

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Dpto. de QUÍMICA ANALÍTICA



X-53-375220-4

DESARROLLO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN
DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN
MUESTRAS DE ALIMENTOS, AGUAS Y
FLUÍDOS BIOLÓGICOS POR ICP-MS

Directores:

Dra. M^a Concepción Pérez Conde

Dra. Ana M^a Gutiérrez Carreras

M^a ÁNGELES QUIJANO NIETO

Madrid, 1999





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

M^a CONCEPCIÓN PÉREZ CONDE y ANA M^a GUTIÉRREZ CARRERAS,
PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID.

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado: "DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE ALIMENTOS, AGUAS Y FLUÍDOS BIOLÓGICOS POR ICP-MS", ha sido realizado en este Departamento por la licenciada D^a M^a Ángeles Quijano Nieto, bajo nuestra dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 29 de Abril de 1999.

Fdo: Ana M^a Gutiérrez Carreras.

Fdo: M^a Concepción Pérez Conde.

A lo largo de estos años han sido muchas las personas e instituciones que me han ayudado en la realización de este trabajo y por lo tanto deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directoras de tesis, Conchita y Ana, no sólo por sus enseñanzas y dedicación profesional, sino también por su amistad, lo que ha constituido un enorme apoyo en las situaciones más difíciles.

Con carácter muy especial a Carmen, por su confianza en mi y su inestimable ayuda en todos los aspectos, sin la cual no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Al departamento de Química Analítica de la U.C.M., por brindarme todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.

También he de agradecer a la varias instituciones: Unión Europea, DGICYT y CICYT, por la financiación de este trabajo a través de varios proyectos (Nº: M&T1-CT930006, AMB94-1239-CE y PB95-0366-C02-01)

Al Dr. Prof. Víctor Rosas, por su colaboración en los primeros estudios de hidrólisis enzimática.

A mis compañeros y amigos, especialmente a Teresa, Antonio, Paula, Ana, Nour, Pilar, Christian, Ester, etc, por su ayuda y amistad. Y en general, a todas aquellas personas que han soportado mi carácter, gracias por entenderme y ayudarme.

Sin olvidar a todos mis compañeros de la E.U.I.T. de Obras Públicas, especialmente a Milagros y Charo, por su apoyo inestimable, facilitándome la combinación de mi trabajo como profesora y de mis estudios como doctorando durante estos últimos años.

A José Manuel, no sólo por tu apoyo a través de tu cariño, sino también tu ayuda práctica. Gracias por cederme tu tiempo para resolver mis problemas con la informática.

Por último mi más sincero agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, José y Pilar, por vuestro cariño y comprensión, así como por vuestra ayuda incondicional en todo momento, a vosotros os dedico esta Tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XVI
OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	1
PARTE TEÓRICA	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. SELENIO.....	7
1.1. <i>CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SELENIO.....</i>	7
1.2. <i>EL SELENIO EN EL MEDIOAMBIENTE.....</i>	12
1.2.1. Compuestos de selenio presentes en el medioambiente.....	12
1.2.2. Aplicaciones industriales del selenio y sus compuestos.....	12
1.2.3. Distribución de especies de selenio en el medioambiente.....	14
1.3. <i>EL SELENIO EN LA BIOQUÍMICA DE LOS SERES VIVOS.....</i>	19
1.3.1. Toxicidad y esencialidad.....	19
1.3.2. Función biológica.....	24
2. LA TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO.....	29
2.1. <i>INSTRUMENTACIÓN.....</i>	31
2.1.1. El ICP como fuente de iones.....	31
2.1.2. Extracción y óptica de enfoque de los iones producidos en el plasma.....	33
2.1.3. Analizador de masas.....	34
2.2. <i>INTERFERENCIAS EN ICP-MS.....</i>	36
2.2.1. Interferencias Espectrales.....	36
2.2.2. Interferencias no Espectrales.....	40
2.3. <i>ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA A LA ESPECTROMETRÍA DE PLASMA-MASAS.....</i>	45
3. BIBLIOGRAFÍA.....	47

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO.....	57
1. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.....	60
2. TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	62
2.1. <i>MINERALIZACIÓN.....</i>	62
2.2. <i>DERIVATIZACIÓN.....</i>	64
2.3. <i>PRECONCENTRACIÓN-EXTRACCIÓN.....</i>	67
2.4. <i>HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.....</i>	70
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACIÓN DE SELENIO.....	72
3.1. <i>DETERMINACIÓN DE SELENIO TOTAL.....</i>	72
3.2. <i>DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....</i>	73
3.2.1. <i>Métodos no cromatográficos.....</i>	73
3.2.2. <i>Métodos cromatográficos.....</i>	80
3.2.2.1. <i>Técnicas de Separación.....</i>	80
3.2.2.2. <i>Técnicas de Detección.....</i>	83
4. BIBLIOGRAFÍA.....	95

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III. APARATOS, REACTIVOS Y PROCEDIMIENTOS.....	111
1. APARATOS Y MATERIAL.....	113
2. REACTIVOS Y MUESTRAS.....	115
2.1. <i>DISOLUCIONES PATRÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....</i>	115
2.2. <i>REACTIVOS.....</i>	116
2.3. <i>MUESTRAS.....</i>	118
3. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO TOTAL Y DE SUS ESPECIES.....	119
3.1. <i>ICP-MS.....</i>	119
3.1.1. <i>Introducción de muestra por nebulización continua.....</i>	119
3.1.2. <i>Introducción de muestra por inyección en flujo.....</i>	119
3.2. <i>HG-ICP-MS.....</i>	120

3.2.1.	Generación del hidruro en continuo.....	120
3.2.2.	Generación del hidruro con inyección en flujo.....	122
3.2.3.	Preparación de muestras.....	122
	a) <i>Tratamiento de muestras de agua para el análisis de selenio inorgánico por generación de hidruros</i>	122
	b) <i>Preparación de muestras de suero para el análisis de selenio total e inorgánico por generación de hidruros</i>	123
3.3.	<i>HPLC-ICP-MS</i>	124
3.3.1.	Preparación de muestras.....	125
3.3.1.1.	<i>Tratamiento de muestras de orina</i>	125
3.3.1.2.	<i>Preparación de muestras de atún y mejillón</i>	126
	a) <i>Determinación de selenio total</i>	126
	b) <i>Determinación de especies de selenio</i>	126
 CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE SELENIO POR ICP-MS		 131
1.	ESTUDIOS PRELIMINARES	133
1.1.	<i>DETERMINACIÓN DE SELENIO POR NEBULIZACIÓN CONTINUA</i>	134
1.1.1.	Optimización de parámetros instrumentales.....	134
1.1.2.	Características analíticas.....	137
1.2.	<i>DETERMINACIÓN DE SELENIO POR INYECCIÓN EN FLUJO</i>	140
1.2.1.	Optimización de parámetros instrumentales.....	141
1.2.2.	Características analíticas.....	142
2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO INTERFERENTE DE MATRIZ SOBRE LA SEÑAL DE SELENIO EN ICP-MS. COMPARACIÓN ENTRE LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRA POR NEBULIZACIÓN CONTINUA Y POR INYECCIÓN EN FLUJO	143
2.1.	<i>EFECTO INTERFERENTE EN LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS POR NEBULIZACIÓN CONTINUA</i>	144
2.2.	<i>EFECTO INTERFERENTE EN LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS POR INYECCIÓN EN FLUJO</i>	145
2.3.	<i>INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES EN LAS INTERFERENCIAS DE MATRIZ</i>	151
2.3.1.	Caudal del gas de nebulización.....	152
2.3.2.	Potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma.....	153
2.4.	<i>CORRELACIÓN CON LAS TEORÍAS PROPUESTAS SOBRE EL ORIGEN DE LAS INTERFERENCIAS NO ESPECTRALES EN ICP-MS</i>	154

3.	DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE LA GENERACIÓN DE HIDRUROS POR INYECCIÓN EN FLUJO AL ICP-MS.....	156
3.1.	<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	156
3.2.	<i>OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA GENERADOR DE HIDRUROS.....</i>	156
3.2.1.	Optimización de la concentración de borohidruro sódico.....	157
3.2.2.	Optimización de la concentración de ácido clorhídrico.....	158
3.2.3.	Influencia de los caudales de ácido y reductor.....	158
3.2.4.	Optimización del volumen de inyección.....	159
3.3.	<i>OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y DE ATOMIZACIÓN DEL HIDRURO DE SELENIO.....</i>	160
3.4.	<i>ESTUDIO DE INTERFERENCIAS EN LA GENERACIÓN DEL HIDRURO DE SELENIO.....</i>	162
3.5.	<i>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....</i>	163
3.6.	<i>ANÁLISIS DE MUESTRAS.....</i>	164
4.	COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS ENTRE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO MEDIANTE ICP-MS.....	168
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	171
CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO.....		173
1.	DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO POR HPLC-ICP-MS.....	175
1.1	<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	175
1.2.	<i>ESTUDIO DE DIFERENTES MODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....</i>	176
1.2.1.	Cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos.....	176
1.2.1.1.	<i>Empleo de contraión catiónico.....</i>	177
1.2.1.2.	<i>Empleo de contraión aniónico.....</i>	183
1.2.2.	Cromatografía de intercambio iónico.....	187
1.2.2.1.	<i>Cambio aniónico fuerte.....</i>	187
1.2.2.2.	<i>Cambio aniónico débil.....</i>	188

2.	DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ORINA.....	202
2.1.	<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	202
2.2.	<i>IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ORINA.....</i>	205
2.3.	<i>TRATAMIENTO DE MUESTRA.....</i>	211
2.4.	<i>ANÁLISIS CUANTITATIVO PARA SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE ORINA.....</i>	213
2.4.1.	Determinación de selenio total.....	213
2.4.2.	Determinación de especies de selenio.....	214
2.5.	<i>ESTUDIO DE ESTABILIDAD.....</i>	216
3.	DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE PESCADOS Y MOLUSCOS.....	220
3.1.	<i>INTRODUCCIÓN.....</i>	220
3.2.	<i>DETERMINACIÓN DE SELENIO TOTAL EN MUESTRAS DE ATÚN Y MEJILLÓN.....</i>	221
3.3.	<i>DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ATÚN Y MEJILLÓN.....</i>	222
3.3.1.	Extracción de grasas.....	223
3.3.2.	Hidrólisis ácida.....	224
3.3.3.	Hidrólisis enzimática.....	230
3.3.3.1.	<i>Aplicación del proceso de hidrólisis enzimática a muestras de atún y mejillón.....</i>	230
3.3.3.2.	<i>Optimización del proceso de hidrólisis enzimática.....</i>	231
3.3.3.3.	<i>Identificación de especies de selenio en muestras de atún y mejillón....</i>	235
3.3.3.4.	<i>Cuantificación de las especies de selenio presentes en las muestras de atún y mejillón.....</i>	240
4.	BIBLIOGRAFÍA.....	243
	CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	247
	ANEXO.....	257

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Isótopos naturales de selenio y sus abundancias relativas.....	7
Tabla 2.	Principales especies de selenio encontradas en el ambiente y en medios biológicos [Shibata y col., 1992].....	13
Tabla 3.	Principales aplicaciones industriales de los compuestos de selenio [Fishbein, 1991; Cámara y col., 1995].....	14
Tabla 4.	Relación cuantitativa entre la cantidad de selenio encontrada en órganos en ratas y la fracción presente como glutadiona peroxidasa [Janghorbani y col., 1989].....	25
Tabla 5.	Concentraciones de selenio total encontradas en tejidos y fluidos biológicos humanos [Fishbein, 1991; Raptis y col., 1984; Caroli y col., 1994].....	27
Tabla 6.	Interferencias isobáricas debidas a la presencia de iones de Ge y Kr en la determinación de selenio por ICP-MS.....	37
Tabla 7.	Interferencias espectrales en la determinación de selenio por ICP-MS, debidas a la formación de especies poliatómicas en función del medio [Horlick y col., 1992b].....	38
Tabla 8.	Técnicas analíticas empleadas para la determinación de selenio total en muestras biológicas y medioambientales.....	72
Tabla 9.	Métodos cromatográficos para la determinación de especies de selenio, límites de detección y aplicaciones.....	92
Tabla 10.	Componentes instrumentales de los equipos ICP-MS utilizados.....	113
Tabla 11.	Condiciones instrumentales para el análisis de selenio por ICP-MS.	129
Tabla 12.	Datos de calibración y características analíticas para la determinación de selenio por ICP-MS con introducción de muestra por nebulización continua.....	137
Tabla 13.	Señal analítica (media \pm desviación típica) para las tres relaciones m/z de selenio estudiadas en ambos modelos de ICP-MS.....	138

Tabla 14.	Dispersión del sistema de inyección en flujo en función del volumen de inyección a un caudal de disolución portadora de 1,0 mL/min. Los resultados son media de los obtenidos para 50 y 100 µg/L de selenio.....	141
Tabla 15.	Datos de calibración y características analíticas para la determinación de selenio por ICP-MS con inyección en flujo (volumen de inyección de 100 µL).....	142
Tabla 16.	Efecto interferente de elementos matriz sobre la señal de 50 µg/L de selenio. (Los resultados son la media de los obtenidos a las tres relaciones m/z 77,78 y 82).....	148
Tabla 17.	Estudio del efecto de la dispersión del analito en el sistema de inyección en flujo sobre la señal de selenio para 50 µg/L, en presencia de 2500 mg/L de Mg, Ca o Cr. Resultados expresados como Señal Relativa (%).....	151
Tabla 18.	Efecto que la potencia de rf de entrada ejerce sobre la precisión (expresada como desviación típica relativa) en la determinación de Se ^{IV} por HG-ICP-MS (m/z=78), a través de la introducción de muestra en continuo y por inyección en flujo.....	162
Tabla 19.	Máxima relación <i>Ion interferente:Se^{IV}</i> tolerada en el análisis de 5.0 µg/L de Se ^{IV} por FI-HG-ICP-MS.....	163
Tabla 20.	Datos de calibración y características analíticas para la introducción de muestras en continuo y por inyección en flujo (FI) en HG-ICP-MS.....	164
Tabla 21.	Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de selenio por FI-HG-ICP-MS.....	165
Tabla 22.	Resultados obtenidos en los estudios de recuperación sobre muestras de agua de grifo adicionadas con Se ^{IV} . Análisis realizado por FI-HG-ICP-MS.....	166
Tabla 23.	Resultados obtenidos en el análisis de una muestras de suero liofilizado por FI-HG-ICP-MS.....	167

Tabla 24.	Límites de detección obtenidos para la determinación de selenio en ambos modelos de ICP-MS en función del sistema de introducción de muestra.....	168
Tabla 25.	Desviaciones típicas relativas obtenidas a través de los diferentes sistemas de introducción de muestra acoplados al ICP-MS. Condiciones de operación indicadas en la Tabla 11.....	169
Tabla 26.	Valores de t_r/w y de resolución cromatográfica obtenidos en función del caudal de fase móvil empleado en la separación cromatográfica (25 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie).....	178
Tabla 27.	Valores de R_S obtenidos para diferentes concentraciones de contraión (TEAB) en una columna Hamilton PRP-1.....	181
Tabla 28.	Efecto del porcentaje de acetonitrilo presente en la fase móvil (1.0 mmol/L de TEAB a $\text{pH}=4$) sobre la resolución cromatográfica, en una columna Hamilton PRP-1.....	182
Tabla 29.	Valores de R_S para las especies de Se (5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) en función del pH de la fase móvil, en una columna Spherisorb ODS/ NH_2 y a un caudal de 1.0 mL/min.....	191
Tabla 30.	Valores de t_r/w obtenidos para especies de selenio en función del caudal de fase móvil (fosfato 5.0 mmol/L a $\text{pH}=6.0$) en una columna Spherisorb ODS/ NH_2	192
Tabla 31.	Efecto de la fuerza iónica sobre la señal de selenio (5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) por HPLC-ICP-MS empleando el <i>método cromatográfico a $\text{pH}=6$</i>	197
Tabla 32.	Datos de calibración y características analíticas para la determinación de especies de selenio por HPLC-ICP-MS (volumen de inyección de 100 μL).....	199
Tabla 33.	Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de especies de selenio por HPLC-ICP-MS, bajo las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 11.....	200

Tabla 34.	Estudio de recuperación sobre muestras de orina procesadas a través de cartuchos de C_{18} , adicionadas con $5 \mu\text{g/L}$ de cada una de las especies de selenio. Los resultados son la media $\pm s$, para 3 experimentos separados.....	212
Tabla 35.	Ecuaciones de calibración para las distintas especies de selenio por FI-ICP-MS a relación $m/z=82$ (modelo PQ3).....	214
Tabla 36.	Pendientes de calibración obtenidas en la determinación de Se total por FI-ICP-MS y de especies de Se por HPLC-ICP-MS, a través de los métodos de calibración convencional y de adiciones estándar.....	215
Tabla 37.	Concentración de Se total y en forma de especies, en $\mu\text{g/L}$, para las muestras de orina analizadas procedentes de tres individuos (A, B y C) (media $\pm s$, $n=3$).....	216
Tabla 38.	Concentración de selenio total encontrada en muestras de atún y mejillón liofilizadas, en el análisis por ICP-MS.....	221
Tabla 39.	Composición general para la fracción comestible en mejillón y atún frescos [Belitz y col., 1997] y liofilizados.....	222
Tabla 40.	Comparación entre los resultados obtenidos en la determinación de selenio total en muestras de atún y mejillón liofilizadas, antes y después del proceso de extracción de grasas.....	223
Tabla 41.	Estabilidad de las especies SeCys_2 , SeMet , Se^{IV} y Se^{VI} ($25 \mu\text{g/L}$ de Se por especie) en función de la temperatura y de la concentración de ácido, para un tiempo de calentamiento de una hora (los resultados son la media de 3 ensayos).....	225
Tabla 42.	Estabilidad de las especies de Se ($25 \mu\text{g/L}$ de Se por especie) cuando están presentes de forma conjunta en la disolución, calentadas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora, en función de la concentración clorhídrica del medio. Los resultados se expresan como porcentajes de recuperación (media $\pm s$, para tres ensayos).....	227
Tabla 43.	Resultados obtenidos en la hidrólisis ácida ($70 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 hora, medio HCl 3N) de las muestras de atún T22 (7) y (10) y porcentaje de recuperación tras la adición de $25 \mu\text{g/L}$ de Se por especie, de forma previa al proceso de hidrólisis.....	229

Tabla 44. Porcentajes de recuperación de selenio total obtenidos por mineralización del el extracto líquido y de la fase sólida resultantes de la hidrólisis enzimática de muestras de atún y mejillón (250 mg), con subtilisina (25 mg) y medio fosfato 0.1 M a pH=7.5.....	231
Tabla 45. Porcentajes de recuperación de selenio total, contenido en las fases sólida (f.s.) y líquida (f.l.) resultantes del proceso de hidrólisis enzimática, en función de la cantidad de enzima empleada.....	232
Tabla 46. Porcentajes de recuperación de selenio total, obtenidos por mineralización del extracto líquido resultante tras la hidrólisis enzimática de muestras de atún y mejillón en dos etapas consecutivas.....	234
Tabla 47. Pendientes de calibración obtenidas en la determinación de especies de Se por HPLC-ICP-MS (<i>método cromatográfico a pH=2.7</i>), a través de los métodos de calibración convencional y de adiciones estándar a los extractos de atún y mejillón.....	240
Tabla 48. Concentración de Se total y de las especies encontradas en muestras de atún y mejillón ($\mu\text{g/g}$). Porcentaje de recuperación (%R), calculado como la relación entre la suma de las concentraciones de las especies y el total.....	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama E-pH del selenio en concentración 0.01M.....	9
Figura 2.	Diagramas distribución para diferentes especies de selenio: seleniuro de hidrógeno, selenometionina, selenocistina, selenito y seleniato en función del pH [Goessler y col., 1997].....	11
Figura 3.	Posibles transformaciones químicas y bioquímicas implicadas en el medioambiente. [Fishbein, 1991].....	18
Figura 4.	Respuesta biológica en función de la concentración de selenio [Cámara y col., 1995].....	22
Figura 5.	Aspectos conocidos del metabolismo del selenio en mamíferos [Janghorbani y col., 1989].....	28
Figura 6.	Diagrama esquemático del equipo de ICP-MS modelo VG PlasmaQuad3 [Thermo Instruments].....	30
Figura 7.	Multiplicador de electrones secundarios de dínodos discretos (Manual VG PlasmaQuad 3).....	35
Figura 8.	Esquema para la determinación de especies en discontinuo con métodos selectivos para Se(IV).....	73
Figura 9.	Esquemas de acoplamiento del sistema de generación de hidruros, en continuo (figura superior) y con inyección en flujo (figura inferior), al ICP-MS.....	121
Figura 10.	Esquema de preparación de muestras de orina.....	125
Figura 11.	Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (Eclipse) para 50 µg/L de selenio, en función del caudal de gas de nebulización.....	135
Figura 12.	Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (PQ3) para 10 µg/L de selenio, en función del caudal de gas de nebulización.....	135
Figura 13.	Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (modelo PQ3) para 10 µg/L de Se en función de la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma.....	136

Figura 14. Efecto ejercido sobre la señal de Se por elementos con P.I.<5.2 eV (Na, K y Ba) en la introducción de muestra por nebulización continua (I: 50 y II: 100 µg/L de Se) y por inyección en flujo (III: 50 y IV: 100 µg/L de Se).....	146
Figura 15. Efecto matriz sobre la señal de Se producido por elementos con 5.2<P.I.<7.8 eV (Mg, Ca, Al y Cr) en la introducción de muestra por nebulización continua (I: 50 y II: 100 µg/L de Se) y por inyección en flujo (III: 50 y IV: 100 µg/L de Se).....	147
Figura 16. Señal relativa para 50 µg/L de selenio frente a la concentración molar de los cationes interferentes con introducción de muestra por nebulización continua (figura superior) y por inyección en flujo (figura inferior).....	149
Figura 17. Efecto del caudal de nebulización sobre la señal de selenio (25 µg/L) en ausencia (Se) y presencia de 1000 mg/L de Mg, Ba o Cr...	152
Figura 18. Efecto de la potencia de radiofrecuencia aplicada sobre la señal de selenio (25 µg/L) en ausencia y presencia de 1000 mg/L de Mg, Ba o Cr.....	154
Figura 19. Efecto de la concentración de NaBH ₄ sobre la señal de 2 µg/L de Se ^{IV}	157
Figura 20. Efecto de la concentración de HCl sobre la señal de 2 µg/L de Se ^{IV}	158
Figura 21. Efecto de la relación entre los caudales de HCl y NaBH ₄ sobre la sensibilidad para 2.0 µg/L de Se ^{IV} . (HCl:NaBH ₄ = 1:1; 1:0.5 y 1:0.33)..	159
Figura 22. Señales transitorias para 2 µg/L de Se ^{IV} obtenidas por FI-HG-ICP-MS en función del volumen de inyección.....	160
Figura 23. Variación de la señal para 2.0 µg/L de Se ^{IV} con el caudal de gas portador y la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma: 1150 y 1350W.....	161
Figura 24. Cromatograma obtenido para 25 µg/L de Se por especie, en una columna Hamilton PRP-1 con 0.625 mmol/L de TEAB a pH=4.0 y un 3% de acetonitrilo [Potin-Gautier y col., 1993]. Detección por ICP-MS a un caudal de fase móvil de 1.0 mL/min.....	179

Figura 25. Efecto de la concentración de TEAB sobre la retención de las cuatro especies de selenio estudiadas sobre una columna Hamilton PRP-1 (25 µg/L de Se por especie).....	180
Figura 26. Cromatograma obtenido sobre un columna Hamilton PRP-1, empleando como fase móvil TEAB 1.0 mmol/L a pH=4, en Acetonitrilo al 1% (v/v) a 1.0 mL/min.....	183
Figura 27. Efecto de la concentración de PSNS sobre los factores de capacidad de las especies de selenio en una columna Hamilton PRP-1 (25 µg/L de selenio por especie).....	184
Figura 28. Efecto del pH de la fase móvil (PSNS 1.0 mmol/L a pH=4 y un 1% v/v de acetonitrilo) sobre la retención de las especies de selenio en una columna Hamilton PRP-1.....	185
Figura 29. Cromatograma obtenido con una columna Hamilton PRP-1, empleando como fase móvil PSNS 1.0 mmol/L a pH=4.0 y con un 1% (v/v)de acetonitrilo a 1.0 mL/min.....	186
Figura 30. Cromatograma obtenido por cromatografía de cambio aniónico fuerte, con una columna Spherisorb SAX y detección por ICP-MS (20 µg/L de selenio por especie).....	188
Figura 31. Efecto del pH de la fase móvil (fosfato 5.0 mmol/L) empleada en una columna Spherisorb ODS/NH ₂ (5 µg/L de Se por especie).....	190
Figura 32. Efecto de la concentración de tampón fosfato empleado como fase móvil a pH=6.0, sobre la retención de las especies de selenio (5 µg/L de Se por cada especie) en una columna Spherisorb ODS/NH ₂	193
Figura 33. Cromatograma obtenido sobre una columna Spherisorb ODS/NH ₂ empleando un gradiente de concentración de fosfato desde 3.5 a 7.0 mmol/L a pH=6.0 (<i>método cromatográfico a pH=6</i>).....	194
Figura 34. Cromatograma obtenido sobre una columna Spherisorb ODS/NH ₂ empleando como fase móvil una disolución de fosfato 5.0 mmol/L a pH=2.7 (<i>método cromatográfico a pH=2.7</i>).....	195

