizar para investigar el origen de alimentos vegetales como, por ejemplo, la faba asturiana [2]. En el caso del mercurio la variabilidad isotópica natural es mucho menor que en los dos casos anteriores y surge, básicamente, por efectos isotópicos cinéticos y termodinámicos en reacciones (bio)químicas no cuantitativas donde se observa fraccionamiento

isotópico tanto dependiente como independiente de la masa [3]. Cuando se pretende medir el fraccionamiento isotópico específico de especies de mercurio como el mercurio inorgánico o el metil mercurio es necesario acoplar una técnica cromatográfica al equipo multicolelector y realizar la medida de las relaciones isotópicas en señales transientes [4].

Esta estrategia la hemos utilizado para continuar nuestras investigaciones sobre las relaciones isotópicas de plomo y estroncio tratando de minimizar los tratamientos previos a las muestras mediante el acoplamiento directo de la cromatografía líquida (LC) al equipo multicolelector. El uso de una fase móvil quelante de EDTA permite la separación del plomo de otros elementos presentes en muestras arqueológicas y por tanto la inyección directa de las muestras tras su digestión sin necesidad de aislar el plomo previamente a la medida [5]. El acoplamiento LC-ICP-MS multicolelector también se puede aplicar al estudio de las relaciones isotópicas de azufre en distintas especies químicas del elemento [6]. Finalmente, el estroncio se puede separar por intercambio catiónico de otros elementos como rubidio y calcio y así poder medir las relaciones isotópicas de estroncio de forma directa en aguas, suelos, vinos, uvas y minerales de interés histórico/arqueológico como las calcretas [7].

La medida de relaciones isotópicas de carbono específicas de cada compuesto químico requiere el acoplamiento de la Cromatografía de Gases a un Espectrómetro de Masas multicolelector a través de una interfase de combustión donde los compuestos químicos que eluyen de la columna cromatográfica se transforman en dióxido de carbono que se ioniza utilizando una fuente de ionización electrónica. Debido tanto a efectos isotópicos en la separación cromatográfica como a efectos electrónicos en los amplificadores de las copas de Faraday es necesaria una separación cromatográfica total (Resolución >2) entre los distintos picos del cromatograma para poder medir su relación isotópica mediante área de pico a las masas 44, 45 y 46 [8]. En nuestro laboratorio [9] hemos desarrollado un método de cálculo que, con la misma instrumentación, puede medir relaciones isotópicas de carbono en picos parcialmente solapados (Resolución >1) lo que abre la metodología a nuevos campos científicos como el análisis de matrices complejas en aplicaciones de metabolómica.

3. Los isótopos estables enriquecidos.

Hoy en día se pueden adquirir comercialmente isótopos estables enriquecidos de casi cualquier elemento a precios asequibles. Desde los años 40 del siglo pasado se

han desarrollado métodos de enriquecimiento isotópico basados en múltiples procesos como, por ejemplo, la crio-distilación para el enriquecimiento de ^{13}C o los calutrones para el enriquecimiento de isótopos de elementos pesados. Los isótopos estables enriquecidos de los elementos ligeros se pueden obtener también en forma de compuestos químicos como por ejemplo en forma de glucosa ($^{13}\text{C}_6$ -glucosa) o cloruro amónico ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) al 99% de enriquecimiento que pueden utilizarse en estudios metabólicos o en biosíntesis de biomoléculas marcadas isotópicamente. Desde los años 40 del siglo pasado los isótopos estables enriquecidos han sido utilizados como trazadores de procesos bioquímicos y medioambientales y para el desarrollo de una forma alternativa de cuantificación en Química Analítica: El Análisis por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas (IDMS por sus siglas en inglés).