Figura 35. Influencia de la fuerza iónica sobre la retención de las especies de selenio (5 µg/L de Se por especie) empleando el <i>método cromatográfico a pH=6</i>	196
Figura 36 Cromatogramas obtenidos por HPLC-ICP-MS, para las muestras de orina (dilución 1/5) de tres individuos (A, B y C) a través del <i>método cromatográfico a pH=2.7</i> (Spherisorb ODS/NH ₂ , fosfato 5 mmol/L a pH=2.7).....	206
Figura 37. Cromatogramas obtenidos por HPLC-ICP-MS, para las muestras de orina (dilución 1/5) de tres individuos (A, B y C) a través del <i>método cromatográfico a pH=6.0</i> (Spherisorb ODS/NH ₂ , fosfato 3.5 y 7 mmol/L a pH=6.0).....	207
Figura 38. Comparación entre el cromatograma obtenido para la orina (individuo A) a dilución 1/5 y su adición de 5 µg/L de Se como TMSe ⁺ , SeCys ₂ , SeMet y SeEt, a través del <i>método cromatográfico a pH=2.7</i>	209
Figura 39. Comparación entre el cromatograma obtenido para la orina (individuo A) a dilución 1/5 y su adición de 5 µg/L de Se como TMSe ⁺ , SeCys ₂ , SeMet, SeEt, Se ^{IV} y Se ^{VI} a través del <i>método cromatográfico a pH=6.0</i>	209
Figura 40. Cromatograma obtenido en una columna Spherisorb ODS/NH ₂ para la orina (individuo A) a dilución 1/5, con la adición de 5 µg/L de Se ^{IV} , empleando como fase móvil una disolución de fosfato 2.5 mmol/L a pH=6.....	210
Figura 41. Estabilidad de especies de Se presentes en muestras de orina, en contenedores de polietileno y vidrio pyrex a -18 y 4 °C.....	219
Figura 42. Comparación entre el cromatograma obtenido para una disolución patrón de SeMet tras el calentamiento a 100 °C durante una hora en medio HCl 3N (muestra) y la señal de referencia correspondiente, junto con la adición de la especie Se ^{IV} (25 µg/L). Empleando el <i>método cromatográfico a pH=6</i>	226

-
- Figura 43.** Cromatogramas obtenidos a través del *método cromatográfico a pH=2.7* para las muestra de atún T22 (7) y (10) y el material certificado de mejillón (CRM 278), sometidas a hidrólisis enzimática..... 236
- Figura 44.** Cromatogramas obtenidos para los extractos procedentes de la hidrólisis enzimática de la muestra de atún T22 (7) y el mejillón certificado (CRM 278), a un nivel de dilución de 1/4 y 1/2 respectivamente. Comparación con la adición de 2.5 µg/L de Se para cada una de las especies orgánicas. *Método cromatográfico a pH=2.7*..... 238
- Figura 45.** Cromatogramas obtenidos empleando el método cromatográfico a pH=6, para los extractos procedentes de la hidrólisis enzimática de la muestra de atún T22 (7) y el mejillón certificado (CRM 278), a un nivel de dilución del extracto 1/2..... 239

ABREVIATURAS

AAS	espectroscopía de absorción atómica
ACN	acetonitrilo
AES	espectrometría de emisión atómica
AFS	espectroscopía de fluorescencia atómica
CT	atrapamiento criogénico
DAN	2,3 diaminonaftaleno
DDAB	bromuro de didodecildimetilamonio
DESe	dietildiseleniuro
DESe	dietilseleniuro
DIN	nebulización de inyección directa
DNP	dinitrofenil
DMDS_e	dimetildiseleniuro
DMSe	dimetilseleniuro
DPCSV	voltamperometría de redisolución catódica por diferencia de impulsos
DPP	polarografía diferencial de impulso
DTPA	ácido dietilendiaminopentaacético
CRM	material de referencia certificado
ECD	detector de captura electrónica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ETAAS	espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotrémica
FAAS	espectroscopía de absorción atómica con llama
FI	inyección en flujo
FID	detector de ionización en llama
FRX	fluorescencia de rayos X
FPD	detector de fotometría de llama
GC	cromatografía de gases
HG	generación de hidruros
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HSNS	heptanosulfonato sódico
ICP	plasma de acoplamiento inductivo

ID-MS	espectrometría de masas con dilución isotópica
KHP	hidrógeno ftalato potásico
L.D.	límite de detección
MFS	espectroscopía de fluorescencia molecular
MIP	plasma inducido por microondas
MeOH	metanol
MS	espectrometría de masas
MW	microondas
NAA	análisis por activación neutrónica
PI	potencial de ionización
PMPE	polimetafenileter
PSNS	pentanosulfonato sódico
PTFE	politetrafluoretileno
QFAAS	espectroscopía de absorción atómica con célula de cuarzo
Se-aa	seleno-aminoácidos
SeCys	selenocisteína
SeCys₂	selenocistina
SeEt	selenoetionina
SeMet	selenometionina
TBAB	bromuro de tetrabutilamonio
TEAB	bromuro de tetraetilamonio
THG	generación de hidruros termoquímica
TMSe⁺	ión trimetilselenonio
TRIS	(hidroximetil) aminometano
USN	nebulización ultrasónica
UV	ultravioleta

OBJETO DEL TRABAJO

El selenio es un elemento esencial que interviene en los procesos metabólicos formando parte de enzimas como la glutadiona peroxidasa, que cataliza la reducción de los peróxidos previniendo así el envejecimiento de las células. Por otro lado se ha comprobado que algunas especies de selenio, en su interacción con la vitamina E, son capaces de inhibir procesos cancerígenos. Por todo esto, no sólo es necesario el conocimiento del contenido total de selenio, sino de sus distintas formas químicas, con en fin de contribuir a conocer mejor estos procesos y las vías de su asimilación e incorporación a los tejidos de los seres vivos. El estudio se ha realizado tanto sobre alimentos como en líquidos biológicos.

Los problemas que surgen de esta investigación son complejos y variados, y se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Necesidad de determinar en matrices con un alto contenido en sales o en compuestos orgánicos, concentraciones de selenio extraordinariamente bajas, del orden de ng/g o inferiores, si se quiere cuantificar especies.
- Falta de estabilidad temporal de las especies, pudiéndose producir interconversiones entre las mismas en función del tiempo o de las condiciones de almacenamiento.
- Necesidad de no alterar la forma química de las especies durante los procesos de tratamiento de muestra, para extraer y poner en disolución dichas especies.
- Desarrollar métodos de separación de las distintas especies en presencia de matrices de alta complejidad como son: suero sanguíneo, orina, pescados y moluscos.

Los objetivos concretos que se abordan en esta memoria para lograr superar estas dificultades son:

1. Desarrollo de un método para determinar selenio mediante Espectrometría de Masas con Plasma acoplado inductivamente como fuente de iones (ICP-MS), que alcance el límite de detección requerido en las matrices a analizar, teniendo en cuenta la dificultad que presenta este elemento debido a su elevado potencial de ionización y a la interferencia espectral que produce el argón sobre el isótopo más abundante ^{80}Se .
2. Estudio del efecto que los compuestos mayoritarios y minoritarios, presentes en las muestras, producen sobre la señal analítica del selenio.
3. Desarrollo de una metodología que implique una disminución de las interferencias de matriz, como es la introducción de la muestra por inyección en flujo, o bien en forma de vapor mediante la generación del hidruro de selenio.
4. Evaluación del acoplamiento de la Cromatografía de líquidos a la Espectrometría de Plasma-Masas (HPLC-ICP-MS) con el fin de alcanzar una elevada resolución y sensibilidad para las distintas especies seleccionadas: trimetilselenonio, selenocistina, selenometionina, selenoetionina, selenito y seleniato.
5. Puesta a punto de métodos de extracción que no alteren la forma química original de las especies, basados en la hidrólisis ácida o enzimática de las muestras.
6. Mejora de la estabilidad de las especies presentes en las muestras de manera que sea posible su conservación durante un mayor intervalo de tiempo.
7. Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de Selenio y de sus especies en fluidos biológicos, suero y orina, y en muestras de alimentos, atún y mejillón.

PARTE TEÓRICA

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. SELENIO

1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SELENIO

El selenio pertenece al grupo VIA, actualmente grupo 16, de la Tabla Periódica. Situado entre el azufre y el telurio, posee propiedades físico-químicas intermedias entre metal y no metal, sin embargo en muchos aspectos, su semejanza al primero es más pronunciada. Su número atómico es de 34 y se presenta en la naturaleza bajo seis formas isotópicas (Tabla 1), que en función de sus abundancias relativas, confieren a este elemento una masa atómica de 78.96.

Tabla 1. Isótopos naturales de selenio y sus abundancias relativas.

Isótopo	⁷⁴ Se	⁷⁶ Se	⁷⁷ Se	⁷⁸ Se	⁸⁰ Se	⁸² Se
Abundancia(%)	0.87	9.02	7.58	23.52	49.82	9.19

Existen también tres isótopos artificiales de corta vida muy empleados en técnicas radiológicas y en activación neutrónica, los cuales son ⁷⁵Se, ^{77m}Se y ^{82m}Se [Newland, 1982].

Posee una configuración electrónica externa $3d^{10}4s^24p^4$ y puede presentar cuatro estados de oxidación: (-II), 0, (IV) y (VI). Con el estado de oxidación (-II), presenta su química de no metal con el hidrógeno y con elementos metálicos, dando lugar a sales insolubles en suelos. Por otro lado, da lugar a la mayoría de las especies orgánicas (organometálicos), formando compuestos metilados e incluso llegando a sustituir al azufre en aminoácidos como la selenometionina y la selenocisteína.

El estado de oxidación (0) corresponde al selenio elemental, presente en la naturaleza bajo diferentes formas alotrópicas:

El *selenio rojo*, que puede aparecer como sólido amorfo de estructura vítrea, o bien bajo dos formas cristalinas α y β , ambas de geometría monoclinica pero diferente estructura molecular [Gutiérrez Ríos, 1984]. Las dos formas cristalinas contienen

moléculas Se_8 , y se transforman fácilmente en selenio rojo amorfo, aunque no existe una temperatura definida de transición [Burriel y col., 1983]. La forma amorfa también se obtiene por reducción química de los selenitos y seleniatos.

El *selenio gris* o metálico, de geometría hexagonal, es considerado como la forma más estable de este elemento. Se emplea industrialmente por sus propiedades de semiconductor, aumentando su conductividad eléctrica con la temperatura y principalmente con la exposición a la luz [Nazarenko y Ermakow, 1972].

El *selenio negro*, posee estructura vítrea, y es la forma comercial ordinaria del metal. Se obtiene por enfriamiento rápido de selenio fundido. Posee estructura polimérica en forma de anillos, donde cada anillo contiene hasta mil átomos de selenio [Burriel y col., 1983]. Puede transformarse en selenio gris hexagonal, por calentamiento a 180-190 °C.

Los estados de oxidación (IV) y (VI) dan lugar a compuestos inorgánicos como haluros (SeF_4 , SeF_6), óxidos (SeO_2 , SeO_3) y ácidos (H_2SeO_3 , H_2SeO_4). Muchas oxisales (selenitos y seleniatos) son solubles en agua [Fishbein, 1991].

Propiedades redox

La Figura 1 muestra el diagrama E-pH para el selenio, en ella se observa se observa que el Se(-II) es un reductor fuerte y por lo tanto puede ser oxidado con facilidad. El Se(0) es poco reductor, sobre todo en medio ácido, por lo que requiere la acción de oxidantes fuertes. La oxidación al aire ocurre lentamente, dando lugar a SeO_2 . La oxidación en ácido nítrico y en agua regia produce ácido selenioso, H_2SeO_3 , liberando SeO_2 . Por tratamiento con peróxido de hidrógeno, persulfatos y bromo se produce la oxidación a ácido selénico, H_2SeO_4 . La reacción con ácido sulfúrico produce una disolución de color verde, que contiene sulfatos y polisulfatos del catión tetrámero Se_4^{2+} . Se han podido aislar los sólidos $\text{Se}_4(\text{S}_4\text{O}_{13})$ y $\text{Se}_4(\text{S}_4\text{O}_7\text{H})_2$ de color amarillo y naranja respectivamente.

El Se(IV) se reduce fácilmente a selenio elemental, en medio ácido fuerte, por la acción de reductores como dióxido de azufre, cloruro estannoso, yoduro potásico, cinc

metálico, ácido ascórbico y tiourea. La reacción con oxidantes más fuertes como cloro gas, peróxido de hidrógeno, permanganato o dicromato, produce Se(VI).

El Se(VI) es termodinámicamente oxidante y su reducción está favorecida cinéticamente. El tratamiento por ebullición con ácido clorhídrico concentrado produce Se(IV). Sin embargo, la reducción a selenio elemental requiere de reductores fuertes como tricloruro de titanio, ácido hipofosforoso, fenilhidracina en caliente, etc.

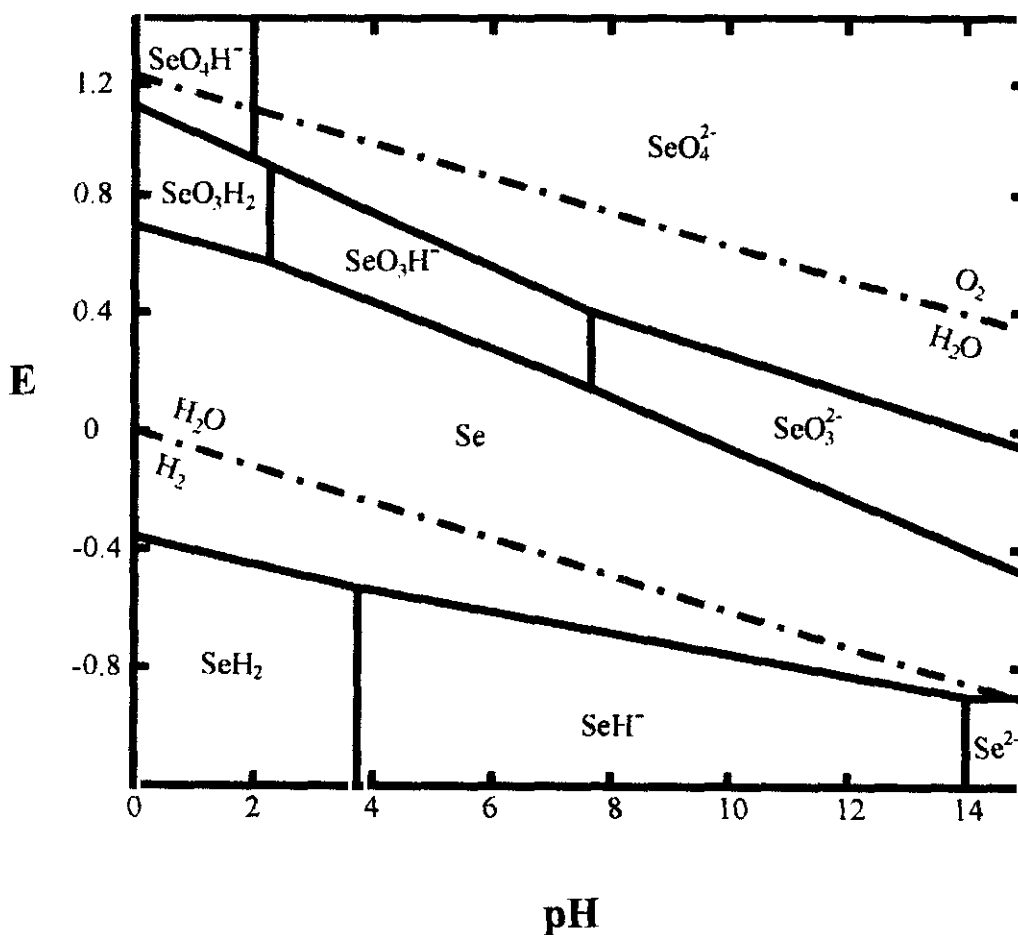


Figura 1. Diagrama E-pH del selenio en concentración 0.01M.

Propiedades ácido-base

La forma ácida del Se(-II) es el ácido selenhídrico o seleniuro de hidrógeno (H_2Se). A temperatura ambiente se encuentra en estado gas, caracterizándose por su mal

olor y extrema toxicidad. Se comporta como un ácido débil en medio acuoso ($pK_1=3.8$ y $pK_2=14.0$). También en este estado de oxidación forma seleno-aminoácidos. Los aminoácidos primarios, como la selenometionina (SeMet), poseen dos constantes de protonación, debido a la presencia de los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_3^+$. Los valores de estas constantes resultan ser: $pK_1=2.19$ para el grupo $-\text{COOH}$ y $pK_2=9.05$ para el grupo $-\text{NH}_3^+$ [Rivail da Silva y col., 1997]. Los aminoácidos secundarios como la selenocistina, tienen cuatro constantes de protonación. Los valores calculados para este aminoácido son: $pK_1=1.68$ y $pK_2=2.15$ para los grupos $-\text{COOH}$, $pK_3=8.07$ y $pK_4=8.94$ para los grupos $-\text{NH}_3^+$. A la vista de estos valores, los aminoácidos se presentan en forma de zwitterion en el intervalo de pH entre 2 y 8. La selenocisteína se presenta en forma de aminoácido primario, sin embargo, al final de la cadena presenta un grupo selenol ($-\text{SeH}$) cuyo pK_a es de 5.2, por lo que se encuentra en forma aniónica a pH fisiológico.

El ácido selenioso, H_2SeO_3 , se comporta como un ácido de fuerza intermedia, dando lugar a HSeO_3^- ($pK_1=2.46$) y SeO_3^{2-} ($pK_2=7.31$). El anión HSeO_3^- es más ácido que básico y el SeO_3^{2-} es una base débil.

El ácido selénico, H_2SeO_4 , se comporta como un ácido fuerte en su primera disociación, predominando la especie monoprotonada a pHs muy ácidos (HSeO_4^-). En medio ácido ($pK_2=1.92$), pierde el segundo protón y se presenta en forma de oxoanión, SeO_3^{2-} .

En la Figura 2 se ha representado los diagramas de distribución para algunas especies de selenio en función del pH.

pH													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
H ₂ Se			HSe ⁻										Se ⁻²
H ₂ SeMet ⁺		HSeMet							SeMet ⁻				
H ₄ SeCys ₂ ²⁺		H ₂ SeCys ₂						SeCys ₂ ⁻²					
H ₃ SeCys ₂ ⁺							HSeCys ₂ ⁻						
H ₂ SeO ₃		HSeO ₃ ⁻					SeO ₃ ⁻²						
HSeO ₄ ⁻		SeO ₄ ⁻²											

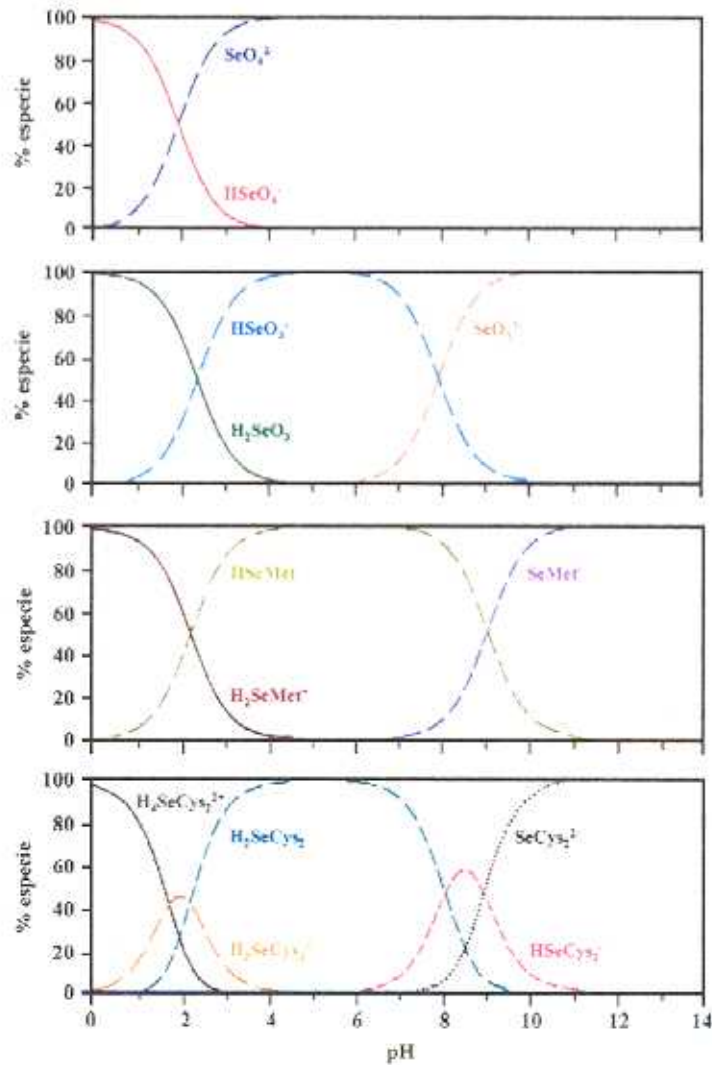


Figura 2. Diagramas de distribución para diferentes especies de selenio: seleniuro de hidrógeno, selenometionina, selenocistina, selenito y seleniato en función del pH [Goessler y col., 1997].

1.2. EL SELENIO EN EL MEDIOAMBIENTE

1.2.1. Compuestos de selenio presentes en el medioambiente

El contenido medio de selenio en la corteza terrestre es de 0.05-0.09 $\mu\text{g/g}$, generalmente se encuentra asociado a otros metales en forma de seleniuros metálicos (Cu_2Se , HgSe , Ag_2Se ...), las mayores concentraciones encontradas corresponden a rocas volcánicas (por encima de 120 $\mu\text{g/g}$), depósitos de uranio y rocas carbonáceas [Fishbein, 1983; Merian, 1985]. La producción anual de selenio en el mundo es del orden de 1300 a 1500 toneladas [Högberg y Alexander, 1986; Alexander y col., 1988], gran parte se obtiene como subproducto en el refinado electrolítico de otros metales.

En la Tabla 2 se presentan las principales especies de selenio encontradas en el ambiente y en medios biológicos.

1.2.2. Aplicaciones industriales del selenio y sus compuestos

A causa de las propiedades fisico-químicas del selenio, éste interviene de forma constante en las actividades industriales. En la Tabla 3 se indican las aplicaciones de algunos compuestos de selenio.

Debido a sus características fotoeléctricas y como semiconductor, la mayor parte de la producción de selenio se emplea en procesos electrónicos (25-35%), también es notable su utilización en la industria de vidrio (27-30%) y algo menos en el desarrollo de pigmentos inorgánicos (14%). El resto se emplea en diversas actividades: como agentes aceleradores y/o vulcanizadores en la producción de caucho, acero inoxidable, en el desarrollo de lubricantes y xerografía entre otros. Las aplicaciones médicas incluyen desde un simple tratamiento de la caspa, hasta el empleo limitado de selenio radiactivo ($[^{75}\text{Se}]$ -selenometionina) como agente marcador para el diagnóstico y seguimiento de varios tumores malignos.

Tabla 2. Principales especies de selenio encontradas en el ambiente y en medios biológicos [Shibata y col., 1992].

ESTADO DE OXIDACIÓN	ESPECIE QUÍMICA	
VI	selenatos (sales inorgánicas)	SeO_4^{2-}
IV	selenitos (sales inorgánicas)	SeO_3^{2-}
0	selenio elemental	$\text{Se}(0)$
-II	seleniuros metálicos	Me_2Se_n
Formas metiladas	dimetilseleniuro, DMSe (volátil)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$
	dimetildiseleniuro, DMDSe (volátil)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$
	dietilseleniuro, DESe (volátil)	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{Se}$
	trimetilselenonio, TMSe^+	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Aminoácidos	selenometionina, SeMet	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}^-$ NH_3^+
	selenocisteína, SeCys	$^-\text{SeCH}_2\text{CHCOO}^-$ NH_3^+
	selenocistina, SeCys ₂	$^-\text{OOCCHCH}_2\text{Se-SeCH}_2\text{CHCOO}^-$ $\text{NH}_3^+ \quad \text{NH}_3^+$
	selenoetionina, SeEt	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}^-$ NH_3^+
	seleno-metil-SeMet	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}^-$ $\text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+$
	seleno-metil-SeCys	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CHCOO}^-$ NH_3^+
	selenohomocisteína	$^-\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOO}^-$ NH_3^+

Las aplicaciones industriales del selenio dan lugar a emisiones al medioambiente. Los compuestos de selenio emitidos, sufren transformaciones que pueden remitir o incrementar sus efectos nocivos.

Tabla 3. Principales aplicaciones industriales de los compuestos de selenio
[Fishbein, 1991; Cámara y col., 1995].

COMPUESTO	APLICACIÓN
selenio (Se(0))	células fotoeléctricas, xerografía, procesos de deshidrogenación catalítica
seleniato sódico (Na₂SeO₄)	fabricación de vidrio, insecticidas, medicamentos veterinarios
selenito sódico (Na₂SeO₃)	fabricación de vidrio y elaboración de abonos enriquecidos en selenio
dietilditiocabamato de selenio	como fungicida, agente vulcanizante
mono y disulfuros de selenio (SeS y SeS₂)	veterinaria y tratamientos médicos anti-caspa
dióxido de selenio (SeO₂)	para oxidación catalítica, hidrogenación y deshidrogenación de compuestos orgánicos
hexafluoruro de selenio (SeF₆)	como aislante eléctrico gaseoso
oxicloruro de selenio (SeOCl₂)	disolvente para azufre, telurio, selenio, gomas, resinas, adhesivos asfálticos, y otros materiales
seleniuro aluminico (Al₂Se₃)	preparación de hidruro de selenio para semiconductores
selenito amónico [(NH₄)₂SeO₃]	fabricación de vidrio rojo
seleniuro de cadmio (CdSe)	fotoconductores, células fotoeléctricas
seleniato cúprico (CuSeO₄)	aleaciones de cobre y colorante
diseleniuro de tungsteno (WSe₂)	lubricantes

1.2.3. Distribución de especies de selenio en el medioambiente

AIRE

La cantidad de selenio total encontrada en el aire se sitúa entre 0.01-30 ng/m³ en función de su localización, generalmente los valores más altos corresponden a áreas urbanas e industrializadas [Fishbein, 1991]. Una pequeña fracción de selenio puede

existir en estado gaseoso en la atmósfera, sin embargo la mayoría del selenio atmosférico se encuentra en forma particulada.

El selenio se emite de modo natural a la atmósfera en forma de alquilseleniuros volátiles, selenio elemental y dióxido de selenio, el cual puede sufrir transformaciones químicas como hidratarse, reducirse (por presencia de SO_2) u oxidarse por el oxígeno del aire, estas transformaciones han originado la presencia de selenitos y seleniatos en agua de lluvia [Robberecht y Van Grieken, 1980]. Los procesos de emisión natural incluyen: erosión natural de las rocas, emisiones volcánicas, actividad de los microorganismos y de las plantas [Cutter, 1985]. El 70% de la emisión natural es de origen biogénico marino, aunque la concentración de alquilseleniuros en aire es del orden de unos pocos ng/m^3 .