4. Los isótopos estables enriquecidos para el seguimiento de rutas metabólicas.

El uso de isótopos estables enriquecidos para el seguimiento de rutas metabólicas fue una de las primeras aplicaciones desarrolladas en los años 40 del siglo XX aunque su uso decayó rápidamente al popularizarse el uso de isótopos radioactivos como el ^{14}C o el ^{32}P . No fue hasta muchos años después cuando los isótopos estables volvieron a adquirir importancia en este campo y, hoy en día son una herramienta fundamental para el estudio de rutas metabólicas. La formación de metabolitos intracelulares puede seguirse creciendo células en un medio de cultivo enriquecido en $^{13}\text{C}_6$ -glucosa [10]. De esta manera, se pueden estudiar distintas líneas celulares de cáncer de próstata y comparar la formación de metabolitos marcados en ^{13}C mediante Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas [10]. Además, se puede seguir la incorporación de compuestos marcados isotópicamente *in vivo* mediante los equipos de relaciones isotópicas de carbono que son capaces de medir pequeños enriquecimientos isotópicos cercanos a las variaciones naturales. De este modo, es posible detectar el enriquecimiento isotópico en multitud de metabolitos en orina humana tras la administración oral de un sustrato marcado isotópicamente [9].

5. Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas.

Esta técnica analítica se basa en la modificación intencional de la composición isotópica natural de un elemento o compuesto mediante la adición, a la muestra, de una cantidad conocida del mismo elemento o compuesto enriquecido isotópicamente y la medida de la composición isotópica resultante en la mezcla por Espectrometría de Masas [11]. La ventaja fundamental de esta forma de medida alternativa es que no está afectada por pérdidas del elemento o compuesto durante el proceso analítico. Por otra parte, no requiere un calibrado metodológico, los efectos de matriz no afectan al resultado analítico y, por tanto, las medidas son altamente fiables tanto en lo que respecta a la precisión como la exactitud. Por estas razones IDMS proporciona resultados directamente trazables al

sistema internacional de unidades y es la técnica más utilizada para la certificación de materiales de referencia o para la validación de otros métodos analíticos de rutina como, por ejemplo, en el campo de la Química Clínica [12]. La aplicación de IDMS requiere el uso de compuestos marcados isotópicamente análogos a los compuestos (bio)químicos que se quiere determinar. Tradicionalmente, en el análisis de compuestos orgánicos por IDMS, se utilizan compuestos marcados con varios isótopos enriquecidos para que no haya solapamiento entre el espectro de masas del compuesto de abundancia natural y el compuesto marcado isotópicamente. Con los espectrómetros de masas actuales este requisito ya no es necesario por lo que se pueden utilizar compuestos marcados con uno o dos isótopos enriquecidos [13] o utilizar el marcaje en heteroátomos lo que facilita el uso de fuentes de ionización alternativas como el ICP-MS. El desarrollo de modos de cálculo alternativos como la Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD por sus siglas en inglés) aceleró este cambio paradigmático. IPD asume que el perfil isotópico de la mezcla (m) se puede expresar como una combinación lineal del perfil isotópico de la muestra (s) y el del trazador isotópico (t). Las incógnitas x_s y x_t serán las fracciones molares de muestra y trazador en la mezcla respectivamente (ec. 1). Si el número de masas medidas $n > 2$ la ec. 1 se puede resolver mediante mínimos cuadrados introduciendo un vector de error en la ecuación.

$$\begin{bmatrix} A_1^m \\ A_2^m \\ \dots \\ A_n^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1^s & A_1^t \\ A_2^s & A_2^t \\ \dots & \dots \\ A_n^s & A_n^t \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_n \end{bmatrix} \quad (1)$$

Una vez determinadas las fracciones molares mediante regresión lineal múltiple, la concentración del elemento o compuesto en la muestra se determina mediante la ec. (2):

$$C_s = C_t \times \frac{x_s}{x_t} \times \frac{m_t}{m_s} \times \frac{w_s}{w_t} \quad (2)$$

Donde C_s es la concentración desconocida en la muestra, C_t la concentración conocida de trazador, m_t y m_s las masas de trazador y muestra tomados inicialmente y w_s y w_t los pesos atómicos (o moleculares) del analito y del trazador respectivamente.