La mayor parte de la emisión de selenio a la atmósfera procede de fuentes antropogénicas, por procesos de combustión de materiales fósiles, fundiciones y refinerías, fábricas de vidrio y cerámica, y otras industrias [NAS, 1976; Bennett, 1983]. Sin embargo, no existen indicaciones de un aumento global en la concentración de selenio en la atmósfera, posiblemente debido a una rápida sedimentación del selenio atmosférico [Raptis y col., 1983].

AGUAS

El selenio puede presentarse en aguas naturales preferentemente como seleniato y en menor proporción como selenito. Además, como resultado de transformaciones microbiológicas, pueden formarse especies metiladas volátiles de selenio. Generalmente, tanto en aguas superficiales como subterráneas, el nivel de concentración de selenio total es bajo, oscilando entre 0.02 y 10 $\mu\text{g/L}$, sin embargo, el contenido puede verse notablemente afectado por factores geológicos, llegando a superar los 6 mg/L en aguas subterráneas [Einbrodt y Michels, 1984; Glover y col., 1979]. La alteración de la acidez en las aguas y suelos da lugar a procesos de biotransformación. Por ejemplo, en presencia de hierro el selenio precipita como selenito férrico, insoluble en agua a pH inferior a 7, mientras que a pH básicos, ocurre la oxidación a seleniatos solubles, lo que

incrementa la concentración normal de selenio en aguas por encima de 10 a 400 $\mu\text{g/L}$ [Glover y col., 1979].

El medio marino se ha considerado como disolvente para algunas especies de selenio como selenitos, seleniatos y compuestos orgánicos. La fracción orgánica no ha sido caracterizada, pero se puede esperar que existan ácidos selenoaminos y sus derivados. En las superficies, los compuesto organoselénicos forman el 80% del selenio disuelto total, mientras que en el fondo, predominan las especies inorgánicas, sin evidencia de compuestos orgánicos de selenio. En aguas marinas el nivel de selenio encontrado como selenito es del orden de 0.004 $\mu\text{g/L}$ para las superficies y de 0.06 $\mu\text{g/L}$ en el fondo y como seleniato de 0.03 y 0.12 $\mu\text{g/L}$ respectivamente [Bruland, 1983].

La contaminación por selenio en los ecosistemas acuáticos, incluyendo océanos, se debe principalmente a vertidos urbanos e industriales. Por ejemplo, a través de la agricultura se drena agua con un contenido medio de selenio de 1.4 $\mu\text{g/L}$ [Knight y col., 1987], y se ha estimado que el vertido de selenio al mar es de unas 8000 toneladas anuales [Merian, 1985]. El selenio vertido puede sufrir transformaciones químicas, aunque también puede ser bioconcentrado. Se ha comprobado que la adición de selenito sódico a aguas de lagos interacciona en el metabolismo del mercurio, limitando la disponibilidad de éste por los organismos marinos.

SUELOS

La distribución de selenio en los suelos no es uniforme, varía entre 0.1 $\mu\text{g/g}$ en zonas deficientes, como Nueva Zelanda, China y Finlandia, y hasta alrededor de 80 $\mu\text{g/g}$ en áreas seleníferas, como Irlanda y parte de los Estados Unidos [Raptis y col., 1983]. En las superficies de suelos cultivados el contenido de selenio varía entre 0.1 y 2 $\mu\text{g/g}$ [Fishbein, 1991].

El selenio aparece en suelos ácidos y reductores como seleniuro, mientras que a pH neutros aparece como selenito férrico, de muy baja solubilidad y por consiguiente

con una reducida biodisponibilidad, en contraste, en suelos alcalinos y oxidantes se presenta como seleniato soluble que es absorbido por las plantas [NAS, 1976].

PLANTAS

En plantas, también están presentes formas químicas orgánicas de selenio. Parece que la forma orgánica predominante es la selenometionina. Se cree que el mecanismo consiste en la previa absorción de los seleniatos del suelo, reducción a selenito, incorporación a la cisteína reemplazando al azufre y posterior metabolización a metionina. En muchos casos, los compuestos de selenio son transformados por plantas y algas a formas volátiles (DMSe, DMDS_e y DESe), como mecanismo de defensa frente a la toxicidad [Dauchy y col., 1994].

Muchas plantas crecen sobre suelos seleníferos absorbiendo y acumulando selenio. Las plantas acumuladoras, generalmente no comestibles, pueden incorporar selenio, alcanzando concentraciones entre 100 y 5000 µg/g, mientras que en plantas no acumuladoras el contenido en selenio no supera 1 µg/g [Bennett, 1983].

Ciclo del selenio en el medioambiente

La transferencia de selenio desde el medioambiente al hombre y animales procede principalmente de dos vías: inhalación e ingestión. La incorporación de este elemento a través del aire es muy baja, proporcionando al cuerpo alrededor de 0.02 ng/g de peso, mientras que a través de la ingestión de agua y alimentos se obtiene del orden de 0.1 µg/g [Bennett, 1983]. Los mayores aportes de selenio proceden del consumo de vegetales, aunque también de pescados y mariscos debido a su capacidad de bioconcentración que alcanza un factor de 400 [Fishbein, 1991].

En la Figura 3, se exponen algunos procesos de transformación y transferencias de las especies de selenio, a través del medioambiente.

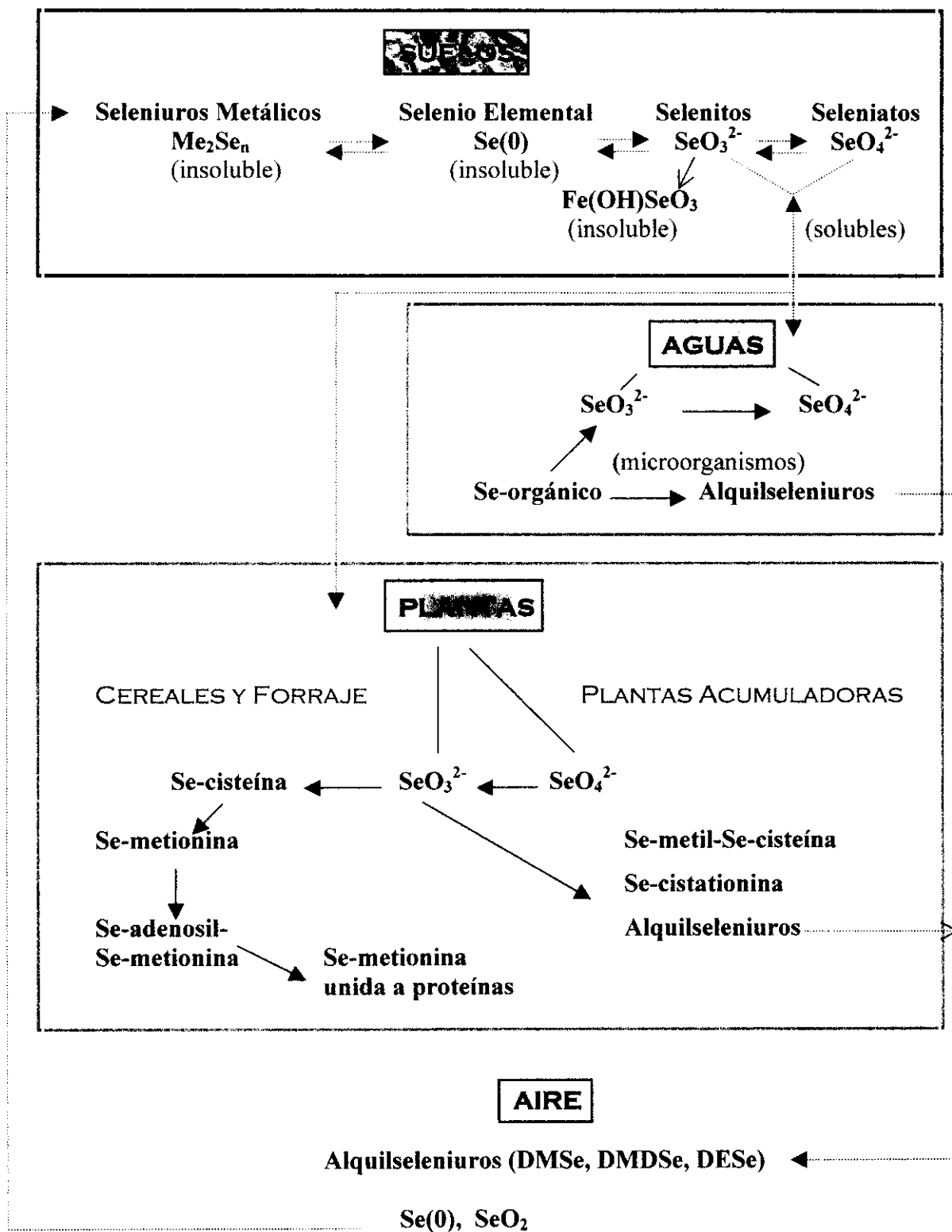


Figura 3. Posibles transformaciones químicas y bioquímicas implicadas en el medioambiente. [Fishbein, 1991].

1.3. EL SELENIO EN LA BIOQUÍMICA DE LOS SERES VIVOS

1.3.1. Toxicidad y esencialidad

El interés por el selenio desde que Berzelius y Gahn descubrieron su existencia en 1817, se debió a su potencial toxicidad; sin embargo, a partir de los estudios de Schwarz y Frotz en 1957, se demostró el carácter esencial del selenio en la bioquímica de los seres vivos. El comportamiento dual del selenio, respecto a su papel biológico, hace importante su estudio y control, con el fin de evitar desórdenes biológicos procedentes de una administración tanto deficiente como en exceso.

Una sustancia se considera tóxica cuando perjudica la salud de los seres vivos, produciendo daños importantes en tejidos, órganos y procesos biológicos. La intoxicación debida a una sustancia puede producirse por la ingestión puntual de elevadas concentraciones, dando lugar a lo que se conoce como *intoxicación aguda*, o bien a través de la administración de pequeñas dosis durante largos periodos de tiempo, ocasionando una *intoxicación crónica*. En los procesos agudos, los efectos adversos se observan de forma inmediata e intensa, mientras que en los crónicos, los síntomas surgen de forma progresiva y persistente en el tiempo, pudiendo degenerar en enfermedades graves.

Los primeros síntomas de intoxicación aguda por administración de selenio incluyen: infecciones cutáneas, irritación nasal y ocular, deficiencia respiratoria y caries, llegando a producir daños en órganos internos, edema vascular, hemorragias, edema pulmonar, taquicardia, parálisis, etc. [NAS, 1976; Newland, 1982; Olson, 1986]. La intoxicación crónica, conduce al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cirrosis e incluso cáncer.

En el hombre el selenio participa en algunas funciones biológicas, por ello su carácter esencial. La deficiencia en selenio, puede incrementar el riesgo de enfermedades cardiovasculares (enfermedad de Keshan), daños musculares e incluso producir ciertos tipos de cáncer. Otros sistemas afectados por la ingestión deficiente

incluyen la sangre, ojos, hígado, páncreas, piel, espermatozoides y testículos. La aparición de enfermedades por deficiencia en selenio provoca mayores pérdidas económicas que las causadas por su toxicidad [Vernie, 1984; Dietrich y col., 1995]. Las zonas más afectadas son aquellas donde el suelo contiene bajas concentraciones de selenio en forma química disponible para su asimilación por parte de la vegetación.

En el estudio del carácter tóxico y esencial del selenio, deben ser considerados factores como: la forma química que presenta el elemento, especie, concentración, así como las posibles transformaciones que puede sufrir el elemento debido a interacciones con el medio que le rodea.

Forma química

El selenio puede estar presente en muchas formas químicas, tanto orgánicas como inorgánicas.

Las especies orgánicas de los elementos se consideran en general más tóxicas que las especies inorgánicas debido a su naturaleza lipofílica, puesto que poseen mayor facilidad para difundir rápidamente a través de las membranas celulares [Morrison y col., 1989]. Sin embargo, muchas especies orgánicas de selenio son análogas a compuestos biológicos de azufre y forman parte de las proteínas, resultando esenciales como es el caso de los seleno-aminoácidos. Las especies metiladas de selenio, salvo el trimetilselenonio (TMSe^+), son volátiles y tóxicas a niveles de concentración elevados [Fishbein, 1991].

Dentro de las formas inorgánicas, Se, Se(-II), Se(IV) y Se(VI), el selenio elemental parece ser el menos tóxico, debido a que es el más insoluble y por lo tanto difícilmente asimilable por los organismos. Algunos estudios han sugerido que tanto el selenito como el seleniato son igualmente tóxicos, y a ambas especies se les han otorgado propiedades mutagénicas [Einbrodt y Michels, 1984; Högber y Alenxander, 1986]. Posteriores estudios sobre citotoxicidad y mutagenicidad reflejan que los compuestos de selenio, con la excepción del sulfuro de selenio, no actúan como carcinógenos a bajas o moderadas dosis [WHO, 1987], además, se ha comprobado que

algunas formas de selenio, en su interacción con la vitamina E, son capaces de inhibir procesos cancerígenos [Fishbein, 1991], e incluso en algunos estudios se ha encontrado que las formas inorgánicas son de cuatro a diez veces más efectivas, en la inhibición de proliferaciones tumorales, que las formas orgánicas como SeCys y SeMet [Milner, 1985].

Especie biológica

En general, el selenio no es esencial para las plantas sino que algunas plantas lo toleran. Se cree que la toxicidad de este elemento sobre las plantas se debe a que sustituye al azufre en las proteínas [Peterson y col., 1981].

La toxicidad debida a selenio en animales ha sido ampliamente revisada [Olson, 1986; WHO, 1987]. A través de estudios en laboratorio con animales se ha demostrado la importancia de factores como la especie animal, edad, y el sexo. Estos mismos estudios no han podido comprobarse de igual forma en el hombre. La toxicidad producida de forma natural sobre animales, procede de la ingestión de vegetación rica en selenio durante periodos prolongados de tiempo. Los efectos se manifiestan con pérdida de vitalidad, degeneración de órganos internos, necrosis, cirrosis y disminución de la hemoglobina en sangre entre otros, sin embargo, sólo algunas aves han mostrado malformaciones debidas a sobredosis en compuestos de selenio, que parece estar relacionado con un elevado contenido en seleniato y selenometionina en las plantas de su hábitat [WHO, 1987].

El hombre se ha mostrado menos sensible que los animales a sobredosis de selenio [Einbrodt y Michels, 1984]. Se han registrado varios casos de envenenamiento industrial por selenosis, debidas a la presencia de menos de 0.2 mg/L de seleniuro de hidrógeno en el aire, produciendo síntomas como náuseas, vómitos y fatiga [Olson, 1986]. También, aunque menos frecuentemente, se han registrado casos de envenenamiento crónico en áreas seleníferas, atribuidos a la ingestión de alimentos contaminados con selenio [NAS, 1976; Newland, 1982; Olson, 1986].

La aparición de enfermedades debidas a la deficiencia de selenio se ha observado en regiones donde el suelo es pobre en este elemento, como en ciertas áreas de la República Popular de China. En esta zona el consumo de selenio es extremadamente bajo, alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ y la población sufre de afecciones cardiomiopáticas, particularmente los niños y las mujeres jóvenes [Fishbein, 1991; Frost, 1972].

Concentración

La concentración parece ser el parámetro más importante a considerar para discernir entre el carácter tóxico y esencial del selenio (Figura 4). El selenio es un elemento esencial cuando se ingiere en bajas concentraciones, del orden de partes por billón, pero produce efectos tóxicos cuando se ingiere a niveles sólo de 3 a 5 veces superiores a la dosis requerida para una adecuada nutrición [NAS, 1976; Young, 1981].

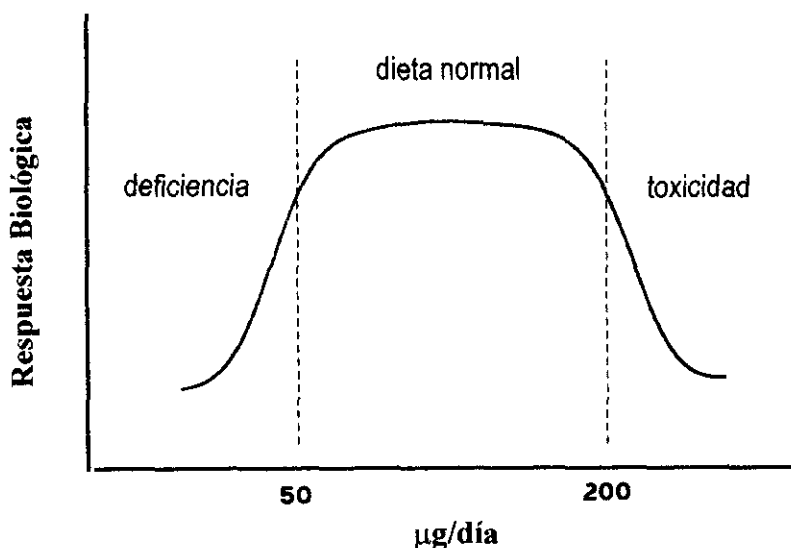


Figura 4. Respuesta biológica en función de la concentración de selenio [Cámara y col., 1995]

Para proporcionar una buena salud, la dieta humana debe contener de 0.01-0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ de selenio [Raptis y col., 1983]. La intoxicación por ingestión de alimentos seleníferos se observa en muy raras ocasiones, aunque se han llegado a detectar casos de

selenosis crónica en áreas seleníferas, donde la ingestión diaria rondaba los 5000 $\mu\text{g}/\text{día}$ [WHO, 1987]. En general, se considera que la ingestión por encima de 1 mg de selenio por kg de peso corporal puede producir toxicidad crónica en humanos [Newland, 1982].

Se estima que la enzima glutadiona peroxidasa debe ser restaurada con un consumo de 45 $\mu\text{g}/\text{día}$ de selenio [Raptis y col., 1983]. En casos de un consumo natural deficiente, se ha optado por el suministro de suplementos a la población, como es el caso de China, donde la administración de 0.5-10 mg/semana de selenito sódico ha resultado beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad de Keshan [Raptis y col., 1983]. En otros países, como Finlandia, el suministro se ha llevado a cabo a través del empleo de fertilizantes enriquecidos en selenio [Aro y col., 1995].

Para evitar efectos nocivos, se ha establecido algunos valores límite para el contenido de selenio según la ruta de administración (aire, agua y alimentos):

El Valor Umbral Límite para compuestos de selenio en aire es de 0.1-0.2 mg/m^3 , salvo para H_2Se que es de 0.5 mg/m^3 . Estos valores están regulados para zonas de exposición industrial, con el fin de proteger al hombre de los efectos irritantes del selenio [Wilber, 1980].

El valor guía dado por la Organización Mundial de la Salud referente al contenido de selenio en agua de bebida es de 0.01 mg/L , aunque este valor es considerado como valor límite admisible en los Estados Unidos [WHO, 1984].

Los alimentos destinados al consumo humano no deben contener más de 5 mg/kg ni menos de 0.04 mg/kg de selenio, mientras que los límites de administración de en animales son ligeramente inferiores a los permitidos en humanos, debido a su menor tolerancia. Bajo condiciones normales, el Valor Límite Umbral en el forraje para alimento de animales es de 3-4 $\mu\text{g}/\text{g}$ de selenio, ya que un contenido de 5 $\mu\text{g}/\text{g}$ puede provocar pérdida de peso e intoxicación crónica si la administración se lleva a cabo durante un largo periodo de tiempo. La administración de 40 $\mu\text{g}/\text{g}$ o más, incrementa significativamente la mortalidad en pollos, mientras que la administración de 1000 $\mu\text{g}/\text{g}$ de plata o cobre en el forraje, previene la mortalidad a estos niveles de selenio. Concentraciones de 6 a 9 $\mu\text{g}/\text{L}$ en aguas de bebida, llegan a producir incluso la muerte en animales [Raptis y col., 1983].

Interacción con el medio

Existe una estrecha relación entre el carácter tóxico o esencial del selenio y el pH del medio en que se encuentra. Un pH neutro facilita la formación de complejos entre los compuestos de selenio y los ligandos orgánicos presentes en el medio natural, influyendo directamente sobre la biodisponibilidad del elemento. Muchas plantas y algas transforman el selenio inorgánico en formas volátiles como metil y dimetil seleniuros, considerándose esto como un mecanismo de detoxificación por parte de las plantas. El incremento en la acidez del suelo reduce su capacidad de biotransformación, dando lugar a vegetales seleníferos [Newlan, 1982; Aro y col., 1995].

El selenio presenta un efecto antagónico sobre la toxicidad proporcionada por otros metales como el mercurio, cadmio, arsénico, plata, plomo, platino y cobre, sin embargo otros metales como cinc y telurio pueden interferir en su absorción y acción metabólica [Fishbein, 1991; Kobayashi, 1992]. De igual manera, la administración de plata o cobre previene la mortalidad a elevados niveles de selenio [Raptis y col., 1983]; también el arsénico inorgánico modifica la toxicidad debida a selenio, se cree que la formación de complejos entre ambos facilita la excreción reduciendo los niveles de selenio en el cuerpo [Frost, 1972].

La composición de los alimentos juega un papel importante. Por ejemplo, el selenio presente en alimentos ricos en proteínas es menos tóxico que en alimentos ricos en carbohidratos. Esto apunta a una asimilación del selenio en proteínas [Raptis y col., 1983].

1.3.2. Función biológica

El hecho que la deficiencia de selenio afecte a varios tipos de tejidos en diferentes vías, sugiere la existencia de compuestos de selenio biológicamente activos.

El selenio está presente en organismos mamíferos formando parte de una gran variedad de proteínas. Las selenoproteínas que han sido caracterizadas y conocidas por

su función incluyen: iodotironina deiodinasa y glutadiona peroxidasa. La actividad enzimática de ambas depende de la presencia de selenocisteína [Behne y col., 1995].

La selenoenzima iodotironina deiodinasa cataliza la desiodonización de la tiroxina a triiodotironina, ésta última, necesaria para el correcto metabolismo de la hormona tiroidea, ha sido detectada también en hígado y riñones. Respecto a la glutadiona peroxidasa, existen cuatro formas conocidas: *celular o clásica* (presente en hígado y en eritrocitos), *plasmática*, *gastrointestinal* e *hidroperóxida fosfolipídica*, ésta última es la más conocida por su función catalítica en la reducción de ciertos peróxidos producidos en el cuerpo [Behne y col., 1995; Thomson, 1998; Behne y col, 1998].

Los datos reflejados en la Tabla 4 indican las fracciones del contenido total de selenio encontradas en diferentes órganos de ratas, así como el porcentaje identificado como glutadiona peroxidasa (GSH-Px) en cada uno de los órganos. Por ejemplo, mientras que la mayor fracción de selenio total se encuentra en los músculos, sólo un 5% de ésta se ha identificado como GSH-Px. Esto parece indicar que existen muchas otras formas de selenio presentes en el organismo, la mayoría de ellos con localización y función biológica desconocida.

Tabla 4. Relación cuantitativa entre la cantidad de selenio encontrada en órganos en ratas y la fracción presente como glutadiona peroxidasa [Janghorbani y col., 1989].

Órgano	% Se total	% Se (GSH-Px)
Músculo	39.8	5.0
Hígado	31.7	63.0
Células Rojas	7.9	82.0
Bazo	1.0	41.0
Otros	19.6	--

Otras selenoproteínas han sido identificadas, sin embargo sus funciones biológicas son aun desconocidas; por ejemplo la selenoproteína P, que puede presentar varias formas, está presente mayoritariamente en el plasma sanguíneo y se cree que

posee una función protectora frente a la presencia de radicales libres o moléculas reactivas en el plasma; la selenoproteína W, encontrada en músculos; la selenoproteína prostática, la cual se cree tiene gran incidencia en el cáncer prostático; la selenoproteína testicular, encontrada sólo en testículos y espermatozoides. Los mecanismos reguladores pueden ser responsables de la incorporación preferente de selenio a ciertas proteínas [Behne y col., 1995; Persson-Moschos y col., 1995; Thomson, 1998].

El aminoácido selenocisteína está presente en la mayoría de las selenoproteínas mencionadas, éste compuesto es similar a la cisteína aunque posee algunas diferencias, sobre todo en cuanto a sus propiedades químicas. Por ejemplo en la SeCys el grupo selenol (-SeH), posee un pKa más bajo (5.2) respecto al del grupo tiol (>8), esto hace que esté presente en forma disociada (aniónica) a pH fisiológico [Shibata y col., 1992].

La selenometionina es otro seleno-aminoácido, similar a su homólogo de azufre la metionina, pudiendo ser incorporada a las proteínas en lugar de ésta última. Se ha detectado en plantas y tejidos animales. Puede ser sintetizado a partir de selenio inorgánico, aunque sólo por las plantas y los animales rumiantes [Dauchy y col., 1994; Behne y col., 1998].

Los mamíferos excretan el selenio adquirido por alimentos a través de la orina (como TMSe^+) o de las heces (como seleniuros metálicos y selenio elemental), y de forma despreciable a través del sudor o la espiración de aire (como DMSe). Se ha comprobado que el exceso de selenio suministrado a ratas de laboratorio, en forma de selenometionina y otros seleno-aminoácidos, se metaboliza a trimetilselenonio y se elimina por la orina [Foster y col., 1986].

En todas las formas mencionadas, el selenio se encuentra en el organismo humano a nivel de trazas. El residuo encontrado de selenocisteína en la mayoría de las selenoproteínas es del orden de un átomo de selenio por molécula de proteína [Behne y col., 1995]. Como datos de interés, se ha recogido en la Tabla 5 las concentraciones de selenio total encontradas en diversos tejidos y fluidos biológicos.

Tabla 5. Concentraciones de selenio total encontradas en tejidos y fluidos biológicos humanos [Fishbein, 1991; Raptis y col., 1984; Caroli y col., 1994].