6. Síntesis y caracterización de compuestos marcados isotópicamente.

Como se ha visto en el apartado anterior, para aplicar IDMS según las ecuaciones (1) y (2) es necesario disponer de compuestos marcados isotópicamente de concentración y abundancia isotópica conocida. En nuestro laboratorio hemos sintetizado una gran variedad de compuestos marcados que no estaban disponibles comercialmente o, si lo estaban, lo era con marcas múltiples. La Tabla 1 resume los compuestos preparados en nuestro laboratorio desde una perspectiva cronológica.

Tabla 1. Compuestos marcados isotópicamente sintetizados en nuestro laboratorio.

Compuesto/s	Marca isotópica	Año de publicación
Dibutilestaño	^{118}Sn	2000
Tributilestaño	^{119}Sn	2001
Selenometionina	^{77}Se	2004
Metilmercurio	^{201}Hg	2006
Metionina	^{34}S	2007 y 2016
PBDEs	$^{81}\text{Br}_n$	2010
Clenbuterol	$^{13}\text{C}_1$	2011
Cr(III) y Cr(VI)	^{50}Cr y ^{53}Cr	2012
Beta-agonistas	$^{13}\text{C}_1$	2013
Creatinina	$^{13}\text{C}_1$	2014
Péptido cistatina C	$^{13}\text{C}_2$	2015
Creatina y creatinina	$^{13}\text{C}_1$ y $^{13}\text{C}_2$	2015
PCBs	$^{37}\text{Cl}_n$	2015
Hexabromociclododecanos	$^{81}\text{Br}_6$	2016
Etilmercurio	^{200}Hg	2017
Aminoácidos	$^{15}\text{N}_1$	2017
Péptidos vitronectina, complemento C3 y apolipoproteína A4	$^{13}\text{C}_1$, $^{13}\text{C}_2$ y $^{13}\text{C}_3$	Pendiente de publicación
Bases nitrogenadas	$^{15}\text{N}_n$	Pendiente de publicación
Melatonina	$^{13}\text{C}_1$	Pendiente de publicación
Monoiodo- y diiodo-tiroxina	$^{15}\text{N}_1$ y $^{13}\text{C}_2$	Pendiente de publicación

Como se puede observar en la Tabla 1 nuestros primeros trabajos se centraron en el campo de la especiación metálica tanto de estaño como de mercurio y cromo utilizando el plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización. A partir de 2011 nos centramos en el análisis de compuestos orgánicos desde un punto de vista medioambiental (PBDEs y PCBs) así como en el análisis clínico (creatinina, cistatina C). En los últimos años nos hemos centrado en la biosíntesis de aminoácidos y bases nitrogenadas marcadas con ^{15}N [14] así como en la preparación de péptidos marcados isotópicamente para proteómica cuantitativa [15]. En este último caso proponemos el uso de péptidos marcados mínimamente en ^{13}C (mass overlapping peptides, MOPs) para evitar efectos isotópicos en la separación cromatográfica y mejorar la medida de las abundancias isotópicas en equipos de triple cuadrupolo [15].

Una vez sintetizados los compuestos han de ser caracterizados tanto en composición isotópica como en concentración. Para la medida de la composición isotópica utilizamos un procedimiento iterativo que compara el perfil isotópico experimental con distintos perfiles isotópicos teóricos para distintos enriquecimientos [16]. Por otro lado, es importante comprobar que los espectrómetros de masas utilizados proporcionan composiciones isotópicas reales. Para ello, el uso de compuestos que contienen Cl o Br son los más adecuados [17]. Finalmente, para la medida de las concentraciones de los compuestos marcados se utiliza un patrón analítico certificado de abundancia natural y se aplican las ecuaciones (1) y (2) de manera inversa, es decir, muestra y trazador se invierten en la ecuación. De esta manera podemos asegurar la trazabilidad de las

medidas obtenidas por IDMS al Sistema Internacional de unidades.

7. Aplicaciones de la Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas

La técnica de Dilución Isotópica se aplica en muchos campos científicos desde la Geología hasta la Bioquímica. En Química Analítica es la técnica por excelencia para la certificación de materiales de referencia y para la validación de otros métodos analíticos de rutina. Según la Web of Science se publican entre 500 y 650 trabajos científicos al año en este campo desde 2005 hasta la actualidad con un máximo en 2013 (Figura 1).

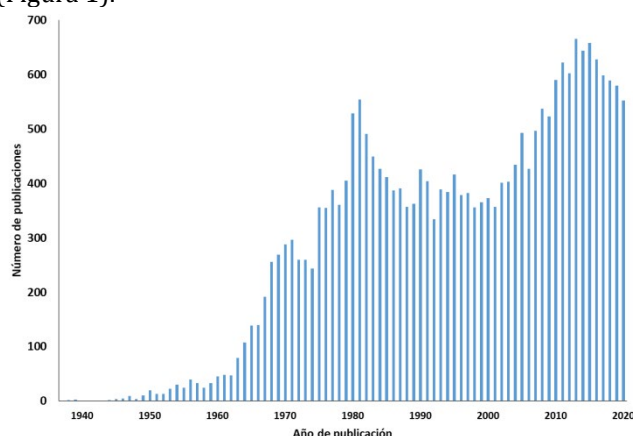


Figura 1. Resultado de publicaciones en el tema de “Dilución Isotópica” desde 1935 hasta 2020 según la Web of Science.

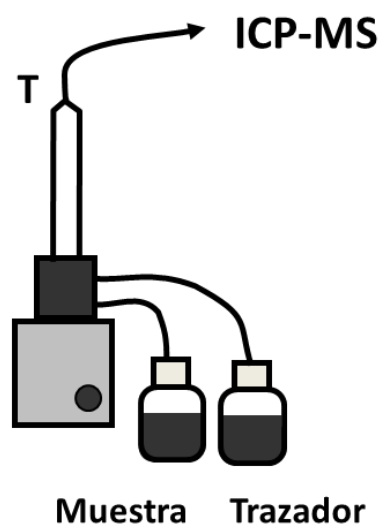


Figura 2. Aplicación de la dilución isotópica en línea para la determinación de metales por ICP-MS.

Cabe destacar que la dilución isotópica se puede aplicar de una forma menos rigurosa, pero también muy efectiva, utilizando la modalidad de dilución isotópica en línea. La Figura 2 muestra un esquema simplificado de dilución isotópica en línea para la determinación de metales en aguas, o muestras digeridas, por ICP-MS. La ventaja de esta metodología es que se puede

automatizar con un muestreador automático y se puede utilizar disoluciones multi-trazador para la determinación de una serie de elementos simultáneamente. La modalidad de dilución isotópica en línea requiere que se alcance el equilibrio isotópico antes de la fuente de ionización y esto solo se puede conseguir utilizando un ICP como fuente de ionización o una reacción química, como la combustión, que transforme todos los compuestos químicos a CO₂ antes de la fuente de ionización [18].

8. Conclusiones

En este artículo hemos querido resumir el amplio rango de aplicación de los isótopos estables en las medidas analíticas tanto estudiando las variaciones naturales de las abundancias isotópicas como empleando isótopos estables enriquecidos. Dado que la Espectrometría de Masas está entrando con fuerza en todos los laboratorios analíticos es importante comprender la dimensión extra de información que proporcionan las medidas isotópicas y la gran calidad de los resultados analíticos que se pueden obtener.