Tejido	Se ($\mu\text{g/g}$)	Fluido	Se ($\mu\text{g/L}$)
riñón	0.77-1.09	orina	2-160
hígado	0.39-2.06	leche	10-62
corazón	0.38	suero	30-105
músculos	0.36	sangre	80-140
piel	0.27		
pulmón	0.19		
pelo	0.002-0.06		

Biodisponibilidad del selenio

La biodisponibilidad de un elemento depende de varios factores como son: la forma química que presente el elemento, el transporte a través de la circulación sanguínea, su posible absorción a través de las células y la transformación del elemento en una forma bioquímicamente activa. Varios estudios indican que los compuestos de selenio son metabolizados mediante dos vías principales: reducción seguida de metilación o incorporación directa a las proteínas [Glover y col., 1979].

Los aspectos conocidos del metabolismo del selenio en mamíferos se representan en la Figura 5. Probablemente, el selenio accede al sistema biológico a través de muchas de sus formas químicas. Estas especies son liberadas durante el curso de la digestión y absorbidas, aunque el proceso no es del todo conocido. Las especies absorbidas del selenio pueden ser metabolizadas en el hígado y posteriormente transportadas a través del plasma a otros órganos. Una vez dentro de la célula, el selenio puede ser metabolizado a selenocisteína u otros seleno-aminoácidos.

En el ser humano, el selenio se transporta fundamentalmente a través del tracto intestinal, sangre e hígado. Los procesos de transformación y distribución, dependen de la presencia y ausencia de promotores e inhibidores tales como ácido ascórbico,

azúcares, proteínas, fibra y tipo de proceso alimenticio, así como la ingestión de ciertas drogas [Kobayashi, 1992]. El seleniuro (ionizado como HSe^- a pH fisiológico) se considera un compuesto intermedio en la síntesis de selenocisteína en proteínas así como en la síntesis de productos de detoxificación [Sunde, 1984; Hsich y Ganther, 1975].

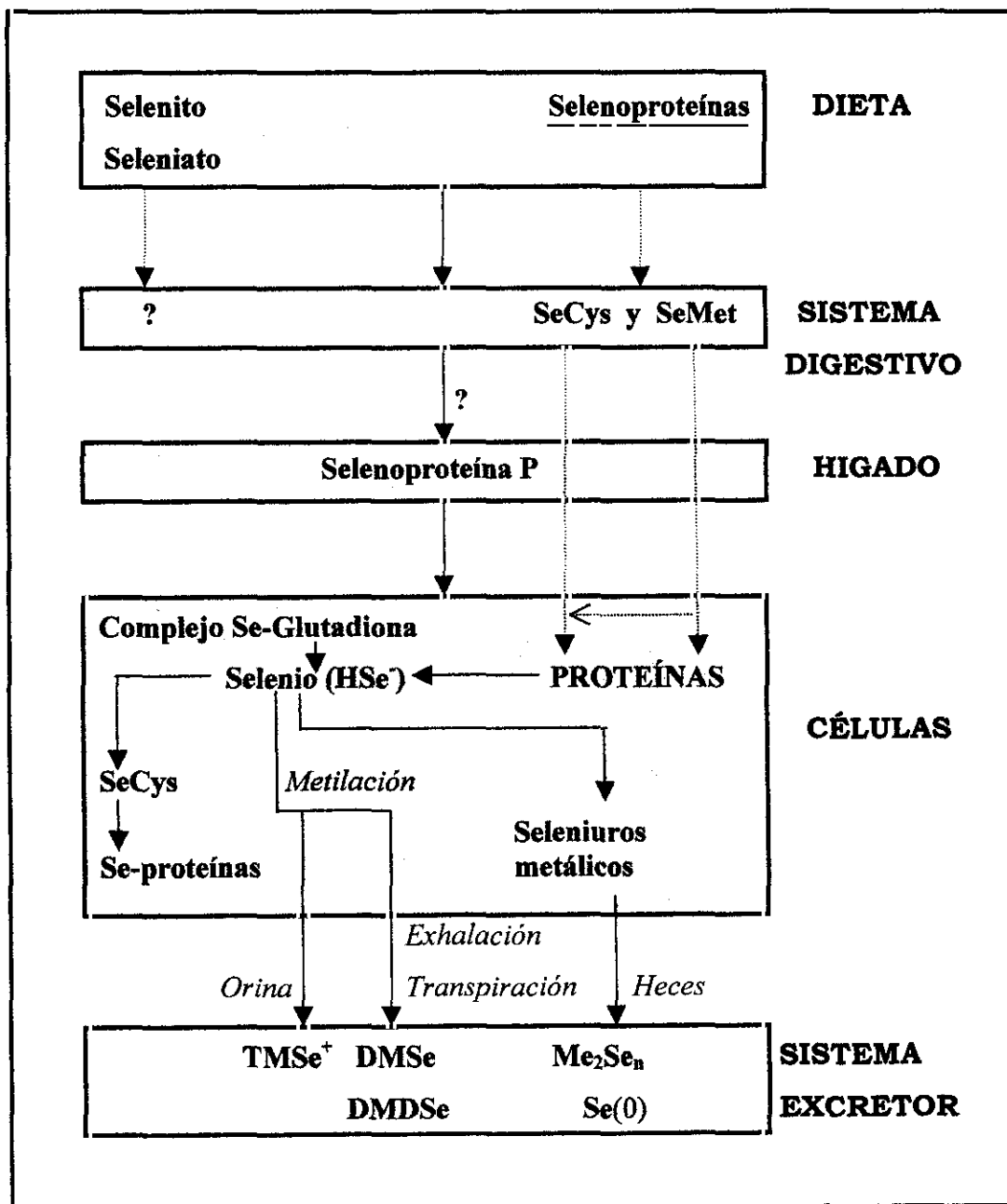


Figura 5. Aspectos conocidos del metabolismo del selenio en mamíferos [Janghorbani y col., 1989].

2. LA TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) fue en un principio empleado como fuente de excitación para la espectrometría de emisión atómica (AES), otorgando a la técnica un gran potencial en el análisis multielemental, muy utilizado para muestras en disolución. Desde la pasada década esta potente fuente de iones se ha acoplado a otros detectores, produciéndose un gran auge en el desarrollo de instrumentos con acoplamiento a detectores de masas [Horlick y col., 1992a]. Los avances en las investigaciones realizadas con la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se han producido de forma muy rápida, desde que comenzaron a comercializarse los primeros instrumentos en 1983. El rápido desarrollo de la técnica se debe a que ofrece importantes ventajas frente a otras técnicas de análisis elemental:

- Los bajos límites de detección que proporciona la técnica, en el intervalo de 1 a 100 ng/L para la mayoría de los elementos de la Tabla Periódica [Horlick y col., 1992a; Jarvis y col., 1992a].
- El carácter multielemental que proporciona información semicuantitativa sobre los componentes mayoritarios, minoritarios y elementos traza.
- La fácil interpretación de los espectros de masas debido a su sencillez, con menos de 211 líneas para todo el espectro de masas.
- La capacidad isotópica de la técnica que permite el cálculo de relaciones isotópicas, tanto naturales como modificadas por dilución isotópica, con precisiones del orden del 0.1% [Esteban, 1993b].
- La gran versatilidad, debido a la amplia gama de sistemas de introducción de muestra disponibles, permitiendo el análisis de muestras en sus tres estados de agregación.

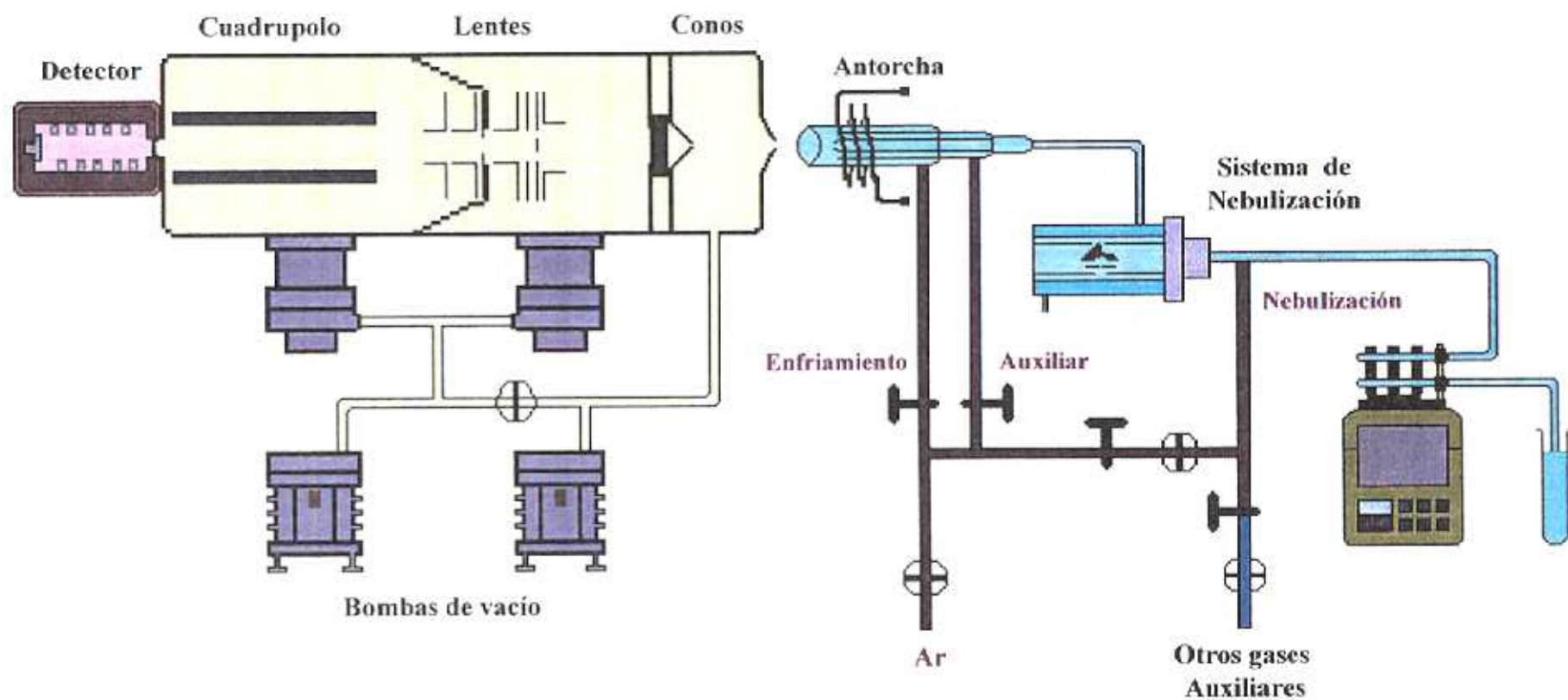


Figura 6. Diagrama esquemático del equipo de ICP-MS modelo VG PlasmaQuad3 [Thermo Instruments].

La técnica de ICP-MS no se encuentra exenta de problemas, sobre todo en lo que respecta a las interferencias espectrales y de matriz, que pueden afectar a la señal del analito.

2.1. INSTRUMENTACIÓN

La Figura 6 muestra el diagrama esquemático de uno de los instrumentos de ICP-MS utilizados en el desarrollo de este trabajo [VG PlasmaQuad3, Thermo Instruments]. En cualquier modelo de ICP-MS, la instrumentación puede dividirse en tres partes generales: el ICP (incluyendo el sistema de introducción de muestra), el espectrómetro de masas y la interfase que une ambas secciones.

A continuación, se realiza una breve exposición de los componentes instrumentales de la técnica, con especial atención a los utilizados para el desarrollo experimental de este trabajo.

2.1.1. El ICP como fuente de iones

El plasma de acoplamiento inductivo se consigue sometiendo a un flujo de un gas, generalmente argón, a la acción de un campo magnético oscilante producido por una bobina de inducción, la cual es alimentada por un generador de radiofrecuencia. La aparición de abundantes iones y electrones acelerados en trayectorias anulares, debido a la alternancia del campo magnético, produce una liberación de energía por efecto Joule, que permite alcanzar temperaturas de hasta 8000 K en las zonas de máxima corriente circular. De este modo, se consigue una geometría toroidal del plasma confinado en el campo magnético, el cual adquiere una apariencia de *llama*, debido a la elevada radiación luminosa que se produce [Esteban, 1993b].

El plasma se confina en la antorcha, la cual consiste en un sistema de tres tubos concéntricos, generalmente de cuarzo, abiertos por un extremo a la presión atmosférica. La antorcha más comúnmente empleada es la de Fassel, con 18, 13 y 1.5 mm de diámetro interno para cada uno de los tres tubos concéntricos respectivamente, la

longitud del tubo exterior es de 130 mm, mientras que los dos tubos situados en el interior poseen una longitud menor (alrededor de 100 mm). A través de cada región anular, formada por los tubos de cuarzo, se hace pasar un caudal de argón con una acción específica. A través del tubo exterior, se transporta el argón en régimen de flujo turbulento destinado a sustentar el plasma. Este flujo de argón tiene además la finalidad de enfriar y por lo tanto proteger a todo el sistema y se denomina *gas de enfriamiento*, siendo necesario el empleo de caudales de gas entre 10 y 15 L/min. La sección anular intermedia, transporta un caudal de argón entre 0 y 1.5 L/min llamado *gas auxiliar*, cuya función es mantener el plasma caliente (entre 8000 y 10000 K). A través del tubo interior se introduce la muestra en el plasma junto con una corriente de gas denominada *gas inyector* o bien *gas de nebulización*, que es del orden de 1 L/min [Horlick y col., 1992a; Jarvis y col., 1992a].

Los electrones son los principales responsables de la formación del plasma, para lo que se les aporta energía mediante la fuente de radiofrecuencia, que opera generalmente a 27 MHz, proporcionando niveles de potencia de 1.0 a 2.0 kW [Jarvis y col., 1992a].

La entrada de la muestra en el plasma debe realizarse en forma de gas, vapor o aerosol, conteniendo gotas o partículas sólidas muy pequeñas, entre 8 y 10 μm de diámetro. El método de introducción de muestra más comúnmente utilizado es la nebulización neumática. El sistema incluye, además del nebulizador, una cámara de expansión o de spray, situada entre el nebulizador y la antorcha, cuya función es la de evitar que las gotas de mayor tamaño producidas en el aerosol lleguen al plasma.

Principalmente se emplean tres tipos de nebulizadores neumáticos en ICP-MS: de flujo concéntrico, de flujo cruzado y de Babington.

El nebulizador de flujo concéntrico o de Meinhard se emplea en la nebulización de disoluciones con bajos contenidos salinos, debido a la posible obturación del capilar central por el que fluye la solución, cuyo diámetro es del orden de 300 μm . Se caracteriza por los bajos caudales de gas de nebulización que requiere frente a otros nebulizadores

neumáticos, entre 0.75 y 1.00 L/min, con el consiguiente aumento del tiempo de residencia del analito en el plasma junto con la menor dilución del aerosol de la muestra, lo que se traduce en una mejor sensibilidad. El sistema es autoalimentable con un caudal de aspiración de la solución de 0.6 mL/min, sin embargo, la entrada de muestra al nebulizador suele realizarse con la ayuda de una bomba peristáltica, la cual permite variar dicho caudal, reducir la entrada de aire al sistema y minimizar los problemas derivados de las diferencias en la viscosidad entre muestras. Frente a las ventajas del nebulizador concéntrico, el resto de nebulizadores neumáticos presentan una mayor tolerancia al contenido salino de las disoluciones, llegando incluso a admitir suspensiones de sólidos en líquidos (slurries) con el modelo Babington.

El tipo de cámara de spray más utilizada en ICP-MS es la de doble paso o de Scott, que consta de una pared cilíndrica para limitar el paso hacia el plasma. El sistema se halla envuelto por una camisa por la que se hace circular una corriente de agua de refrigeración. Si la cámara de spray trabaja a temperaturas por encima de 25 °C, la muestra puede llegar al plasma en forma de vapor, no de aerosol, esto induce a la producción de un mayor nivel de interferencias poliatómicas, formación de óxidos refractarios e iones con doble carga. Se recomienda mantener la temperatura de la cámara refrigerada entre 8-12 °C [Horlick y col., 1992a; Jarvis y col., 1992a].

Los nebulizadores neumáticos producen aerosoles con una gran dispersión en cuanto al tamaño de las gotas, superando incluso las 100 µm. Las gotas de tamaño superior a 10 µm se condensan en la cámara de expansión, proporcionando una eficiencia al proceso del 1 al 2%, siendo la mayor parte de la muestra desechada.

2.1.2. Extracción y óptica de enfoque de los iones producidos en el plasma

La extracción de los iones procedentes del plasma hacia el espectrómetro de masas se realiza a través de la interfase de unión entre ambos sistemas (ICP y MS). La interfase está formada por un sistema de dos conos. El primero, llamado *cono de muestreo*, posee un orificio de 1.0 mm de diámetro. El segundo, llamado *skimmer*, tiene un orificio con un diámetro inferior, 0.7 mm. La región de los conos se encuentra a una

presión de aproximadamente 2 mbar, lo que permite la extracción de los iones producidos en el plasma y constituye una fase intermedia entre la región del ICP, que se encuentra a presión atmosférica, y el alto vacío del espectrómetro de masas. Los dos conos están fabricados con una aleación especial de níquel, y se encuentran sobre un soporte refrigerado por un circuito de agua. La pequeña vaporización del metal procedente de los conos produce un ligero incremento en la señal de fondo a las relaciones m/z correspondientes, y aunque debe ser considerado no suele afectar prácticamente al análisis.

A continuación del sistema de conos se encuentra la zona de extracción y enfoque iónico, constituida por una serie de lentes electrostáticas. El voltaje negativo aplicado sobre el electrodo colector (primera lente tras el skimmer), extrae sólo los iones positivos desde la interfase al sistema de lentes, donde son focalizados hacia el analizador de masas. Las partículas negativas junto con moléculas y átomos neutros, serán extraídas por la bomba rotatoria que opera en la interfase. El conjunto de lentes generalmente incluye una barrera fotónica, colocada en el eje central para evitar de este modo la llegada de fotones al detector.

2.1.3. Analizador de masas

La mayoría de los instrumentos poseen un espectrómetro de masas cuadrupolar, el cual actúa como un filtro de masas, permitiendo el paso de iones con unas determinadas relaciones masa/carga. El cuadrupolo está formado por cuatro barras de molibdeno de sección cilíndrica, de 12 mm de diámetro y 230 mm de longitud, que se encuentran alineadas paralelamente entre sí y equidistantes frente al eje central. La aplicación a cada pareja de barras opuestas, de voltajes de corriente continua y de radiofrecuencia, provoca la conducción de los iones con determinada relación m/z hacia el detector, a través de trayectorias oscilantes estables. Variando convenientemente estos voltajes se puede realizar el enfoque sucesivo de las diferentes masas, obteniendo así el espectro correspondiente con una resolución de 1 u.m.a. Para que el proceso se produzca de forma eficaz debe realizarse en un ambiente de alto vacío, a una presión del orden de 10^{-7} mbar, para lo que se emplea una bomba turbomolecular.

Algunos ICP-MS emplean analizadores de sector magnético debido a que proporcionan una mejor resolución, lo que permite diferenciar la señal del analito de otras procedentes de interferencias espectrales con la misma masa nominal.

Existen varios tipos de detectores empleados en ICP-MS, entre los más utilizados se encuentran: la copa de Faraday, el detector Channeltron y el multiplicador de electrones secundarios de dínodos discretos. Este último ha sido el detector disponible en los instrumentos utilizados para el desarrollo de este trabajo y se ha representado en la Figura 7.

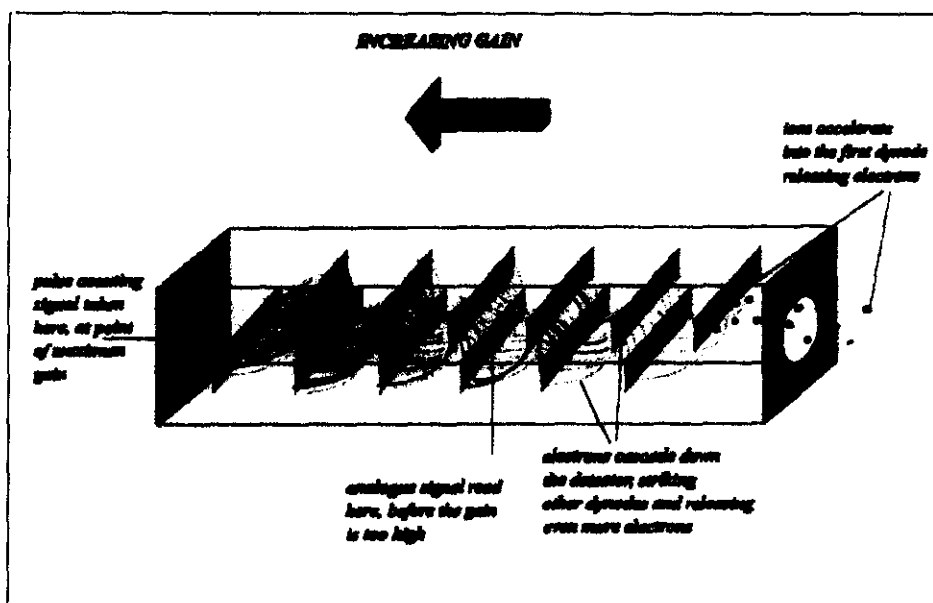


Figura 7. Multiplicador de electrones secundarios de dínodos discretos (Manual VG PlasmaQuad 3).

La base de su funcionamiento es la siguiente: el ion que sale del analizador es acelerado a varios miles de electronvoltios antes de llegar a chocar con el primer dínodo del detector, estas colisiones provocan la emisión de un elevado número de electrones, los cuales inciden sobre el dínodo situado a continuación. El proceso de multiplicación se repite sobre el resto de los dínodos, produciéndose una amplificación de la señal en un factor de entre 10^6 y 10^8 . La nube de electrones resultante puede ser cuantificada a través del conteo de pulsos o bien de forma analógica [Esteban, 1993a].

Si el número de iones que llegan al detector es demasiado elevado, se pueden producir daños en los díodos reduciendo así el tiempo de vida del detector. En el multiplicador de electrones utilizado con el ICP-MS VG PQ3, además del contaje de pulsos, es posible realizar la detección en modo analógico, realizando la medida de la corriente electrónica a medio camino a lo largo de la longitud del detector, reduciendo así la amplificación de la señal.

2.2. INTERFERENCIAS EN ICP-MS

La técnica de ICP-MS no está exenta de interferencias, éstas pueden clasificarse en dos categorías: espectrales y no espectrales.

2.2.1. Interferencias Espectrales

Las interferencias espectrales, son el resultado de la incapacidad del espectrómetro de masas para separar dos iones con relación m/z similar y por ello dependen del poder de resolución del instrumento.

Este tipo de interferencias pueden proceder de iones de otros elementos (interferencias isobáricas), especies poliatómicas, óxidos e hidróxidos de otros elementos y por presencia de iones doblemente cargados, todos con relación m/z próxima al analito. Las interferencias espectrales han sido caracterizadas y documentadas desde los primeros estudios [Jarvis y col., 1992b].

Interferencias Isobáricas

Las interferencias isobáricas aparecen cuando dos elementos tienen un isótopo con la misma masa o cuya diferencia no puede ser discriminada por el cuadrupolo.

Algunos isótopos del selenio se ven afectados por interferencias de este tipo, debido a la presencia de germanio y kriptón. En la Tabla 6 se presentan los isótopos afectados y las interferencias con sus abundancias relativas.

En el caso de la interferencia producida por presencia de germanio, los isótopos de selenio afectados son de muy baja abundancia y por lo tanto de poco interés analítico. La interferencia debida a kriptón afecta sobre todo al isótopo ^{82}Se , uno de los más utilizados en la determinación analítica de este elemento por ICP-MS. El kriptón se encuentra presente como impureza en el gas argón comercial, necesario para el funcionamiento del equipo. Esto proporciona una ligera señal de fondo para los isótopos de selenio mencionados, que aparece en la misma magnitud tanto en patrones como en muestras.

Tabla 6. Interferencias isobáricas debidas a la presencia de iones de Ge y Kr en la determinación de selenio por ICP-MS.

Isótopo/Abundancia(%)	Interferencia/Abundancia(%)
$^{74}\text{Se}/0.87$	$^{74}\text{Ge}/36.56$
$^{76}\text{Se}/9.02$	$^{76}\text{Ge}/7.77$
$^{78}\text{Se}/23.52$	$^{78}\text{Kr}/0.35$
$^{80}\text{Se}/49.82$	$^{80}\text{Kr}/2.27$
$^{82}\text{Se}/9.19$	$^{82}\text{Kr}/11.56$

Las interferencias isobáricas pueden corregirse a través del empleo de fórmulas matemáticas. Así por ejemplo, en el caso del análisis de selenio en muestras que contengan germanio, la señal obtenida a la relación $m/z=76$ sería la suma de las respuestas obtenidas para ambos elementos. La contribución por solapamiento de ^{76}Ge puede cuantificarse a través de la señal obtenida para uno de sus isótopos libre de interferencias (por ejemplo: ^{72}Ge) multiplicada por un factor que corresponde a la relación entre las abundancias naturales de ambos isótopos, como se indica en la ecuación (1).

$$\text{cps } ^{76}\text{Ge} = \text{cps } ^{72}\text{Ge} \frac{\% \text{Abundancia } ^{76}\text{Ge} (7.77)}{\% \text{Abundancia } ^{72}\text{Ge} (27.43)} \quad (\text{ecuación 1})$$

Este tipo de fórmulas pueden incluirse en el software que utiliza el equipo de ICP-MS, de modo que los resultados obtenidos en el análisis sean corregidos por el propio programa.

Especies poliatómicas

Estas interferencias son el resultado de la combinación entre dos o más especies atómicas. Los constituyentes dominantes en la formación de estos iones moleculares son argón, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y carbono, que predominan en el plasma y se combinan entre ellos o con otros elementos presentes en la matriz.

En la Tabla 7 se indican las distintas especies moleculares que interfieren sobre los isótopos de selenio, en función del medio de la disolución. Sobre la tabla se observa que las interferencias debidas a la presencia de un 5% de HNO₃ son las mismas que en medio agua Milli-Q, mientras que el empleo de otros medios ácidos como H₂SO₄, HCl o HBr induce a la formación de iones moleculares adicionales.

Tabla 7. Interferencias espectrales en la determinación de selenio por ICP-MS, debidas a la formación de especies poliatómicas en función del medio [Horlick y col., 1992b].

Isótopo	Interferencias			
	H ₂ O ó 5% HNO ₃	5% HCl	5% H ₂ SO ₄	5% HBr
⁷⁴ Se	³⁶ Ar ³⁸ Ar	³⁷ Cl ³⁷ Cl	⁴⁰ Ar ³⁴ S	
⁷⁶ Se	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar		⁴⁰ Ar ³⁶ S	
⁷⁷ Se	³⁶ Ar ⁴⁰ ArH	⁴⁰ Ar ³⁷ Cl		
⁷⁸ Se	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar			
⁸⁰ Se	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar		³² S ¹⁶ O ₃	
⁸² Se	⁴⁰ Ar ₂ ¹ H ₂		³⁴ S ¹⁶ O ₃	⁸¹ Br ¹ H

La determinación de selenio por ICP-MS se ve considerablemente afectada por la presencia de iones moleculares, especialmente constituidos por argón. La abundancia

relativa de estas especies es difícil de calcular, sin embargo es posible estimar su contribución, a partir de las abundancias relativas de los isótopos implicados en la formación de la molécula. Por otro lado, la formación de dímeros está más favorecida que la formación de especies con tres o más átomos. Por lo tanto, considerando que la abundancia del isótopo ^{40}Ar es del 99.6%, resulta imposible trabajar con el isótopo de mayor abundancia del selenio, el ^{80}Se (49.82%), cuando la ionización se produce en un plasma de argón. Sin embargo, los isótopos 36 y 38 del argón, se presentan tan sólo en un 0.34 y 0.06% respectivamente, por lo que las interferencias de los dímeros correspondientes son considerablemente menores.

Varios trabajos se han dedicado al estudio de interferencias poliatómicas sobre la señal de selenio. Algunos autores proponen la adición de otros gases al argón, como oxígeno o nitrógeno [Lam y col., 1990], metano [Hill y col., 1992a], hidrógeno [Beauchemin y col., 1991] y xenón [Smith y col., 1991], con el fin de reducir la formación de especies poliatómicas de argón. La reducción de la lectura del fondo se atribuye a la formación de otras especies poliatómicas (Ar-N, Ar-O, Ar-H) que no producen interferencia sobre la señal de selenio, dando lugar a una mejora en la sensibilidad para la determinación de este elemento. En algunos casos, se ha postulado que la adición de estos gases (N_2 , CH_4 , H_2) también influye en la ionización del selenio. Otros investigadores reducen estas interferencias por adición de compuestos orgánicos a la muestra, así Llorente y colaboradores en 1997, reducen la formación de la especie $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ por adición de un 4% de glicerol o ácidos láctico, mejorando así la relación señal/ruido para el isótopo ^{77}Se .

Óxidos refractarios

La presencia de óxidos puede proceder de la disociación incompleta de la matriz o bien de la recombinación posterior en el plasma. La mayoría de los analitos y elementos de la matriz forman óxidos en alguna extensión [Horlick y col., 1992b], sin embargo este tipo de interferencia es más importante en el caso de formación de óxidos refractarios, como los procedentes de las tierras raras.

Generalmente, el nivel de formación de óxidos no excede el 1.5% para la mayoría de los elementos [Jarvis y col., 1992b]. Sobre este efecto hay que considerar la influencia de parámetros instrumentales como son: la presión de gas de nebulización, el caudal de entrada de muestra, la potencia de radiofrecuencia aplicada, el espacio entre los conos muestreador y skimmer, el orificio del cono muestreador, la composición de los gases del plasma, el proceso de formación del aerosol y la eficiencia en la eliminación de gas oxígeno y de disolvente [Horlick y col., 1992b; Jarvis y col., 1992b]. En el caso particular de análisis de selenio, éste no se ve interferido por presencia de óxidos refractarios.

Iones doblemente cargados

La formación de especies M^{2+} en el plasma, se produce para elementos con un segundo potencial de ionización bajo, inferior al primer potencial de ionización del argón (15.759 eV). Este es el caso de alcalinotérreos como Ba y Sr, elementos de transición como Sc y Ti y tierras raras [Jarvis y col., 1992b]. El selenio no se ve afectado por este tipo de interferencias.

2.2.2. Interferencias no Espectrales

Las interferencias no espectrales están caracterizadas por el aumento o disminución de la señal de analito debido a factores externos que influyen sobre el transporte de la muestra, la ionización en el plasma y la extracción de iones. La matriz de la muestra tiene una influencia directa sobre la importancia de estos efectos.

La influencia de la matriz sobre el transporte y la ionización de la muestra han sido ampliamente estudiados en ICP-AES. Sin embargo los efectos de reducción o aumento de la señal analítica, causados por la elevada concentración de elementos concomitantes en la matriz, tienden a ser más severos en ICP-MS, probablemente debido a la influencia predominante que tiene la extracción de iones y su focalización en el espectrómetro de masas sobre el transporte de la muestra e ionización del analito en el plasma [Evans y col., 1993].

La investigación realizada acerca de la influencia de los elementos presentes en la matriz sobre la señal analítica en ICP-MS, ha generado resultados dispares y conflictivos. Así los diferentes trabajos publicados en este campo muestran desde aumento hasta reducción de la señal, e incluso ausencia de efecto interferente. Por ejemplo, Gray y Date en 1983, observaron un decrecimiento del 10% de la señal de Bi y Co con nebulización continua, debido a la presencia de 1000 mg/L de sodio en la matriz. Douglas y colaboradores en 1983, comprobaron la ausencia de interferencia por presencia de 1000 mg/L de fosfato o aluminio, en la determinación de calcio. Beauchemin y colaboradores en 1987, observaron aumento en la señal de varios analitos por presencia de Na, K, Cs, Mg y Ca, reducción por presencia de B, Al y V y ningún efecto por presencia de Li.

Algunos estudios establecen que las condiciones instrumentales tienen gran influencia sobre la severidad de estos efectos matriz. Tan y Horlick en 1987, estudiaron los efectos matriz producidos por elementos como Na, Zn, Cs, K, Rh, In, Cd, Sn y Sb sobre la señal analítica de un amplio número de elementos con diferentes relaciones m/z y diferente valor del primer potencial de ionización. Los autores observaron variaciones del efecto interferente en función de la presión de gas de nebulización, encontrando reducción y aumento de la señal analítica para valores bajos y altos respectivamente. En otros estudios similares, se han observado sólo efectos de reducción [Gregoire, 1987]. En general, dentro de los parámetros instrumentales propios de la técnica de ICP-MS, la presión de gas de nebulización y la potencia de radiofrecuencia aplicada parecen tener una marcada influencia sobre el efecto interferente [Gregoire, 1987, Wang y col., 1990].

Se han propuesto varias teorías con el fin de explicar la influencia de los elementos de la matriz sobre la señal analítica en ICP-MS, las más comunes incluyen:

1. Contribución al aumento de la densidad electrónica del plasma por presencia de elementos de fácil ionización.

Según esta teoría, la presencia de elevadas concentraciones de elementos de fácil ionización en la matriz, provoca un gran exceso de electrones e iones positivos en el

plasma. Este hecho produce un desplazamiento del equilibrio de ionización del analito hacia la formación de átomos, reduciéndose su porcentaje de ionización y por lo tanto la señal analítica [Olivares y col., 1986]. Heitkemper y Caruso en 1990, postularon que la continua introducción de elevadas concentraciones de sodio, modificaba la capacidad de ionización del plasma para otros elementos, sin embargo algunos autores desechan esta teoría basándose en que la contribución electrónica de estos elementos concomitantes es despreciable, en comparación con el exceso de electrones procedentes del argón y de la nebulización de moléculas de agua en el plasma.

Algunos estudios realizados sobre la composición del plasma han mostrado que para una temperatura de ionización de 7500 K, donde el grado de ionización del Ar es del 0.1% según la ecuación de Saha [Jarvis y col., 1992a], la población de iones Ar^+ (n_{Ar^+}) es igual a la densidad electrónica (n_e), que en un plasma seco alcanza un valor de 1×10^{15} partículas/cm³. La presencia de vapor de agua en el plasma contribuye de forma significativa a la densidad electrónica (en 3×10^{14} partículas/cm³), pero la presencia de 5000 mg/L de un elemento totalmente ionizado en la matriz contribuye tan sólo en 5×10^{13} partículas/cm³, no afectando considerablemente al equilibrio iónico [Gillson y colaboradores en 1988; Jarvis y col., 1992a]. Sin embargo, Holclajtner-Antunovic y Tripkovic en 1993, estudiaron el efecto de elementos fácilmente ionizables (Li y Ba) y no fácilmente ionizables (Zn) sobre la distribución de temperaturas en el plasma de argón. Los autores concluyen que existe una contribución electrónica, por parte de los elementos concomitantes, en regiones del plasma donde la temperatura es inferior a 7000 K, mientras que en las regiones de temperatura superiores (7000-9000 K), la contribución electrónica es exclusivamente debida a la ionización del Ar y del agua presente en el plasma.

2. Cambios en la eficiencia de nebulización y transporte del analito al plasma debido a una elevada concentración en sólidos disueltos.

En los primeros trabajos desarrollados en ICP-MS ya se estableció su intolerancia a la introducción de cantidades significativas de sólidos disueltos. Olivares y Houk en 1986, proponen que la introducción de disoluciones con elevada

concentración salina produce pérdidas en el transporte del analito al plasma, debido a que las partículas de aerosol tienden a condensar en el sistema de desolvatación.

Diversos factores influyen en la nebulización y transporte de la muestra: La distribución del tamaño de gota que depende del diseño del nebulizador, la presión del gas de nebulización, la viscosidad del gas y la tensión superficial del disolvente. La proporción de gotas que condensan y por lo tanto son desechadas en la cámara de expansión, depende de la densidad y presión de vapor de la disolución [Evans y col., 1993].

Las características de la muestra influyen en la eficiencia de transporte al plasma, pero el nivel de interferencia en ICP-MS es más severo que en ICP-AES, donde el proceso de nebulización y transporte al plasma es el mismo [Lepa y col., 1991]. En ICP-MS la introducción de disoluciones con un contenido en sólidos disueltos totales (TDS) próxima a 2000 mg/L, puede producir la obturación de los orificios de los conos al cabo del tiempo. La reducción en la señal se produce por una modificación en el proceso de extracción de iones, como resultado de la reducción del diámetro del orificio de entrada del haz iónico al espectrómetro de masas [Jarvis y col., 1992b].

3. Efectos espacio-carga en el haz de iones.

Según esta teoría, el origen de la interferencia se debe a la pérdida de iones en el haz iónico. Al focalizar sólo las especies cargadas positivamente se producen repulsiones electrostáticas con un ensanchamiento del haz iónico. Los iones relativamente pesados, los cuales poseen mayor energía translacional, mantienen su trayectoria desplazando a los iones más ligeros hacia las zonas externas del haz, resultando desviados de su trayectoria y en consecuencia no llegando al detector, este tipo de interferencia se conoce como *interferencia dependiente de la masa* [Tan y col., 1987; Gillson y col., 1988; Crain y col., 1988; Chambers y col., 1991a; Chambers y col., 1991b; Ross y col., 1991; Hieftje, 1992; García Alonso y col., 1995]. Se ha postulado que este efecto es particularmente crítico en la región de expansión entre los conos, en especial dentro del "skimmer" donde el haz iónico tiene un limitado espacio

[Gillson y col., 1988; Crain y col., 1988], posteriores estudios reflejan mayores repulsiones electrostáticas en la zona de focalización de iones, debido a un aumento en la proporción de iones positivos del rayo iónico [Chambers y col., 1991b; Hieftje, 1992].

A la vista de los estudios realizados sobre interferencias no espectrales en ICP-MS, Evans y Giglio en 1993, obtienen las siguientes conclusiones:

- ✓ Los elementos matriz más pesados y con bajos potenciales de ionización causan los efectos más severos.
- ✓ Los analitos más ligeros con potenciales de ionización elevados se ven más seriamente afectados por interferencias de matriz.
- ✓ Las condiciones instrumentales tienen una fuerte influencia sobre la magnitud de los efectos.
- ✓ Los efectos matriz dependen de la cantidad absoluta de elemento matriz.

En cuanto a las teorías propuestas, ya que el efecto interferente puede depender de las condiciones instrumentales, es posible que varios mecanismos diferentes sean responsables, y que cada uno de estos mecanismos pueda dominar sólo bajo determinadas condiciones experimentales, lo que podría explicar las discrepancias bibliográficas.

Existen varios métodos para evitar o minimizar los efectos debidos a interferencias no espectrales:

- ❖ El empleo de patrón interno ha mostrado su efectividad para compensar las variaciones de la señal analítica debido a la matriz, sin embargo su elección es difícil, ya que además de los requerimientos habituales como son la necesidad de que no esté presente en las muestras, no sufrir interferencias

espectrales y presentar una abundancia natural elevada, se requiere que el elemento elegido tenga una masa y un primer potencial de ionización similar al del analito [Thompson y col., 1987; Vandecasteele y col., 1993].

- ❖ La calibración a través de métodos de dilución isotópica, obteniendo la concentración de analito en la muestra por comparación entre las señales analíticas obtenidas para la relación isotópica natural y para la muestra enriquecida en un isótopo. El método proporciona una elevada precisión al análisis, ya que la medida de las muestras y patrones se realiza de forma simultánea y bajo la misma matriz, sin embargo requiere la disponibilidad de dos isótopos no afectados por interferencias espectrales [Dams y col., 1995].
- ❖ La realización de procesos de separación (precipitación, extracción con disolventes o en fase sólida), para separar la matriz del analito [McLaren y col., 1993].
- ❖ La técnica de inyección en flujo permite la introducción de muestra con un elevado contenido salino en el ICP-MS, protegiendo la instrumentación y garantizando bajos límites de detección. Algunos trabajos proponen el empleo de la inyección en flujo con el fin de minimizar las interferencias de matriz [Vickers y col., 1989; Wang y col., 1990; Klinkenberg y col., 1994; Smichowski y col., 1995].

2.3. ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA A LA ESPECTROMETRÍA DE PLASMA-MASAS

La técnica de ICP-MS es muy adecuada para ser utilizada como detector en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que existe una buena compatibilidad entre los caudales de muestra empleados en ambas técnicas (del orden de 1 mL/min). La conexión entre la salida de la columna y el sistema de introducción de muestra en el ICP, generalmente nebulización neumática convencional, es sencilla y se realiza a través de un tubo de PTFE u otro material plástico inerte. La longitud y el diámetro

interno de la línea de transferencia deben ser mínimos, empleándose una longitud entre 20 y 50 cm generalmente, para asegurar que el ensanchamiento de los picos cromatográficos sea mínimo [Hill y col., 1993; Sutton y col., 1997].

En el acoplamiento de ambas técnicas, la mayor limitación surge de la composición de la fase móvil. La utilización de grandes porcentajes de disolventes orgánicos provoca un menor aprovechamiento de la energía de radiofrecuencia, produciéndose una elevada potencia de rf reflejada que induce a la inestabilidad del plasma, además de producir depósitos carbonosos en los conos que pueden originar la obturación de los mismos. Para minimizar estos problemas, algunos autores adicionan oxígeno al gas de nebulización evitando así la obturación de los conos, aunque esto no reduce suficientemente la elevada potencia de rf reflejada que puede sobrepasar los 100 W [Heitkemper y col., 1989; Suyani y col., 1989]. Para solventar este problema, se puede reducir la cantidad de disolvente orgánico que llega al plasma, a través de mecanismos de desolvatación del aerosol, bien por reducción de la temperatura de la cámara de spray [Heitkemper y col., 1989; Sheppard y col., 1990], o bien mediante el empleo de sistemas de desolvatación que permiten la eliminación de entre el 80 y el 89% del disolvente orgánico [Hill y col., 1992b; Tsakahara y col., 1990; Weir y col., 1990; Cairns y col., 1996]. Si se utiliza una fase móvil acuosa o con muy bajas proporciones de disolvente orgánico, esta limitación no existe, siendo únicamente necesario el control del contenido salino de la fase móvil, para evitar la obturación de los conos.

3. BIBLIOGRAFÍA

Alexander, J.; Högberg, J.; Thomassen, Y.; Aaseth, J. (1988)

Seiler, H.G.; Sigel, H.; and Sigel, A. (eds.), *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, pp. 581-595. Marcel Dekker, New York-Basel.

Aro, A.; Alfthan, G.; Varo, P. (1995)

Analyst, Vol. 120, 841.

Beauchemin, D.; McLaren, J.W.; Berman, S.S. (1987)

Spectrochim. Acta, 42B, 467.

Beauchemin, D.; Craig, J.M. (1991)

Spectrochim. Acta, 46B, 603.

Behne, D.; Hammel, C.; Pfeifer, H.; Röthlein, D.; Gessner, H.; Kyriakopoulos, A. (1998)

Analyst, Vol. 123, 871.

Behne, D.; Weiss-Nowak, C.; Kalcklösch, M.; Westphal, C.; Gessner, H.; Kyriakopoulos, A. (1995)

Analyst, Vol. 120, 823.

Bennett, B.G. (1983)

Sci. Total Environ., 31, 117.

Bruland, K.W. (1983)

Chem. Oceanogr., 8, 188.

Burriel Marti, F.; Lucena Conde, F.; Arribas Jimeno, S.; Hernández Méndez, J. (1983)

Paraninfo S.A. (ed.), *Química Analítica Cualitativa*, pp. 567-570. Madrid.

Cairns, W.R.L.; Ebdon, L.; Hill, S.J. (1996)

Fresenius J. Anal. Chem., 355, 202.

Cámara, C.; Cobo, M.G.; Palacios, M.A.; Muñoz, R.; Donard, O.F.X. (1995)

Quevauviller/Maier/Griepink (eds.), *Quality Assurance for Environmental Analysis*, pp. 235-262. Elsevier Science B.V.

Caroli, S.; Alimonti, A.; Coni, E.; Petrucci, F.; Senofonte, O.; Violante, N. (1994)

Critical Reviews in Analytical Chemistry, 24(5 & 6), 363.

Chambers, D.M.; Pohlman, J.; Yang, P.; Hieftje, G.M. (1991a)

Spectrochim. Acta, 46B, 741.

Chambers, D.M.; Hieftje, G.M. (1991b)

Spectrochim. Acta, 46B, 761.

Crain, J.S.; Houk, R.S.; Smith, F.G. (1988)

Spectrochim. Acta, 43B, 1355.

Cutter, G.A. (1985)

Anal. Chem., 57, 2951.

Dams, R.F.J.; Goossens, J.; Moens, L. (1995)

Mikrochim. Acta, 119, 227.

Dauchy, X.; Potin-Gautier, M.; Astruc, A.; Astruc, M. (1994)

Fresenius J. Anal. Chem., 348, 792.

Dietrich, B.; Christian, W-N.; Kalcklösch, M.; Westphal, C.; Gessner, H.; Kyriakopoulos, A. (1995)

Analyst, Vol. 120, 823.

Douglas, D.J.; Quan, E.S.K.; Smith, R.G. (1983)

Spectrochim. Acta, 38B, 39.

Ebdon, L.; Evans, E.H.; Barnett, N.W. (1989)

J. Anal. At. Spectrom., 4, 505.

Einbrodt, H.J.; Michels, S. (1984)

Merian, E. (ed.), *Metalle in der Umwelt*, pp. 541-554. Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach/Florida-Basel.

Esteban, L. (1993a yb)

ACK (eds.), *La Espectrometría de Masas en imágenes*, (a) 39-40; (b) pp. 193-206.

Evans, E.H.; Giglio, J.J. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 1.

Fishbein, L. (1983)

Fund. Appl. Toxicol. 3, 411.

Fishbein, L. (1991)

Merian E. (ed.), *Metals and their compounds in the Environment*, pp 1153-1179. UHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Foster, S.J.; Kraus, R.J.; Ganther, H.E. (1986)

Arch. Biochem. Biophys., 251,77.

Frost, D.V. (1972)

Critical reviews in toxicology, 467.

Garcia Alonso, J.I.; Sena, F.; Arbore, Ph.; Betti, M.; Koch, L. (1995)

J. Anal. At. spectrom., 10, 381.

Gillson, G.R.; Douglas, D.J.; Fulford, J.E.; Halligan, K.W.; Tanner, S.D. (1988)

Anal. Chem., 60, 1472.

Glover, J.; Levander, O.; Parizek, J.; Vouk, V. (1979)

Fridberg, L.; Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. (eds.), *Handbook on Toxicology of Metals*, pp. 555-577. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.

Goessler, W.; Kuehnelt, D.; Schlagenhafen, C.; Kalcher, K.; Abegaz, M.; Irgolic, K.J. (1997)

J. Chromatogr., 789A, 233.

Gray, A.L.; Date, A.R. (1983)

Analyst, 108,1033.

Gregoire, D.C. (1987)

Appl. Spectrosc., 41, No 5, 897.

Gutiérrez Ríos, E. (1984)

Reverté (ed), *Química Inorgánica*, pp. 205-207. Barcelona.

Heitkemper, D.T.; Creed, J.; Caruso, J.A.; Fricke, F.L. (1989)

J. Anal. At. Spectrom., 4, 279.

Heitkemper, D.T.; Caruso, J.A. (1990)

Appl. Spectrosc., 44, 228.

Hieftje, G.M. (1992)

Spectrochim. Acta, 47B, 3.

Hill, S.J.; Ford, M.J.; Ebdon, L. (1992a)

J. Anal. At. Spectrom., 7, 1157.

Hill, S.J.; Hartley, J.; Ebdon, L. (1992b)

J. Anal. At. Spectrom., 7, 23.

Hill, S.J.; Bloxham, M.J.; Worsfold, P.J. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 499.

Högberg, J.; Alexander, J. (1986)

Fridberg, L.; Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. (eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd Ed., Vol II, pp. 482-520. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Holclajtner-Antunovic, I.D.; Tripkovic, M.R. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 359.

Horlick, G; Shao, Y. (1992a y b)

Montaser y Golightly (eds.), *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, (a) pp.551-570; (b) 571-581, New York.

Hsich, H.S.; Ganther, H.E. (1975)

Biochemistry, 14, 1632.

Janghorbani, M.; Ting, B.T.G.; Lynch, N.E. (1989)

Mikrochim. Acta, 111, 315.

Jarvis, K.E.; Gray, A.L.; Houk, R.S. (1992a y b)

Chapman y Hall (eds.), *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, (a) pp. 10-54; (b) pp. 125-152, New York.

Klinkenberg, H.; Beeren, T.; Vam Borm, W. (1994)

Spectrochim. Acta, 49B, 171.

Knight, A.W.; Maier, K.J.; Foe, C.; Ogle, R.S.; Williams, M.J.; Kiffney, P.; Melton, L.A. (1987)

Trace Subst. Environ. Health 21, 361.

Kobayashi, I. (1992)

Adv. Biophys., 28, 81.

Lam, J.W.; Horlick, G. (1990)

Spectrochim. Acta, 45B, 1313.

Lepa, K.; Vaughan, M.A.; Horlick, G. (1991)

Spectrochim. Acta, 46B, 967.

Llorente, I; Gómez, M.; Cámara, C. (1997)

Spectrochim. Acta, 52B, 1825.

McLaren, J.M.; Lam, J.W.H.; Berman, S.S.; Akatsuka, K.; Azeredo, M.A. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 279.

Merian, E. (1985)

Merian, E.; Frei, R.W.; Härdi W. and Schlatter, C. (eds.), *Carcinogenic and Mutagenic Compounds*. pp. 25-32. Gordon & Breach, London.

Milner, J.A. (1985)

Fed. Prod. 44, 2568.

Morrison, G.M.P.; Batley, G.E.; Florence, T.M. (1989)

Chemistry in Britain, August, 791.

NAS (1976)

Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants - Selenium. National Academy of Sciences, Washington, D.C.

Nazarenko, I.I.; Ermakov, A. N. (1972)

Analytical Chemistry of Selenium and Tellurium. Halsted Press, New York.

Newland, L.W. (1982)

Hutzinger, O. (ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 3, Part B, pp. 45-57. Springer Verlag, Heidelberg.

Olivares, J.A.; Houk, R.S. (1986)

Anal. Chem., 58, 20.

Olson, O.E. (1986)

J. Am. Coll. Toxicol 5, 45.

Persson-Moschos, M.; Huang, W.; Srikumar, T.S.; Åkesson, B.; Lindeberg, S. (1995)

Analyst, Vol 120, 833.

Peterson, P.J.; Girling, C.A.; Benson, L.M.; Zieve, R. (1981)

Lepp, N. W. (ed.), *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants*, Vol I, pp. 213. Applied Science Publishers, London.

Raptis, S.E.; Kaiser, G.; Tölg, G. (1983)

Fresenius Z. Anal. Chem., 316, 105.

Rivail da Silva, M.; Muñoz Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Lamotte, M. (1997)

Appl. Organ. Chem., Vol.11, 21.

Robberecht, H.; Van Grieken, R. (1980)

Hemphill, D.D. (ed.), *Trace Substances in Environmental Health*, Vol.14, University of Missouri, Columbia.

Ross, B.S.; Chambers, D.M.; Hieftje, G.M. (1991)

Microchim. Acta, 3, 287.

Sheppard, B.; Shen, W-L.; Caruso, J.A.; Heitkemper, D.T.; Fricke, F.E. (1990)

J. Anal. At. Spectrom., 5, 431.

Shibata, Y.; Motira, M.; Fuwa, K. (1992)

Adv. Biophys., Vol. 28, 31.

Smichowski, P.; Madrid, Y.; Cámara, C. (1995)

Quim. Anal., 14, 210.

Smith, F.G.; Wiederin, D.R.; Houk, R.S. (1991)

Anal. Chem., 63, 1458.

Sunde, R.A. (1984)

J. Am. Oil Chem. Soc., 61, 1891.

Sutton, K.; Sutton, R.M.C.; Caruso, J.A. (1997)

J. Chromatogr., 789A, 85.

Suyani, H.; Creed, J.; Davidson, T.; Caruso, J. (1989)

J. Chromatogr. Sci., 27, 139.

Tan, S.H.; Horlick, G. (1987)

J. Anal. At. Spectrom., 2, 745.

Thomson, D.C. (1998)

Analyst, Vol. 123, 827.

Thompson, J.J.; Houk, R.S. (1987)

Appl. Spectrosc., 41, No 5, 801.