9. Referencias.

- [1] A. Reguera-Galán, T. Barreiro-Grille, M. Moldovan, L. Lobo, M. Á. de Blas Cortina, J.I. García Alonso. Provenance study of early Bronze Age artefacts found in Asturias (Spain) by means of metal impurities and lead, copper and antimony isotopic compositions. *Archaeometry* 61 (2019) 683-700.
- [2] A. Reguera-Galan, M. Moldovan, J.I. Garcia Alonso. The combined measurement of Sr-87/Sr-86 isotope ratios and Sr-88/Rb-85 elemental ratios using laser ablation MC-ICP-MS and its application for food provenance studies: the case for Asturian beans. *J. Anal. At. Spectrom.* 33(2018)867-875.
- [3] B. A. Bergquist, J.D. Blum. The Odds and Evens of Mercury Isotopes: Applications of Mass-Dependent and Mass-Independent Isotope Fractionation. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 353–359.
- [4] S. Queipo-Abad, P. Rodriguez-Gonzalez, J.I. Garcia Alonso. Measurement of compound-specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 34 (2019) 753-763.
- [5] P. Álvarez Penanes, M. Moldovan Feier, J.I. García Alonso. Direct determination of Pb isotope ratios in archaeological materials by coupling Liquid Chromatography to Multicollector ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* (2021). DOI: 10.1039/D1JA00046B
- [6] M. Martinez, J.I. Garcia Alonso, C. Parat, J. Ruiz Encinar, I. Le-Hecho. Anion-Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector ICPMS. *Anal. Chem.* 91(2019)10088-10094.
- [7] D. Ballesteros, A. Painchault, C. Nehme, D. Todisco, M. Varano, D. Mouralis. Normandy chalkstone (France): geology and historical uses from quarries to monuments. *Episodes*, 44 (2021) 31-42.
- [8] M.A. Jochmann, T.C. Schmidt. *Compound-specific Stable Isotope Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2012).
- [9] L. Rodas Sánchez, P. Rodríguez González, J.I. García Alonso. *Comprehensive Isotope Ratio Metabolomics: Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry of urinary metabolites and exhaled breath*. *Anal. Chim. Acta*, 1170 (2021) 338606.
- [10] M Fernández-Fernández, P Rodríguez-González, D. Hevia Sánchez, P. González-Menéndez, R.M. Sainz Menéndez , J.I. García Alonso. Accurate and sensitive determination of molar fractions of ¹³C-labeled intracellular metabolites in cell cultures grown in the presence of isotopically-labeled glucose. *Anal. Chim. Acta*, 969(2017) 35-48.
- [11] J.I. García Alonso, P. Rodríguez González. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Royal Society of Chemistry. Cambridge (2013).
- [12] A. Kessler. Mass spectrometry – a key technique for traceability in clinical chemistry. *Trends in Anal. Chem.* 84 (2016) 74–79.
- [13] A. González Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso. Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis. *The Analyst* 135(2010)953-964.
- [14] J.N. Carcelén, J.M. Marchante-Gayón, P. Rodriguez-González, L. Valledor, M.J. Cañal, J.I. Garcia Alonso. A cost-effective approach to produce 15 N-labelled amino acids employing *Chlamydomonas reinhardtii* CC503. *Microbial cell factories*, 16(2017)146
- [15] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, R. Ohlendorf, A. Henrion, V. Delatour, J.I. García Alonso. Determination of Cystatin C in human serum by isotope dilution mass spectrometry using mass overlapping peptides. *J. Proteom.* 112 (2015) 141-155
- [16] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 681-691.
- [17] L. Somoano-Blanco, M. Borda, A. González Gago, P. Rodríguez-González, J.I. Garcia Alonso. Evaluation of the spectral accuracy of mass spectrometers using compounds containing Cl or Br atoms. *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 1036-1042.
- [18] S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.I. García Alonso. A quantitative universal detection system for organic compounds in Gas Chromatography based on the use of isotopically enriched ¹³CO₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48(2009)2561-2564.