Tsakahara, R.; Kubota, M. (1990)

Spectrochim. Acta, 45B, 581.

Vandecasteele, C.; Vanhoe, H.; Dams, R. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 781.

Vickers, G.H.; Ross, B.S.; Hieftje, G.M. (1989)

Appl. Spectrosc., 43, No 8, 1330.

Vernie, L.N. (1984)

Biochim. Biophys. Acta, 738, 203.

Wang, J.; Shen W-L.; Sheppard, B.S.; Evans, H.; Caruso, J.A.; Fricke, F.L. (1990)

J. Anal. At. Spectrom., 5, 445.

Weir, D.G.J.; Bladesm M.W. (1990)

Spectrochim. Acta, 45B, 615.

WHO (World Health Organization) (1984)

Guidelines for Drinking-Water Quality. Vol. 1, pp. 57-58. World Health Organization, Geneva.

WHO (World Health Organization) (1987)

Environmental Health Criteria 58, IPCS International Program on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.

Wiederin, D.R.; Houk, R.S.; Winge, R.K.; D'Silva, A.P. (1990)

Anal. Chem., 62, 1155.

Wilber, Ch.G. (1980)

Chem. Toxicol., 17, 171

Young, V.R. (1981)

N. Eng. J. Med. 304, 1228.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO

Puesto que el selenio está presente en el medioambiente y en materiales biológicos a niveles traza, su determinación requiere técnicas analíticas de elevada sensibilidad. No menos importante es el control de etapas previas al análisis, como son: recogida, pretratamiento y almacenamiento de la muestra, con el fin de evitar errores en el análisis por pérdidas o contaminación.

El análisis del contenido total de selenio en muestras biológicas y ambientales implica la completa destrucción de los constituyentes orgánicos de la muestra, a través de procesos de oxidación, lo que a su vez produce la transformación de las especies de selenio a su estado de oxidación más alto (+6). Las técnicas analíticas más empleadas en la determinación de selenio son: espectroscopía de absorción atómica, fluorimetría, activación neutrónica, espectrometría de emisión atómica, fluorescencia atómica, cromatografía de gases, espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (más recientemente) y en menos extensión fluorescencia de rayos-X y polarografía [Raptis y col., 1983; Fishbein, 1991].

En los últimos años, el interés en la determinación de selenio está siendo enfocado a la identificación y cuantificación de sus especies químicas, tanto para poder estimar su toxicidad como para poder explicar procesos biológicos. De este modo el análisis se complica ampliamente, debiendo tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Elección de procesos de tratamiento de muestra no destructivos, que permitan la conservación de la forma química original presente en la muestra.
- Necesidad de disponer de sustancias patrón de estas especies.
- Empleo de métodos de separación.
- Necesidad de técnicas de alta sensibilidad, puesto que si el elemento se encuentra a niveles traza, sus especies estarán presentes en una fracción de esta concentración.

1. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO

Varios factores pueden conducir a pérdidas, contaminación o transformación de especies durante las etapas de toma de muestra y almacenamiento. Las fuentes de error en la etapa de muestreo pueden ser importantes, debido a las bajas concentraciones presentes en el medioambiente: de ng/g a µg/g en sedimentos y de ng/L a µg/L en aguas. Por otro lado, durante el almacenamiento de la muestra se pueden producir procesos de adsorción, desorción y volatilización, de modo que se altere la concentración y la forma original del analito.

La toma de muestra para la determinación de alquilseleniuros se ve afectada por la volatilidad de estos compuestos y por los bajos niveles de concentración en que se encuentran. Las muestras de aire se extraen normalmente mediante una bomba de vacío, regulando los caudales con la ayuda de un rotámetro [Dauchy y col., 1994; Muñoz Olivas y col., 1994]. Los procesos de muestreo más empleados están basados en el atrapamiento criogénico (TC), de modo que además de evitar pérdidas por volatilización, pueden emplearse como etapa de preconcentración. El atrapamiento de muestras gaseosas puede realizarse en disolventes orgánicos (hexano, pentano), sobre sólidos adsorbentes (carbón activado, lana de vidrio) [Jiang y col., 1987; Oyamada y col., 1987] o bien empleando fases estacionarias de cromatografía de gases (OV-1 ó PMPE sobre Chromosorb W) [Jiang y col., 1982; Cooke y col., 1987; Jiang y col., 1987]. Posteriormente, las especies de selenio son desorbidas térmicamente [Cooke y col., 1987] o extraídas del sólido adsorbente con disolventes orgánicos [Oyamada y col., 1987]. El proceso de desorción es muy crítico, debido a que los alquilseleniuros reaccionan, transformándose en diseleniuros en presencia de humedad. Para evitar la transformación de especies se debe realizar el proceso de desorción a temperaturas inferiores a 100 °C o bien incorporar una trampa de agua, que contenga una sustancia desecante como cloruro cálcico [Jiang y col., 1982].

El almacenamiento adecuado de alquilseleniuros se puede realizar por congelación con nitrógeno líquido, sin embargo se recomienda su análisis inmediato [Cutter, 1978].

En ambientes acuosos, es necesario considerar varios factores: proporción de selenio disuelto y particulado, forma química de especies orgánicas e inorgánicas, posibilidad de formación de complejos y capacidad de adsorción sobre partículas coloidales.

Las pérdidas de analito debidas a procesos de volatilización pueden resolverse mediante el almacenamiento de la muestra a temperatura baja (-18 a 4 °C). La presencia de partículas en suspensión puede inducir cambios en la composición, tanto por procesos de adsorción como por actividad microbiológica, siendo necesaria la filtración de la muestra. Los problemas debidos a procesos de adsorción sobre el recipiente empleado en el almacenamiento de la muestra, dependen de factores como pH, fuerza iónica, material del contenedor y concentración del analito [Muñoz Olivas y col., 1994; Cobo y col., 1994].

La acidificación de la muestra resulta adecuada en la estabilización del contenido total de selenio [Cutter, 1978], sin embargo, puede inducir la transformación de especies orgánicas, si bien generalmente las inorgánicas se estabilizan en este medio.

La Agencia de Protección de Medioambiente de los Estados Unidos (1976) recomienda la acidificación de las muestras con HNO₃ a pH<2, con el fin de preservar la estabilidad del Se^{VI} presente en las aguas naturales. Cheam y Agemian en 1980, comprueban la estabilidad de selenito y seleniato (1 y 10 µg/L) durante 125 días, en muestras de agua acidificadas con H₂SO₄ a pH=1.5. Robberecht y van Grieken (1980) recomiendan el empleo de un medio HCl 4N tanto en polietileno como en vidrio pyrex, aunque otros trabajos muestran un 60% de transformación de Se^{VI} en Se^{IV} en estas condiciones y tras sólo 7 días de almacenamiento. La adición de ácidos induce la transformación de especies orgánicas no volátiles, por ejemplo, se ha observado descomposición de SeMet en medio HCl con transformación en DMDS_{Se} [D'Ulivo y col., 1993].

Cobo y colaboradores en 1994, comprobaron que la presencia de elevadas concentraciones de Cl⁻ (2 g/L, añadidos como NaCl) permite la estabilidad de Se^{VI} y

Se^{IV} a niveles de concentración entre 10 y 50 µg/L durante al menos 9 meses, en recipientes de polietileno mantenidos a 20 °C y sin necesidad de acidificar las muestras.

Existen pocos estudios sobre la estabilidad de especies orgánicas no volátiles de selenio. Muñoz Olivas y colaboradores en 1998, comprobaron la estabilidad de disoluciones acuosas de TMS⁺, SeCys₂ y SeMet (25 y 150 µg/L) durante 3 meses, en contenedores de vidrio pyrex mantenidos a 4 y 20 °C. Otros autores han reflejado la ausencia de pérdidas de selenourea, a nivel de 100 µg/L, almacenadas en recipientes de PTFE a 4 °C y a temperatura ambiente [Campanella y col., 1989]. Sin embargo no se conoce la estabilidad de estas especies en matrices biológicas.

Para el almacenamiento de muestras sólidas, se recomienda el empleo de recipientes de polietileno y temperaturas de 4 °C, con el fin de evitar la actividad microbiológica [Muñoz Olivas y col., 1994]. La muestra debe ser homogeneizada y a veces desecada. En el proceso de secado se recomiendan temperaturas bajas, del orden de 40 °C, para no provocar pérdidas de especies volátiles [Cutter, 1985].

2. TRATAMIENTO DE MUESTRA

En el proceso de tratamiento de muestra, se deben evitar posibles errores por pérdidas de analito en la manipulación, así como por contaminación procedente de los reactivos y materiales empleados.

2.1. MINERALIZACIÓN

La mineralización es el tratamiento de muestra empleado para la determinación de selenio total. Durante este proceso las especies orgánicas de selenio se transforman en especies inorgánicas. Se emplean las digestiones ácidas, la foto-oxidación y en menor proporción la combustión [Batley, 1986; Campanella y col., 1989].

Digestión con ácidos

Mediante el proceso de digestión se pueden producir pérdidas por volatilización de selenio, por lo que puede ser adecuado el empleo de reactores a presión o de condensadores a reflujo.

Algunos compuestos orgánicos de selenio, presentes en muestras biológicas, son muy resistentes al ataque ácido. Especies como SeMet, SeCys₂ y TMSe⁺, requieren del empleo de condiciones fuertemente oxidantes, a través de mezclas HNO₃-H₂SO₄-HClO₄ y temperaturas elevadas (310 °C) [Welz y col., 1984a]. Chris y Sadana en 1992, encuentran adecuada esta mezcla en su aplicación a materiales certificados de sedimentos, hojas de árboles, hígado, langosta y aguas, empleando temperaturas de 200 °C y tiempos de 12 horas. En la mineralización de sedimentos y suelos, generalmente se emplea HF para eliminar la sílice, sin embargo pueden producirse pérdidas de selenio por formación de SeF₄ y SeF₆, por lo que no resulta adecuado [Fishbein, 1991].

En los últimos años ha adquirido importancia el empleo de microondas como sistema de calentamiento, de este modo, se ven reducidos los tiempos y la cantidad de reactivos necesarios para la digestión. En su aplicación al análisis de selenio en muestras biológicas, se utiliza sólo HNO₃ [LamLeung y col., 1991; Wu y col., 1997] o bien mezclas como HNO₃-H₂SO₄-H₂O₂ [Yamada y col., 1990] o HNO₃-H₂O₂ [Friel y col., 1990; Ducros y col., 1994; Wu y col., 1997].

Ducros y colaboradores en 1994, realizan un estudio comparativo entre el empleo de microondas con HNO₃-H₂O₂ y la digestión convencional con HNO₃-HClO₄. Los resultados obtenidos, con ambos métodos de digestión, fueron comparables para todos los materiales de referencia biológicos analizados. Las ventajas del primer método de digestión son: reducción del tiempo de digestión de 12 horas a 45 minutos, y posibilidad de reemplazar el HClO₄ por otros oxidantes menos peligrosos como el H₂O₂.

Generalmente, la mineralización con ácidos conduce a la transformación de especies en Se^{VI} . La mezcla $\text{Br}_2\text{-HBr}$ se ha mostrado efectiva en la digestión de compuestos orgánicos de selenio en muestras acuosas y biológicas. El proceso de oxidación da lugar a la formación de la especie Se^{IV} , muy útil cuando se emplean técnicas de determinación específicas para esta especie [D'Ulivo y col., 1993; 1994].

Foto-oxidación

Se emplea como método alternativo para la transformación de especies orgánicas a Se^{IV} . La oxidación se produce por irradiación ultravioleta utilizando una lámpara de mercurio a 1250 W, el proceso debe realizarse durante 5 horas en presencia de peróxido de hidrógeno y borax [Measures y col., 1980]. Para algunas especies, los procesos de fotodegradación ultravioleta se han mostrado más efectivos que la digestión ácida, como por ejemplo en la mineralización de selenourea [Campanella y col., 1987; 1989].

Combustión

La combustión de la muestra se realiza en atmósfera de oxígeno puro, en estas condiciones el selenio es volatilizado como SeO_2 y condensado en una trampa fría. Posteriormente, el óxido se disuelve completamente en HNO_3 o HCl . El proceso se ha aplicado a muestras biológicas, rocas y suelos [Han y col., 1981].

2.2. DERIVATIZACIÓN

La derivatización suele ser una etapa imprescindible, en el análisis de selenio bajo determinadas técnicas analíticas, éste es caso de la fluorescencia molecular y el análisis de especies no volátiles por cromatografía de gases. También se emplea como método de eliminación de interferencias y mejora de los límites de detección. Sin embargo, estos procesos requieren de la destrucción de la forma química original, para dar lugar a la/s especie/s susceptibles de derivatización.

Generación de hidruros (HG)

La generación de hidruros es el método de derivatización más empleado en la especiación de selenio, tanto en muestras biológicas como medioambientales [Cutter, 1982; Cutter, 1985; Fio y col., 1990]. El seleniuro de hidrógeno formado es volátil, pudiendo ser separado de la matriz y transportado en forma de gas al sistema de detección.

La reacción, que transcurre en medio ácido y en presencia de un reductor fuerte, es selectiva para la especie Se^{IV} . El ácido más empleado es el HCl y el agente reductor el borohidruro sódico (NaBH_4), el cual debe estabilizarse en medio alcalino (por adición de NaOH) y almacenarse a temperaturas bajas ($4\text{ }^\circ\text{C}$) [Welz y col., 1984b; Agterdenbos y col., 1985].

El método de generación de hidruros no está exento de interferencias, en general procedentes de:

- ✓ la presencia de otros elementos formadores de hidruros como Sb, Te, As, etc, que pueden consumir los reactivos necesarios para la generación del hidruro de selenio
- ✓ la descomposición o adsorción del H_2Se formado
- ✓ la presencia de elementos de transición como Co, Cu, Ni, Pt, Pd, Ag, etc, que inhiben la reacción de formación del H_2Se , ya que el selenio forma con estos elementos compuestos estables.

Las interferencias procedentes de metales de transición como Cu, Ni Co y Fe, pueden verse considerablemente reducidas por formación de complejos clorados, a través de un aumento en la concentración de HCl empleada en la generación del hidruro [Hershey y col., 1986]. Otra posibilidad, consiste en la adición de reactivos complejantes como cianuro, ácido cítrico, tiourea, EDTA [Bye y col., 1983; He y col., 1998]. Wickstrom y colaboradores en 1995, utilizan la mezcla ácido dietilendiaminopentaacético (DTPA) y tartrato, como agentes enmascarantes para la

determinación de selenio por HG-AAS, en presencia de elevadas concentraciones de Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} y Cr^{3+} (5-8 g/L).

La adición de yoduro potásico cataliza la reacción de generación del hidruro de selenio facilitando la reducción de Se^{IV} a $\text{Se}(-\text{II})$ [Agterdenbos y col., 1986].

La presencia de compuestos orgánicos también inhibe la generación del H_2Se . Algunos autores proponen la separación del selenio de la matriz orgánica con columnas XAD-8 a pH 1.6-1.8 [Roden y col., 1982], sin embargo este método sólo puede ser aplicado a la *determinación posterior de selenio inorgánico*.

El H_2Se puede ser preconcentrado a través del empleo de trampas criogénicas, mejorando consecuentemente los límites de detección. La condensación del hidruro, se realiza en columnas de vidrio xilanizado sumergidas en nitrógeno líquido o propanol helado. Posteriormente, el hidruro se volatiliza por calentamiento de la trampa, y se transporta, con la ayuda de una corriente de gas, hacia el sistema de detección [Cutter, 1978; Blais y col., 1991].

Etilación

La formación del derivado etilado mediante la reacción del selenio con tetraetilborato sódico (NaBEt_4) es de interés, debido al menor número de interferencias que presenta respecto a la generación del hidruro. El principal inconveniente se debe a la imposibilidad de diferenciar entre especies inorgánicas de selenio, ya que ambas producen la misma forma dietilada (DESe). El método no se ha aplicado a especies orgánicas de selenio, por lo que requiere posteriores investigaciones [Muñoz Olivas y col., 1994; Pyrzynska, 1996].

Complejación

El Se^{IV} reacciona con *o*-diaminas aromáticas para formar los correspondientes selenodiazoles (piazoselenoles). La formación de estos complejos supone una etapa

previa imprescindible en la determinación de selenio por fluorimetría o por cromatografía de gases [D'Ulivo, 1997].

Los reactivos más empleados en la formación de complejos fluorescentes son el 2,3-diaminonaftaleno (DAN) y sus derivados halogenados, como 2,3-diamino-1,4-dicloronaftaleno (Cl₂-DAN) y 2,3-diamino-1,4-dibromonaftaleno (Br₂-DAN), dando lugar al correspondiente 4,5-benzopiazoselenol, extraíble en disolventes orgánicos [Muñoz Olivas y col., 1994; Pyrzyńska, 1996; D'Ulivo, 1997]. La presencia de Fe^{III} interfiere por reacción con DAN, reduciendo la formación del piazoselenol [D'Ulivo, 1997].

Otros complejantes, como 4-nitro-*o*-fenilendiamina ó 3-bromo-5-trifluorometil-1,2-diaminobenceno, reaccionan selectivamente con Se^{IV} dando lugar a 5-piazoselenol [Olsen y col., 1985] y 4-bromo-6-trifluorometilpiazoselenol [Al-Attar y col., 1990] respectivamente. Ambos complejos son volátiles y extraíbles en tolueno, permitiendo su determinación por cromatografía de gases con detección por captura electrónica.

La reacción de selenito con ditiocarbamatos, da lugar a la formación de bis(ditiocarbamatos) de selenio. Estas reacciones se utilizan como etapa previa a la preconcentración de Se^{IV}, ya que estos complejos pueden ser extraídos con disolventes orgánicos. Los reactivos más empleados con este fin son dietil-ditiocarbamato sódico, tetrametilen-ditiocarbamato amónico y pirrolidin-ditiocarbamato amónico. Puesto que los ditiocarbamatos pueden reaccionar con otros metales presentes en la muestra, generalmente se requiere la adición de EDTA para enmascarar los iones interferentes [Kamada y col., 1980; Takanayagi y col., 1983].

2.3. PRECONCENTRACIÓN-EXTRACCIÓN

Se han descrito varios procesos de preconcentración-extracción de selenio, estos incluyen extracción con disolventes orgánicos, extracción con adsorbentes sólidos y coprecipitación [Tao y col., 1994; Adkins y col., 1995], esta última se ha empleado poco y destruye la forma química original. Los métodos de tratamiento de muestra se

emplean generalmente, para la eliminación de interferencias y preconcentración del analito. Actualmente, los estudios se están enfocando a la extracción selectiva de especies de selenio sin destrucción de la forma química original.

Extracción con disolventes

El Se^{IV} , como se acaba de exponer, forma complejos con *o*-diaminas aromáticas y ditiocarbamatos. La posterior extracción de los selenoderivados, empleando disolventes orgánicos, se utiliza para eliminar interferencias, obtener bajos blancos y preconcentrar el analito. El inconveniente de estos procesos es que requieren la destrucción de la forma química original, en el caso de especies distintas a Se^{IV} .

La extracción de Se^{IV} y Se^{VI} en muestras de sedimentos puede realizarse sin transformación de especies, a través de procesos de lixiviación con NaOH 1M durante 4 horas en baño de ultrasonidos [Velinsky y col., 1990].

En los últimos años, se ha estudiado la posibilidad de realizar extracciones de especies orgánicas e inorgánicas de selenio, con la ayuda de mezclas de disolventes. La finalidad del proceso es el desarrollo de métodos no destructivos para el análisis de especies de selenio en muestras sólidas. El procedimiento se ha aplicado generalmente a materiales de referencia certificados en selenio total, CRM 402 ($6.70 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$), correspondiente a hojas de trébol blanco [Potin-Gautier y col., 1993; Alsing Pedersen y col., 1997; Emteborg y col., 1998].

Recientemente, se ha realizado un estudio comparativo de la eficiencia de cuatro de éstos métodos [Emteborg y col., 1998]:

1. Agitación mecánica durante 5 horas con $\text{H}_2\text{O}-\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ (2+3+5).
2. Ultrasonicación durante 30 minutos en dos ciclos, con $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ (1+1).
3. Ultrasonicación en dos ciclos, con $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ (1+1) + HCl 0.28M.
4. Ultrasonicación en dos ciclos, con $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ (1+1) + 4% (v/v) NH_3 .

Los mejores resultados fueron obtenidos con el *método-4*, con una eficiencia de extracción del 50% de selenio total presente en la muestra, sin destrucción de la forma química.

El *método-1*, dio lugar a los peores resultados, con una eficiencia de extracción de tan sólo un 20%. Los autores identificaron la presencia de selenocistina y otra especie desconocida, diferente a selenometionina, selenito o seleniato. Resultados similares, con este método de extracción, fueron obtenidos por Alsing Pedersen y Larsen en 1997, mientras que en anteriores estudios realizados por Potin-Gautier y colaboradores en 1993, se encontró un 75% de extracción sobre el mismo material, identificando sólo SeCys_2 .

Extracción en fase sólida

En los procesos de derivatización y posterior extracción líquido-líquido pueden originarse problemas por formación de emulsiones. El empleo de la extracción en fase sólida, a través de adsorbentes capaces de recoger al selenoderivado desde la fase acuosa, soluciona el problema y permite la preconcentración del analito. Los adsorbentes suelen ser sílice o resinas poliméricas macrorreticulares del tipo XAD-7 y XAD-8 [Johansson y col., 1993].

La preconcentración de especies inorgánicas presentes en medios acuosos, se realiza generalmente a través de resinas de cambio aniónico. Tanzer y Heuman en 1991, realizan la preconcentración y separación de Se^{IV} y Se^{VI} sobre Dowex AG1X8. La elución de selenito y seleniato se realiza con ácido acético 1M y HCl 3M respectivamente. Örnemark y Olin en 1994, preconcentran y separan las mismas especies empleando una columna Dowex-1X8. La elución de las especies se realiza a diferentes concentraciones clorhídricas, 0.025M para selenito y 5M para seleniato.

La eliminación de interferencias es un proceso de gran importancia, la separación de selenio inorgánico de otros metales interferentes como Cu, Ni, Co y Ag, se realiza a través de resinas de cambio catiónico como Dowex 50WX16 [Hershey y

col., 1989]. Para la eliminación de la matriz orgánica, Campanella y colaboradores en 1987, emplean adsorbentes tipo Chelex-100, aplicándolo a la determinación de selenio inorgánico en aguas de grifo. Otros autores muestran la efectividad de resinas tipo XAD-8 en la eliminación de matriz orgánica [Roden y col., 1982]. Las especies de selenio orgánicas quedan también retenidas en el sólido adsorbente, por lo que se requiere de una etapa de oxidación previa a la extracción.

2.4. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

La identificación de seleno-aminoácidos en muestras biológicas requiere de especiales condiciones para prevenir cambios en la forma química. La liberación de aminoácidos de las proteínas se realiza a través de procedimientos de hidrólisis, vía ácida o vía enzimática, basados en la ruptura de los enlaces peptídicos.

Hidrólisis ácida

Se realiza en medio fuertemente ácido, generalmente HCl, y a temperaturas en torno a los 100 °C. Para evitar la oxidación de especies, se recomienda el empleo de condiciones anaerobias.

Los estudios de estabilidad realizados sobre patrones acuosos, revelan pérdidas de SeMet al cabo de 7 horas, en medio HCl 6M a 110 °C y condiciones anaerobias [Shepherd y col., 1969]. Otros autores han publicado que las especies SeMet y SeCys₂ son estables durante 22 horas en las mismas condiciones [Broderick y col., 1985]. Hammel y colaboradores en 1997, proponen la carboximetilación de los seleno-aminoácidos para evitar su descomposición durante la hidrólisis ácida.

En la hidrólisis ácida de muestras de levadura, con HCl 6N y calentamiento en baño de agua durante 5 horas, se obtuvo una eficiencia muy baja en la extracción, de tan sólo el 8% del selenio total [Gilon y col., 1995].

Carvalli y colaboradores en 1995, introdujeron el calentamiento por microondas en la hidrólisis ácida de tejidos de pescados. La reacción se llevó a cabo en medio HCl 6N conteniendo un 0.5% (v/v) de fenol, éste último añadido para evitar la fácil oxidación de algunos seleno-aminoácidos. El oxígeno se eliminó por burbujeo de nitrógeno, y el calentamiento se realizó a 645 W durante 25 min. Las recuperaciones de selenometionina y selenocistina adicionadas fueron superiores al 90%.

Hidrólisis enzimática

Esta hidrólisis se basa en el empleo de una proteasa para producir la ruptura de los enlaces peptídicos. La reacción se realiza generalmente, por incubación a 37 °C durante 24 horas, en medio tamponado.

Algunos trabajos identifican selenocistina y selenometionina en la hidrólisis enzimática de levadura enriquecida en selenio. La proteólisis se realiza con *pronasa E* (proteasa no específica), en medio tamponado fosfato-ácido cítrico a pH=7.5. Las recuperaciones obtenidas fueron superiores o iguales al 90%, tanto cuando la reacción se realiza por agitación magnética durante toda la noche a temperatura ambiente [Gilon y col., 1996] ó cuando se realiza durante 24 horas a 37 °C [Gilon y col., 1995]. Otros autores obtienen similares recuperaciones por tratamiento con *proteasa XIV* en agua, y con agitación magnética durante 24 horas [Bird y col., 1997a; Uden y col., 1998].

También se ha evaluado la eficacia de la *pronasa* (enzima no específica) en muestras de suero sanguíneo. Los resultados mostraron una eficiencia en la ruptura de enlaces peptídicos del 40%, quedando la mayor parte de las proteínas en forma de pequeños péptidos. El aumento en la cantidad de enzima no supuso mejoras en el proceso proteolítico. Los autores resaltaron la conocida inhibición de la actividad enzimática de la pronasa en presencia de iones Cu^{2+} , comúnmente presente en las muestras [Abou-Shakra y col., 1997].

Tan y Marshall en 1997, emplean la acción conjunta de proteasas (Tipo XIV y VII) y lipasas (celulasa) en la hidrólisis de materiales certificados en selenio total de

pescados y plantas. La incubación se realizó a 37 °C, en medio etanol/TRIS 0.03M (1+19) a pH=7.5, con agitación entre 4-8 horas. En la suspensión obtenida se analizó el contenido de selenio total, obteniendo recuperaciones muy próximas al 100%. El objetivo del trabajo fue utilizar la proteólisis como un procedimiento de digestión de muestras sólidas, por lo que no fueron identificadas las especies de selenio en los extractos.

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO

3.1 DETERMINACIÓN DE SELENIO TOTAL

Tabla 8. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de selenio total en muestras biológicas y medioambientales.

Técnica	Matriz	L.D.	Referencia
<i>Espectrométricas</i>			
UV-visible	plantas	80 mg/L	Ramachandran, 1993
Fluorimetría	sedimentos	0.28 µg/L	Haygarth y col., 1993
FRX	aguas	60 ng/L	Niss y col., 1993
HG-AFS	orina, suero	0.5 µg/L	D'Ulivo y col., 1993
HG-AAS	tejidos	20 ng/L	Mayer y col., 1992
HG-TC-AAS	aguas subterráneas	2 ng/L	Örnemark y col., 1992
ETAAS	orina	20 ng/L	N y col., 1993
HG-ICP-AES	agua de mar	4.1 µg/L	Lunzer y col., 1995
ID-MS	aguas	10 ng/L	Tanzer y col., 1991
ICP-MS	aguas	6.0 µg/L	Powell y col., 1986
	plantas	0.2 µg/L	Wu y col., 1997
HG-ICP-MS	aguas	6.3 ng/L	Haraldsson y col., 1992
	pescados	2.5 ng/L	Tao y col., 1993
<i>Electroquímicas</i>			
DPCSV	aguas	2 ng/L	Mattsson y col., 1995
DPP	pescados	5 ng	Lemly, 1982
NAA	dietas	0.5 ng/g	El-Hallaq y col., 1992

Muchas y variadas técnicas analíticas, se han aplicado a la determinación de selenio total en muestras biológicas y medioambientales. El análisis requiere la destrucción de la materia orgánica, y en algunos casos, el proceso apropiado de derivatización. En la Tabla 8 se presentan algunas de las técnicas empleadas en el análisis de selenio total, los límites de detección y la clase de muestras analizadas.

3.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO

3.2.1. Métodos no cromatográficos

El análisis se realiza a través de métodos selectivos para una de las formas químicas del analito, generalmente Se^{IV} . La determinación del resto de las especies implica el tratamiento adecuado de distintas alícuotas, para su transformación en la forma química detectable. La determinación de especies se realiza por diferencia según el esquema representado en la Figura 8.

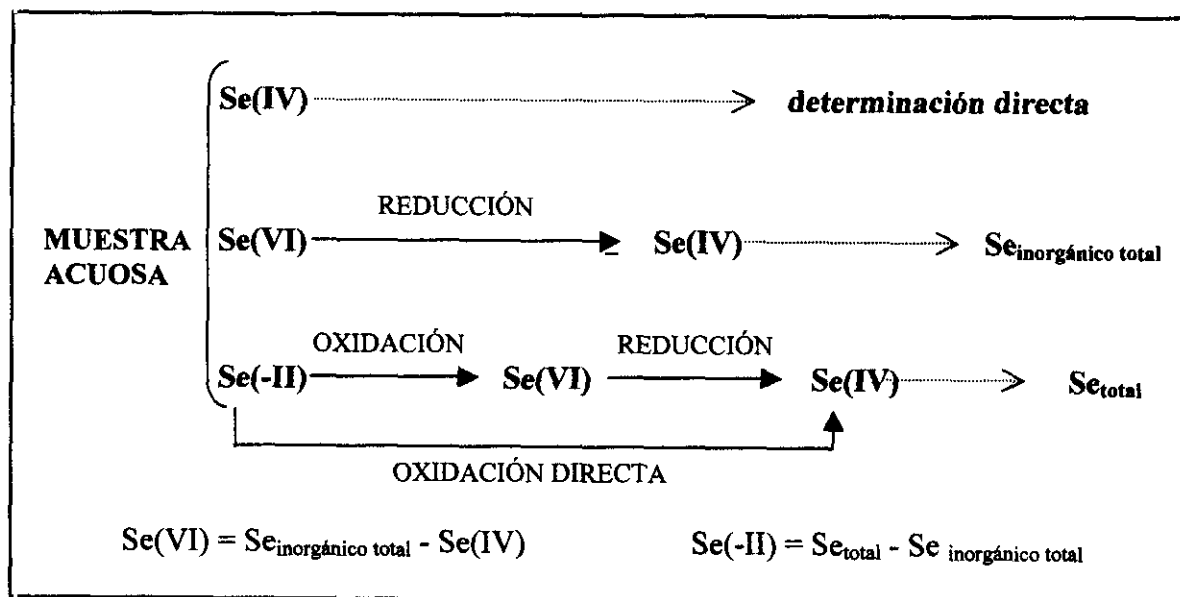


Figura 8. Esquema para la determinación de especies en discontinuo con métodos selectivos para Se(IV) .

El Se^{VI} requiere una reducción previa a Se^{IV} [Cutter, 1978], determinándose de este modo el selenio inorgánico total. La reducción puede realizarse de modo cuantitativo a través de mezclas como: $\text{SnCl}_2\text{-KI}$ o $\text{HCl-H}_2\text{SO}_4$. El procedimiento más empleado consiste en el calentamiento a $90\text{-}100\text{ }^\circ\text{C}$ con HCl de 4 a 6 N durante 10-20 minutos [Cutter, 1978]. Si el calentamiento se realiza durante largo tiempo, se puede producir la reducción a selenio elemental o bien sufrir pérdidas de selenio por volatilización. Otros autores muestran la conveniencia del empleo de HBr o NaBr para la reducción selectiva de Se^{VI} en Se^{IV} [D'Ulivo, 1989; González La Fuente, 1996; He y col., 1998].

En los últimos años ha adquirido mayor importancia el empleo de microondas como sistema de calentamiento en la reducción de Se^{VI} a Se^{IV} , ya sea en discontinuo [Bryce y col., 1995a], como en continuo [Cobo y col., 1993; Pitts y col., 1994; Bryce y col., 1995b; González La Fuente, 1996], con las consiguientes ventajas que proporciona la automatización de procesos.

Para la determinación del selenio total debe producirse la oxidación del selenio orgánico [$\text{Se}(-\text{II})$], los métodos más empleados incluyen el tratamiento de la muestra con peroxodisulfato potásico en medio clorhídrico [Cutter y col., 1984; Cobo y col., 1995] y la digestión ácida [Welz y col., 1984a; D'Ulivo y col., 1993]. Estos procesos de oxidación transforman las especies de selenio en su forma más oxidada, Se^{VI} , requiriendo su reducción selectiva a Se^{IV} para su determinación. Otra posibilidad es la foto-oxidación tras la adición de peróxido de hidrógeno [Campanella y col., 1989; Batley, 1986] o la digestión con $\text{Br}_2\text{-HBr}$ para producir selectivamente Se^{IV} [D'Ulivo y col., 1993; González La Fuente, 1996].

Los principales inconvenientes que presenta la especiación de selenio por métodos no cromatográficos son la compleja manipulación de la muestra, necesaria para realizar la transformación de especies y su limitada aplicación, ya que no permite diferenciar las especies de selenio orgánico.

Las técnicas de detección empleadas, específicas para Se^{IV} , han sido las siguientes:

Detección Fluorimétrica

El Se^{IV} se determina directamente por formación de un complejo fluorescente, mientras que el resto de especies: Se^{VI} y selenio orgánico total, se determinan según el proceso indicado en la Figura 8.

La posibilidad de cambio en las longitudes de onda de excitación y emisión, y la posible preconcentración en la etapa de extracción del derivado fluorescente, mejora en ocasiones la sensibilidad de la técnica, sin embargo la excesiva manipulación de la muestra puede introducir errores por pérdidas o contaminación.

La técnica se ha aplicado a la determinación de especies de selenio en aguas naturales y de mar, empleando la derivatización previa de Se^{IV} con 2,3 diaminonaftaleno (DAN). En el mejor de los casos el límite de detección fue de 50 ng/L [Nakaguchi y col., 1985; Takayanagi y col., 1984; 1985].

Uno de los factores limitantes se debe a la etapa de derivatización con DAN. La realización de la reacción en atmósfera de oxígeno, puede contribuir a la formación de otras especies fluorescentes que proporcionan un aumento en la señal del fondo, inhibiendo la fluorescencia del piazoselenol. Se debe proceder a la eliminación del oxígeno presente en disolventes y reactivos [D'Ulivo, 1997].

Ahmed y colaboradores en 1997, introducen la inyección en flujo con foto-reducción en línea, en la detección espectrofluorimétrica de selenio. El método se basa en la oxidación selectiva del complejo formado por Se^{IV} y el reactivo no fluorescente (2- α -pyridyl-tioquinaldinamida) en medio ácido sulfúrico. El producto de oxidación del complejo, es intensamente fluorescente. Se ha aplicado a la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} en materiales de referencia (sedimentos, té), muestras medioambientales (aguas), alimentos (harina y huevos) y muestras biológicas (pelo humano). Los límites de

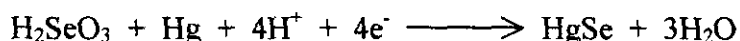
detección fueron de 1 µg/L para selenito y 10 µg/L para seleniato. El método propuesto, proporcionó muy buenas recuperaciones respecto al selenio total certificado, y perfecta correlación con los resultados obtenidos por HG-AAS, en cuanto al contenido en especies inorgánicas [Ahmed y col., 1997].

Detección Electroquímica

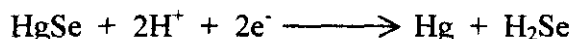
Los detectores electroquímicos ofrecen buenas sensibilidades en la determinación de selenio. Basados en la reducción electroactiva de Se^{IV} , la determinación de otras especies requiere su previa transformación (Figura 8).

Las técnicas electroquímicas más empleadas en la determinación de selenio son la polarografía diferencial de impulsos (DPP) y la voltamperometría de redisolución catódica por diferencia de impulsos (DPCSV).

La reacción de reducción se produce sobre la superficie de un electrodo de gota de mercurio en medio ácido, generalmente HCl.



En el análisis por DPCSV, el HgSe puede redisolverse catódicamente por reacción en medio ácido [Ferri y col., 1998].



Campanella y colaboradores en 1987, realizan la determinación de especies de selenio por DPP y DPCSV en aguas naturales. Los autores realizan la filtración de la muestra para separar la fracción soluble de la insoluble. La determinación de especies se realiza sólo en la fracción soluble, sometiendo a la muestra a varios procesos (Figura 8). La fracción insoluble se somete a digestión con ácidos, cuantificando el selenio total. Los límites de detección fueron de 10 y 0.04 µg/L, para el análisis por DPP y DPCSV respectivamente.

El empleo de etapas previas de preconcentración en resinas quelatantes (Chelex 100 cargada con Fe^{III}), mejora los límites de detección de ambas técnicas, alcanzando 1.5 ng/g en la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} (por diferencia) en sedimentos [Ferri y col., 1996; 1998].

Ambas técnicas electroquímicas sufren de serias interferencias por presencia de materia orgánica o por otros iones como Cr^{VI} , Cu^{II} , Mo^{VI} , Ni^{II} , Te^{IV} , Zn^{II} y V^{V} . El empleo de sistemas de inyección en flujo [Bryce y col., 1995a] o de métodos de extracción en fase sólida [Howard y col., 1980; D'Ulivo, 1997; Ferri y col., 1998], contribuyen a la mejora en la detección.

Detección por Activación Neutrónica (NAA)

Esta técnica no es muy sensible para la determinación de especies de selenio en muestras medioambientales, por lo que requiere de una etapa previa de preconcentración de la muestra.

Los isótopos empleados son $^{77\text{m}}\text{Se}$ y ^{75}Se , cuyos tiempos de vida medio son de 17.4 s y 119.8 días respectivamente [Lide y col., 1997-1998]. El primero proporciona mayor sensibilidad, pero debido a su corta vida, el isótopo 75 se prefiere en el análisis de especies.

Las principales etapas del método previas al análisis por NAA son:

1. Reducción de Se^{VI} a Se^{IV} por calentamiento de la muestra en medio clorhídrico.
2. Reducción a selenio elemental con ácido ascórbico.
3. Adsorción del selenio elemental sobre carbón activo.

El método ha sido aplicado a la determinación de Se^{IV} (omitiendo la etapa 1) y Se^{VI} (por diferencia) en aguas naturales y marinas, obteniéndose límites de detección de 10 $\mu\text{g/L}$ [Massè y col., 1981].

Detección Atómica

En general, los detectores atómicos no son específicos de una sola especie, sin embargo, se emplean junto con la generación de hidruros para la especiación no cromatográfica.

El hidruro de selenio formado se atomiza generalmente:

- En una célula de cuarzo, calentada electrotérmicamente o mediante una llama aire-acetileno (HG-AAS).
- En una llama de hidrógeno (HG-AFS).
- En un plasma de argón o helio (HG-ICP-AES/MS y HG-MIP).

Además de la posible determinación de especies de selenio a través de procesos de oxidación-reducción, la generación de hidruros introduce mejoras, en su acoplamiento con detectores atómicos, respecto a la nebulización como sistema de introducción de muestra. El aumento en la eficiencia de transporte y de los procesos de atomización/ionización, así como la consecuente reducción de interferencias de matriz, producen una mejora considerable en los límites de detección.

La reacción de generación del hidruro de selenio puede realizarse en discontinuo [Cutter, 1978] o a través de procesos de flujo continuo. Los últimos son preferidos debido a las ventajas que ofrece la automatización del proceso: mayor rapidez en el análisis, menor manipulación de la muestra y reducción en el consumo de reactivos. Los sistemas continuos en conjunción con la inyección en flujo (FI), mejoran las prestaciones del sistema, debido al pequeño volumen de muestra requerido y a la reducción que se produce en el nivel de interferencias [Marshall y col., 1990a, 1990b; Cobo y col., 1993].

La total automatización del proceso se consigue a través de la transformación de especies en línea. En el acoplamiento HG-FAAS, Nakata y colaboradores en 1985, llevaron a cabo la reducción en línea de Se^{VI} a Se^{IV} , el proceso se realizó por adición de

HCl y calentamiento en baño de agua a 95 °C. Otros autores, realizan la reducción en línea con ayuda de la radiación de una lámpara UV [Ahmed y col., 1997] o bien, a través de calentamiento por microondas (MW) [Cobo y col., 1993; Bryce y col., 1995b].

A través del acoplamiento HG-MW-AAS, se ha realizado la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} en agua de mar, los límites de detección alcanzados fueron de 0.7 a 1.5 $\mu\text{g/L}$ para el método de FI y continuo respectivamente [Cobo y col., 1993]. El empleo de métodos de preconcentración de selenito y seleniato, utilizando resinas tipo Dowex 1X8 como etapa previa a la generación del hidruro, permite rebajar los límites de detección en HG-AAS hasta 0.025 $\mu\text{g/L}$ [Örnemark y col., 1994]

He y colaboradores en 1998, determinan selenito y seleniato en aguas de mar a través del acoplamiento HG-AFS, el límite de detección alcanzado fue de 1.3 $\mu\text{g/L}$. Los autores realizan la reducción de Se^{VI} en discontinuo, por adición de NaBr y HCl. Bryce y colaboradores (1995b) realizan el acoplamiento FI-HG-MW-AFS, consiguiendo rebajar el límite de detección hasta 0.04 $\mu\text{g/L}$. El método fue aplicado a la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} en aguas de mar y muestras de hemodiálisis.

La técnica HG-ICP-AES es significativamente menos sensible que otras técnicas atómicas combinadas con la generación de hidruros (AAS, AFS, ICP-MS). Los límites de detección se encuentran entre 0.1-4.1 $\mu\text{g/L}$ [D'Ulivo, 1997; Lunzer y col., 1995]. El acoplamiento se ha aplicado al análisis de selenio total en alimentos [Anderson y col., 1993] y de selenio inorgánico total ($\text{Se}^{\text{IV}} + \text{Se}^{\text{VI}}$) en aguas de río [Brindle y col., 1997], pero no a la determinación de especies.

La técnica de ICP-MS proporciona muy bajos límites de detección y un escaso nivel de interferencias. Estas prestaciones, se ven aún mejoradas cuando se acopla a la generación de hidruros, alcanzando límites de detección de 6.3 a 36 ng/L [Haradlsson y col., 1992; Janghorbani y col., 1989].

El acoplamiento HG-ICP-MS, se ha aplicado para la determinación de Se inorgánico total en aguas naturales y de mar, sin diferenciación entre Se^{IV} y Se^{VI} . Los

autores centran su estudio en la optimización del análisis multielemental de elementos formadores de hidruros volátiles (Se, As y Sb) [Haradlson y col., 1992].

Muñoz Olivas y colaboradores (1995), proponen el empleo de disolventes orgánicos (metanol, etanol, propanol, acetona y acetonitrilo) para reducir las interferencias isobáricas, procedentes de dímeros de argón, y mejorar la señal de selenio. La determinación de Se^{IV} disuelto en aguas naturales por FI-HG-ICP-MS, empleando un 6% (v/v) de metanol, proporciona límites de detección de 5 ng/L.

3.2.2. Métodos cromatográficos

En estos métodos se procede a la separación de especies de forma previa a su determinación, requiriendo del acoplamiento de dos técnicas: una capaz de separar de forma selectiva las especies de selenio y otra capaz de cuantificar de forma sensible.

3.2.2.1. Técnicas de Separación

Cromatografía de Gases

La separación de especies volátiles de selenio puede realizarse por cromatografía de gases sin modificación química, debido a sus diferentes puntos de ebullición (P.eb. $\text{DMSe}=54\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{DESe}=108\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{DMDSe}=153\text{ }^{\circ}\text{C}$) [Gui-bin y col., 1992], de esta forma se han determinado estas especies de selenio en aire y en muestras acuosas [Dauchy y col., 1994]. Su aplicación a especies no volátiles, requiere de una etapa previa de derivatización para la formación de piazoselenoles volátiles [Johansson y col., 1993]. Otras alternativas incluyen la formación de derivados fenilos y complejos con acetona o ditiocarbamato [Harrison y col., 1989]. En general, esto requiere la pérdida de la forma química original.

En los primeros trabajos, las separaciones se realizaban en columnas empaquetadas de vidrio, donde la conexión con el detector se realizaba a través de una línea de transferencia externa de acero o níquel [Chau y col., 1975; Jiang y col., 1982].

Posteriormente, se ha extendido el uso de columnas capilares rellenas de sílice, por ser inertes y flexibles, además de proporcionar buenas separaciones para compuestos organometálicos volátiles [Chasteen y col., 1990; Tanzer y col., 1992].

Guy-bin y colaboradores en 1992, determinan DMSe, DMDS_e y DESe en muestras de lodos y suelos. La formación de estos compuestos se realiza mediante la simulación de procesos naturales de biometilación del selenio inorgánico presente en el sólido. Posteriormente las especies son arrastradas por una corriente de nitrógeno hacia una solución de hexano. La separación de los alquilseleniuros se realiza sobre una columna capilar, conteniendo 1.5% de OV-1 sobre Shimalita W. La elución de DMSe, DESe y DMDS_e se produce a una temperatura de columna de 40, 60 y 140 °C respectivamente.

El TMSe⁺ se puede determinar por cromatografía de gases, previa transformación a DMSe en medio alcalino [Dauchy y col., 1994].

Cromatografía Líquida

El poder separador de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ofrece un gran potencial para la separación de las especies no volátiles, sin necesidad de recurrir a procesos de derivatización.

La separación de selenito y seleniato, se ha realizado generalmente por cromatografía de cambio aniónico, empleando disoluciones reguladoras de fosfato o citrato como fases móviles [Oyamada y col., 1987; Laborda y col., 1993; Cobo y col., 1995]. Algunos trabajos incluyen la elución de catión TMSe⁺ en el volumen muerto [Laborda y col., 1993; Cobo y col., 1995]. Alternativamente, se ha empleado la cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos sobre fases estacionarias de octadecilsilíce o poliméricas. En este caso, la fase móvil contiene un reactivo catiónico, generalmente una sal de tetrabutil amonio, capaz de formar pares iónicos con selenito y seleniato. La adición de un ligero porcentaje de modificador orgánico (<10% de metanol o acetonitrilo), mejora la separación cromatográfica [Yang y col., 1995;

Vela y col., 1993]. Yang y colaboradores en 1995, incluyen la elución en tiempo muerto de especies catiónicas de selenio como TMSe^+ .

La cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos, se ha aplicado también a la separación de TMSe^+ , SeCys_2 y SeMet , empleando tanto reactivos aniónicos como pentanosulfonato sódico (PSNS) [Muñoz Olivas y col., 1996a] o heptanosulfonato sódico (HSNS) [Gilon y col., 1996], como reactivos catiónicos. Bajo esta última modalidad, Potin-Gautier y colaboradores en 1993, realizaron la separación para SeCys_2 y SeMet empleando bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) como contraión, los autores indicaron la posible separación de estos seleno-aminoácidos junto con selenito y seleniato. Sin embargo, posteriores estudios mostraron la falta de resolución cromatográfica del método [Gilon y col., 1996].

La separación conjunta de especies orgánicas e inorgánicas de selenio tan sólo ha sido lograda recientemente. La separación de SeCys_2 , SeMet , Se^{IV} y Se^{VI} se ha realizado en columnas poliméricas de cambio aniónico, mediante la elución con fases móviles a pHs básicos (>8.5); de este modo los seleno-aminoácidos están presentes en forma aniónica [Harwood y col., 1997; Alsin Pedersen y col., 1997; Emteborg y col., 1998]. Emteborg y colaboradores, comprobaron que la elución de TMSe^+ daba lugar a un pico en el tiempo de retención de SeMet (correspondiente al tiempo muerto). Los autores proponen la realización de un segundo análisis, sobre otra columna (Ion Pac AG-10), donde el TMSe^+ puede separarse del resto de especies.

Marchante-Gayón y colaboradores en 1996, desarrollan un método para la separación de SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} por fase inversa modificada con moléculas de bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB). El orden de elución, correspondiente al indicado anteriormente, se ve fuertemente modificado en su aplicación a muestras reales, y es de suponer la fuerte influencia que ofrece la salinidad de la muestra. En el análisis de muestras de orina, el Se^{IV} adelanta considerablemente su tiempo de retención, solapando con SeCys_2 y SeMet .

3.2.2.2. Técnicas de Detección

Los detectores comúnmente empleados en cromatografía de gases se caracterizan por su falta de especificidad y en muchos casos, limitada sensibilidad. Los detectores de captura electrónica (ECD) y de ionización en llama (FID) se han empleado en los primeros estudios de alquilseleniuros, con límites de detección de 5 pg pero escasa selectividad [Evans y col., 1966; Oyamada y col., 1987]. También se ha realizado la determinación de diazosenoles volátiles por ECD [Al-Attar y col., 1990; Singh y col., 1997]. La detección por fotometría de llama (FPD), se ha utilizado ampliamente en la determinación de compuestos orgánicos de azufre y fósforo, sin embargo, la determinación de alquilseleniuros se ve afectada por una baja sensibilidad y por interferencias debidas a la presencia de compuestos volátiles de azufre [Tanzer y col., 1990; Tanzer y col., 1992].

La cromatografía iónica con detector conductimétrico, se ve afectada por la presencia de aniones como sulfatos, cloruros, fosfatos, carbonatos y nitratos, los cuales aparecen como componentes mayoritarios en la mayoría de muestras. La determinación de seleno-aminoácidos por HPLC-UV, además de proporcionar una pobre sensibilidad, se ve seriamente interferida por presencia de aminoácidos de azufre [Martin y col., 1969].

El acoplamiento a detectores específicos, como los atómicos, mejora la determinación tanto por reducción de interferencias como por aumento de la sensibilidad. Las técnicas de detección más empleadas en el acoplamiento con ambos tipos de cromatografía, son la absorción atómica y los plasmas inducidos (MIP e ICP).

Absorción atómica con llama (FAAS)

La determinación de alquilseleniuros por cromatografía de gases se ha llevado a cabo mediante un detector de absorción atómica con llama a través de la atomización en una célula de cuarzo (QFAAS), obteniéndose límites de detección de 0.1 ng de selenio [Cutter, 1978; Cooke y col., 1987; Karlson y col., 1988].

El acoplamiento HPLC-FAAS, presenta problemas debido a la diferencia entre los caudales de entrada al nebulizador (6 mL/min) y salida de la columna cromatográfica, además de la baja sensibilidad que proporciona la técnica en la determinación de selenio. A pesar de estos inconvenientes, algunos autores han realizado el acoplamiento directo por conexión a través de un tubo de teflón [Kölbl y col., 1993; 1995]. La determinación de Se^{IV} y Se^{VI} en aguas, empleando un caudal de 2.5 mL/min en la separación, permite la obtención de límites de detección de 8 y 11 ng para selenito y seleniato respectivamente [Kölbl y col., 1995].

Debido a la baja sensibilidad que posee esta técnica, el acoplamiento con este detector se realiza a través de la generación del hidruro de selenio. La sensibilidad del sistema depende de la mezcla de gases, del caudal de éstos y de la geometría de la célula [Cutter, 1985]. Cobo y colaboradores en 1995, determinan TMSe^+ , Se^{IV} y Se^{VI} por HPLC-MW-HG-AAS, alcanzando límites de detección desde 1.1 a 2.2 ng. Otros autores, con el mismo acoplamiento, consiguen límites de detección de 0.5 ng [Marchante-Gayón y col., 1996; González La Fuente y col., 1996].

Hay que considerar que muchos compuestos orgánicos, como los selenoaminoácidos y TMSe^+ , no reaccionan con agentes reductores para dar hidruros volátiles. El acoplamiento del HPLC a la HG, requiere de sistemas de oxidación-reducción en línea de forma previa a la etapa de generación de hidruros.

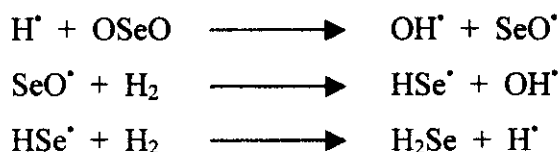
Cobo y colaboradores en 1995, proponen la oxidación de TMSe^+ a Se^{VI} con persulfato potásico y posterior reducción a Se^{IV} con HCl. Las reacciones de transformación de especies se realizan por incorporación en línea de un horno de microondas. Posteriores trabajos emplean una única reacción con KBrO_3 -HBr y calentamiento por microondas, para convertir especies orgánicas e inorgánicas a selenito [González LaFuente y col., 1996; Marchante-Gayón y col., 1996].

Otra modalidad consiste en el acoplamiento del HPLC a la técnica de FAAS a través de la generación de hidruros termoquímica (THG) [Blais y col., 1991; Lei y col.,

1995; Matni y col., 1995]. Este acoplamiento facilita la introducción de elevadas concentraciones de disolventes orgánicos a la llama, comúnmente empleados en HPLC.

En el sistema HPLC-THG-FAAS, los analitos que eluyen de la columna cromatográfica son nebulizados por efecto termospray y quemados en una cámara de combustión, bajo una pequeña llama de metanol-oxígeno. Los productos gaseosos formados en la combustión reaccionan con exceso de H_2 para formar H_2Se . En la THG, la reacción de generación del hidruro se produce en fase gas, sin necesidad de una etapa previa de transformación de especies orgánicas a Se^{IV} .

Se cree que este mecanismo de generación de hidruros se produce por reacción con radicales de hidrógeno [Blais y col., 1991]:



Blais y colaboradores en 1991, separan $TMSe^+$ y selenocolina por cromatografía de fase inversa, empleando metanol como fase móvil. En el acoplamiento HPLC-THG-AAS los límites de detección fueron de 44 y 31 ng respectivamente. Lei y Marshall en 1995, mejoran la sensibilidad en la determinación de seleno-aminoácidos (L.D. = 1 ng), por separación en fase inversa de dinitrofenil derivados (DNP-Se) y detección por THG-AAS.

Absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS)

En el acoplamiento con las técnicas cromatográficas, el principal problema surge de la dificultad que supone la realización del análisis en continuo, debido al ciclo térmico inherente a esta técnica atómica. Para solventar el problema se necesitaría del diseño de hornos especiales, capaces de mantener la temperatura de atomización durante el periodo de elución.

El acoplamiento GC-ETAAS, se ha aplicado a la determinación de alquilseleniuros en suelos [Gui-bin y col., 1992] y aguas [Jiang y col., 1982], con límites de detección de entre 5 y 20 pg. Los últimos trabajos presentan una interfase de unión entre ambas técnicas a través de un tubo de politetrafluoretileno de 20 cm de longitud y 0.1 cm de diámetro interno, acabado en un tubo de cuarzo conectado al horno de grafito [Gui-bin y col., 1992].

En el acoplamiento a la cromatografía de líquidos, se puede optar por la recogida del eluato en fracciones. Se puede emplear un colector automático con recogida en viales de polietileno, o bien manualmente con control de volúmenes y tiempos [Marchante-Gayón y col., 1996]. En cualquier caso, los cromatogramas no pueden ser monitorizados en tiempo real [Laborda y col., 1993].

Varios autores determinan especies de selenio a través del acoplamiento HPLC-ETAAS, bien por cromatografía iónica [Foster y col., 1986; Oyamada y col., 1987; Kölbl y col., 1993; Laborda y col., 1993; Gilon y col., 1996], como por cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos [Potin-Gautier y col., 1993; Gilon y col., 1995; Marchante-Gayón y col., 1996;], con límites de detección entre 0.6 y 4.7 ng de selenio. En general se recomienda el empleo de tubos de grafito pirolítico y temperaturas de atomización entre 2100 y 2600 °C.

La técnica ETAAS ofrece buena sensibilidad en la determinación de selenio, sin embargo se ve afectada por pérdidas en la etapa de calcinado debido a la volatilidad del elemento, así como por interferencias, originadas por la presencia de iones Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y materia orgánica, que pueden dar lugar a una reducción de la señal de selenio y altos fondos [Kobayashi, 1992; D'Ulivo, 1997].

Algunos efectos de fondo no pueden ser corregidos por la lámpara de Deuterio, siendo necesario el empleo de correctores de efecto Zeeman [Tsalev y col., 1990; Laborda y col., 1993; Kölbl y col., 1993]. El empleo de modificadores químicos es indispensable en la determinación de selenio por esta técnica [Kölbl y col., 1993]. Se suelen emplear combinaciones de metales pesados como Ni, Cu, Ag, Mo y Pd, junto

con nitrato de magnesio, que favorece la calcinación de la matriz. La cantidad de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ debe ser controlada, ya que se descompone en MgO , el cual tiene tendencia a condensar en las partes frías del horno entorpeciendo el camino óptico. El metal más empleado es el Pd, puesto que permite la estabilización de especies de selenio tanto orgánicas como inorgánicas, mostrándose más efectivo que el Cu y el Ni. También se ha comprobado que la adición de Pd elimina la interferencia de Hg [Johannessen y col., 1993; Deaker y col., 1995].

Kölbl y colaboradores en 1993, estudiaron la interferencia por presencia de sulfitos y sulfatos sobre la señal de $10 \mu\text{g/L}$ de Se^{IV} y Se^{VI} en HPLC-ETAAS. Los autores observaron que la presencia de 1000 mg/L de sulfito reducía la señal de Se^{VI} en un 30%, mientras que la presencia de sulfato al mismo nivel de concentración, producía una reducción de la señal de selenito y seleniato de un 16 y 80% respectivamente. Esta importante interferencia, presente en las aguas, puede ser minimizada a través del empleo de sales de bario [Welz y col., 1992].

La eficiencia en la atomización de selenio depende de la forma química presente. La línea de resonancia (196 nm) sufre de serios problemas por la absorción molecular procedente de impurezas orgánicas, siendo poco efectivo el corrector de fondo de Deuterio. El empleo de hidrógeno (10% en el argón) beneficia tanto al transporte hacia el horno como a la atomización, actuando como si realizara una precombustión sobre los restos orgánicos [Jiang y col., 1982; Gui-bin y col., 1992].

Fluorescencia atómica (AFS)

La fluorescencia atómica se ha empleado como detector en la separación de alquilseleniuros por cromatografía de gases, proporcionado límites de detección de 10 pg de selenio [D'Ulivo y col., 1986]. El acoplamiento de ambas técnicas se ha realizado a través de una interfase de níquel, forrada en su interior por un material inerte como el vidrio [Harrison y col., 1989]. El empleo de disolventes orgánicos como benceno, tetracloruro de carbono, etanol, etc., puede dar lugar a solapamientos entre las señales del analito y disolvente. La señal del selenio puede ser reducida de forma

considerable, probablemente debido a efectos de desactivación, por lo que el disolvente orgánico a emplear debe ser previamente chequeado en su zona de emisión fluorescente.

El acoplamiento de la cromatografía líquida se ha empleado en la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} a través de la incorporación del sistema de generación de hidruros, con calentamiento en línea por microondas. Los límites de detección conseguidos fueron de 0.2 y 0.3 $\mu\text{g/L}$ para selenito y seleniato respectivamente [Pitts y col., 1995].

Emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-AES)

En general éste es un buen detector para la cromatografía de gases, ya sea en la determinación de compuestos volátiles o no, en cuyo caso se acude a la formación de piazocompuestos [Harrison y col., 1989; Talmi y col., 1974]. Por otro lado, posee ventajas en cuanto a su capacidad multielemental frente a los detectores convencionales de GC. La determinación simultánea de compuestos volátiles de selenio y de azufre en agua de mar, permitió identificar DMSe (a 196 nm) y un compuesto de azufre no identificado (a 181 nm), que eluían juntos de la columna cromatográfica [Tanzer y col., 1990; 1992]. El límite de detección encontrado fue de 2.5 pg para DMSe. El acoplamiento se ha empleado en estudios de biometilación de selenio en suelos y lodos [Reamer y col., 1980] y en análisis de aguas [Calle de la y col., 1995], con límites de detección de 10 a 20 pg para DMSe y DMDS_e.

Emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES)

El mayor problema en el acoplamiento se debe a la perturbación originada en el plasma, debido a su baja tolerancia al empleo de disolventes orgánicos, comúnmente utilizados como fase móvil en HPLC. La deriva en el potencial del plasma, requiere trabajar a potencias de radiofrecuencia superiores, además de la adición de oxígeno al flujo de gas de nebulización [Hill y col., 1993].

La ventaja del empleo de ICP-AES sobre AAS se debe al amplio intervalo dinámico y el menor nivel de interferencias químicas que le afectan. Por otro lado las

interferencias espectrales influyen en menor proporción que con el empleo de ETAAS [Kobayashi, 1992].

El acoplamiento HPLC-ICP-AES puede realizarse por conexión entre la salida de la columna cromatográfica y la entrada al nebulizador a través de un simple tubo de teflón. En estas condiciones se ha llevado a cabo la determinación de Se^{IV} y Se^{VI} con límites de detección de 140 y 91 ng respectivamente [McCarthy y col., 1983]. Posteriormente, se ha empleado este acoplamiento en la determinación de SeCys_2 , SeMet , selenito y seleniato en agua de mar sintética, alcanzando límites de detección entre 16 y 60 ng [Harwood y col., 1997].

El tipo de nebulizador es importante en cuanto a la sensibilidad y compatibilidad del acoplamiento. El empleo de la nebulización termoquímica permite la utilización de un 75% de disolvente orgánico en la fase móvil, frente al 25% que admite como máximo el nebulizador neumático de flujo cruzado. La generación del aerosol se basa en la expansión adiabática de un líquido a través de un capilar calentado. El líquido es vaporizado parcialmente, produciendo un aerosol calentado a la salida del capilar, el cual es transportado por un flujo supersónico de vapor al ICP. Como resultado, una gran cantidad de disolvente puede llegar al plasma, mejorando la eficiencia de transporte respecto a la nebulización neumática. El empleo de una cámara de condensación resulta eficaz para la eliminación de las partículas de vapor del disolvente, preservando así la estabilidad del plasma. El sistema se ha empleado en la separación de TMSe^+ , Se^{IV} y Se^{VI} , consiguiendo límites de detección de 14 a 51 ng de selenio [Laborda y col., 1991].

Recientes estudios han conseguido una importante mejora en cuanto a los límites de detección de especies de selenio en el acoplamiento HPLC-ICP-AES, a través del empleo del nebulizador de inyección directa (DIN), que consigue mejorar la eficiencia de transporte de la muestra en casi dos órdenes de magnitud frente al nebulizador neumático convencional. La separación de especies orgánicas e inorgánicas por cromatografía de cambio aniónico en el acoplamiento HPLC-DIN-ICP-AES, proporciona límites de detección entre 0.3 y 0.6 ng de Se, utilizando un volumen de inyección de 15 μL [Emteborg y col, 1998]. El método se ha aplicado al análisis de un

material de referencia de trébol blanco, certificado en selenio total (CRM 402), permitiendo la identificación de selenocistina junto con otra especie de selenio desconocida. Los autores advierten de la presencia de interferencias espectrales procedentes de carbono, dando lugar a una banda de emisión alrededor de la línea del selenio (196,026 nm).

Otros trabajos presentan el acoplamiento HPLC-HG-MW-ICP-AES, de este modo se mejora la sensibilidad de la técnica y se consigue reducir las interferencias. Los autores determinan Se inorgánico, SeMet y SeEt en muestras de orina adicionadas, con límites de detección de 2.2 a 4.1 ng [González LaFuente y col., 1996].

Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La técnica de ICP-MS proporciona mejor sensibilidad para la mayoría de los elementos respecto a ICP-AES, y por lo tanto comparable a ETAAS, sin embargo posee muchas ventajas frente a ésta última debido al menor nivel de interferencias, mayor capacidad de análisis (multielemental, isotópico) y fácil acoplamiento en continuo.

En el acoplamiento con la cromatografía líquida surgen limitaciones en cuanto a la elección de la fase móvil. La introducción de elevadas cantidades de disolventes orgánicos, como ya se mencionó en la introducción (Capítulo I, sección 2.3), además de afectar a la estabilidad y propiedades del plasma, pueden ocasionar depósitos de carbono en el cono muestreador. También debe controlarse el contenido salino de las disoluciones reguladoras empleadas en cromatografía iónica. Concentraciones salinas elevadas, pueden originar depósitos en el sistema, proporcionando elevados ruidos de fondo y depresión en las señales.

La determinación de especies de selenio por HPLC-ICP-MS, empleando tanto cromatografía iónica como fase inversa con formación de pares iónicos, proporciona los mejores límites de detección (de 0.02 a 0.11 ng), permitiendo así la aplicación a muestras reales [Muñoz Olivas y col., 1996a; Alsin Pedersen y col., 1997; Goessler y col., 1997; Bird y col., 1997b].

En el acoplamiento GC-ICP-MS, se han desarrollado métodos de dilución isotópica con derivatización de selenito a piazoselenol. El límite de detección alcanzado fue de 0.02 µg/L, empleando de 1-6 µl en la inyección de muestra [Gallus y col., 1996].

La técnica de ICP-MS no está exenta de interferencias tanto espectrales como no espectrales. Dentro de las primeras, las interferencias debidas a especies poliatómicas pueden ser reducidas por adición de un bajo porcentaje de metanol a la fase móvil (<6 %) [Yang y col., 1995], proporcionando además un aumento de sensibilidad para selenio en un factor de 4-5 [Muñoz Olivas y col., 1996b].

Otros autores han optado por el acoplamiento HPLC-MW-HG-ICP-MS, con el fin de aumentar la sensibilidad y reducir las interferencias tanto espectrales como de matriz, sin embargo, presentan límites de detección similares a los obtenidos en otros trabajos sin el acoplamiento a la generación de hidruros (0.02-0.06 ng) [González LaFuente y col., 1996].

Yang y colaboradores en 1995, muestran las ventajas en el empleo de la nebulización ultrasónica (USN), cuando la separación analítica requiere de elevadas concentraciones de disolventes orgánicos. En la determinación de TMSe^+ , Se^{IV} y Se^{VI} en muestras de orina, los límites de detección están entre 0.02 y 0.07 ng. También se ha considerado el empleo de sistemas micro-HPLC, donde se requiere una menor cantidad de disolvente orgánico [Laborda y col., 1991].

A continuación, se presenta en la Tabla 9 un resumen con los métodos cromatográficos empleados en la determinación de especies de selenio.

Tabla 9. Métodos cromatográficos para la determinación de especies de selenio, límites de detección y aplicaciones.

(1) L.D. de la especie mencionada.

(2) Especies volátiles producidas por actividad microbiológica inducida en las muestras.

(3) Etapa previa de derivatización.

ESPECIES	DETECCIÓN	L.D.(ng Se)	COLUMNA; F.M.	MUESTRA	REFERENCIA
CROMATOGRAFÍA DE GASES					
DMSe, DMDS _e , DESe; DEDSe, DPrSe, DPrDSe	FID/ECD	--	20% PMPE / Chromosorb W	--	Evans y col., 1966
DMSe, DMDS _e	QFAAS	0.1	DC-550 / Chromosorb WAW	aguas	Cutter, 1978
DMSe, DMDS _e	QFAAS	0.1	5% OV-3 / Chromosorb WHP	aguas	Cooke y col, 1987
DMSe, DMDS _e	QFAAS	0.1	3% OV-101 / Chromosorb W	suelos ⁽²⁾	Karlson y col., 1988
DMSe, DMDS _e , DESe	CT-ETAAS	0.1-0.2 ⁽¹⁾	10% PMPE / Chromosorb W	aguas ⁽²⁾	Jiang y col., 1982
DMSe, DMDS _e , DESe	CT-ETAAS	0.005-0.02 ⁽¹⁾	1.5% OV-1 / Shimalite W	suelos ⁽²⁾	Gui-bin y col., 1992
DMSe, DMDS _e , DESeO ₂	MIP-AES	0.02 ⁽¹⁾	3% OV-101 / Chromosorb 750	suelos ⁽²⁾	Reamer y col., 1980
DMSe y DMDS _e	MIP-AES	0.01	WCOT Fused Silica CP-Sil-5 CB	aguas	Calle de la y col., 1995
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS					
<i>cambio iónico</i>					
SeCys ₂ , SeMet, Se-aa	UV	--	Aminex A-4; citrato 0.2N, pH=3.2 y 4.2	plantas	Martin y col., 1969
Se-aa, Se ^{IV} , TMS ⁺	NAA	--	Bio-Rad AG-50W-X8; LiNO ₃ 0.5M	orina	Blocky y col., 1985
Se ^{IV} , Se ^{VI} , TMS ⁺	MW-HG-AAS	1.1-2.2	Hamilton PRP-X-100; fosfato 0.1M, pH=6.8	aguas	Cobo y col., 1995
Se ^{IV} , Se ^{VI}	ETAAS FAAS	1 y 0.6 8 y 11	ESA Anion III; fialato 3mM, pH= 7	aguas	Kölbl y col., 1993

ESPECIES	DETECCIÓN	L.D.(ng Se)	COLUMNA; F.M.	MUESTRA	REFERENCIA
TMSe ⁺ , Se ^{IV} , Se ^{VI}	ETAAS	10	Dowex 50W-X8; HCl 4M	aguas	Foster y col., 1986
Se ^{IV} , Se ^{VI}	ETAAS	--	Dowex 50W-X8; HCl 4M	aguas	Oyamada y col., 1987
TMSe ⁺ , Se ^{IV} , Se ^{VI}	ETAAS	0.76-1.67	Nucleosil 100-SB; citrato 10mM, pH=3 y 7	--	Laborda y col., 1993
Se ^{IV} , Se ^{VI} , SeCys ₂ , SeMet	ETAAS	0.8-1.7	Hamilton PRP-X-100; acetato de níquel, pH=6.5	levadura	Gilon y col., 1996
Se ^{IV} y Se ^{VI}	HG-AFS	0.2 y 0.3	BAX-10; sulfato potásico 25 y 100 mM, pH=5	--	Pitts y col., 1995
Se ^{IV} y Se ^{VI}	ICP-AES	140 y 91	Nucleosil NH(CH ₃) ₂ tampón pH=4.6 y 6.9	aguas	McCarthy y col., 1983
TMSe ⁺ , Se ^{IV} , Se ^{VI}	ICP-AES	14-54	Waters IC-PAK; citrato 80mM, pH=3.3	aguas	Laborda y col.; 1991
Se ^{IV} , Se ^{VI} , SeCys ₂ , SeMet	ICP-AES	16-60	Dionex AS10 y AS11; carbonato 10mM, pH=11; NaOH 10mM pH=11.8	agua de mar sintética	Harwood y col., 1997
Se ^{IV} , Se ^{VI} , SeCys ₂ , SeMet	DIN-ICP-AES	0.3-0.6	PAX-100; carbonato 20mM, pH=10	trébol CRM402	Emteborg y col., 1998
Se ^{IV} , Se ^{VI} , SeCys ₂ , SeMet	ICP-MS	0.07-0.11	IC AN-2; Salicilato 6mM-TRIS, pH=8.5, 3% MeOH	trébol CRM402	Alsln Pedersen y col., 1997
Se ^{IV} , Se ^{VI} , SeCys ₂ , SeMet, SeEt, TMSe ⁺ , Se-hCys ₂	ICP-MS	--	Supelcosil LC-SXC; Piridina 20mM- ácido fórmico, pH=5	--	Goessler y col., 1997
<i>fase inversa</i>					
SeCys ⁽³⁾	MS	--	C ₁₈ Bondapak; MeOH-agua	eritrocitos	Ganther y col., 1984
TMSe ⁺ , Se-colina ⁽³⁾	THG-AAS	44 y 31	Nucleosil-C ₁₈ ; MeOH	orina	Blais y col., 1991
SeMet ⁽³⁾	THG-AAS	17	Nucleosil-C ₁₈ ; MeOH	suplementos nutricionales	Matni y col., 1995
<i>fase inversa con formación de pares iónicos</i>					
SeCys, SeMet, SeCys ₂ ⁽³⁾	THG-AAS	1.0-1.1	Nucleosil-5NO ₂ ; MeOH/TEA/AcH	plantas	Lei y col., 1995

ESPECIES	DETECCIÓN	L.D.(ng Se)	COLUMNA; F.M.	MUESTRA	REFERENCIA
SeCys ₂ , SeMet, SeEt, Se ^{IV} , Se ^{VI}	ETAAS HG-AAS	2.5 0.5	Sphesisorb C ₁₈ ; DDAB 10 ⁻³ mM; acetato a pH=5 y 7.5; 0.5% MeOH	orina	Marchante-Gayón y col., 1996
SeCys ₂ , SeMet	ETAAS	1.0 y 0.8	Hamilton PRP-1; TEAB, 3-10% ACN	trébol CRM402	Potin-Gautier y col., 1993
Se _{inorg} , SeCys ₂ , SeMet	ETAAS	3.3-4.7	Hamilton PRP-1; HSNS, 1% ACN pH=2.4	levadura	Gilon y col., 1995
Se _{inorg} , SeMet, SeEt	MW-HG-AAS HG-ICP-AES HG-ICP-MS	0.5-0.8 2.2-4.1 0.02-0.07	Spherisorb C ₁₈ ; acetato 0.1M, pH=4.5	orina	González LaFuente y col., 1996
TMSe ⁺ , SeCys ₂ , SeMet	ICP-MS	0.02-0.06	Hamilton PRP-1; PSNS, 2% MeOH	levadura	Muñoz Olivas y col., 1996a
TMSe ⁺ , Se ^{IV} , Se ^{VI}	USN-ICP-MS	0.02-0.07	Hamilton PRP-1; TBAB, 3-10% MeOH	orina	Yang y col., 1995

4. BIBLIOGRAFÍA

Abou-Shakra, F.R.; Rayman, M.P.; Ward, N.I.; Hotton, V.; Bastian, G. (1997)

J. Anal. At. Spectrom., 12, 429.

Adkins, R.L.; Walsh, N.; Edmunds, M.; Trafford, J.M. (1995)

Analyst, 120, 1433.

Agterdenbos, J.; Van Noort, J.P.; Peters, F.F.; Bax, D.; Ter Heege, J.P. (1985)

Spectrochim. Acta, 40B, 501.

Agterdenbos, J.; Van Elteren, J.T.; Bax, D.; Ter Heege, J.P. (1986)

Spectrochim. Acta, 41B, 303.

**Ahmed, M.J.; Stalikas, C.D.; Veltsistas, P.G.; Tzouwara-Karayanni, S.M.;
Karayannis, M.I. (1997)**

Analyst, 122, 221.

Al-Attar, A.F.; Nickless, G. (1990)

Analyst, 115, 1441.

Alsing Pedersen, G.; Larsen, E.H. (1997)

Fresenius' J. Anal. Chem., 358, 591.

Anderson, K.A.; Isaacs, B. (1993)

J. AOAC International, 76, No4, 910.

Batley, G.E. (1986)

Anal. Chim. Acta, 187, 109.

Bird, S.M.; Uden, P.C.; Tyson, J.F.; Block, E.; Denoyer, E. (1997a)

J. Anal. At. Spectrom., 12, 785.

Bird, S.M.; Ge, H.; Uden, P.C.; Tyson, J.F.; Block, E.; Denoyer, E. (1997b)

J. Chromatogr., 789A, 349.

Blais, J.S.; Huyghues-Despointes, A.; Momplaisir, G.M.; Marshall, W.D. (1991)

J. Anal. At. Spectrom., 6, 225.

Blocky, A.J.; Hansen, G.T.; Opelanio-Buencamino, L.R.; Rack, E.P. (1985)

Anal. Chem., 57, 1937.

Brindle, I.D.; Lugowska, E. (1997)

Spectrochim. Acta, 52B, 163.

Broderick, D.J.; Beilstein, M.A.; Whanger, P.D. (1985)

Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 44, 1509.

Bryce, D.W.; Izquierdo, A.; Luque de Castro, M.D. (1995a)

Analyst, 120, 2171.

Bryce, D.W.; Izquierdo, A.; Luque de Castro, M.D. (1995b)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 1059.

Bye, R.; Engvik, L.; Lund, W. (1983)

Anal. Chem., 55, 2457.

Calle de la, M.B.; Ceulemans, M.; Witte, C.; Lobinski, R.; Adams, F.C. (1995)

Mikrochim. Acta, 120, 73.

Campanella, L.; Ferri, T.; Morabito, R.; Padetti, A.M. (1987)

Chim. Industrial (Milan), 69, 90.

Campanella, L., Ferri, T.; Morabito, R. (1989)

Analisis, 17, 507.

Carvalli, S.; Cardellicchio, N. (1995)

J. Chromatogr., 706A, 429.

Chasteen, T.G.; Silver, G.M.; Birks, J.W.; Fail, R. (1990)

Chromatographia, 30, 181.

Chau, Y.K.; Wong, P.T.S.; Goulden, P.D. (1975)

Anal. Chem., 47, 2279.

Cheam, V.; Agemian, H. (1980)

Anal. Chim. Acta., 113, 237.

Chris, C.Y.; Sadana, R.S. (1992)

Anal. Chim. Acta, 149,391.

Cobo, M.G.; Palacios, M.A.; Cámara, C. (1993)

Anal. Chim. Acta, 283, 286.

Cobo, M.G.; Palacios, M.A.; Cámara, C.; Reis, F. ; Queauviller, P. (1994)

Anal. Chim. Acta, 286, 371.

Cobo, M.G.; Palacios, M.A.; Chakraborti, D.; Queauviller, P.; Cámara, C. (1995)

Fresenius J. Anal. Chem., 351, 438.

Cooke, T.D.; Bruland, K.W. (1987)

Environ. Sci. Technol., 21, 1214.

Cutter, G.A., (1978)

Anal. Chim. Acta, 98, 59.

Cutter, G.A., (1982)

Science, 217, 829.

Cutter, G.A., (1985)

Anal. Chem., 57, 2951.

Cutter, G.A.; Bruland, K.W. (1984)

Limnol. Oceanogr., 29, 1179.

Dauchy, X.; Potin-Gautier, M.; Astruc, A.; Astruc, M. (1994)

Fresenius J. Ana. Chem., 348, 792.

Deaker, M.; Maher, W. (1995)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 423.

Ducros, V.; Ruffieux, D.; Belin, N.; Favier, A. (1994)

Analyst, 119, 1715.

D'Ulivo, A. (1989)

J. Anal. At. Spectrom., 4, 67.

D'Ulivo, A. (1997)

Analyst, 122, 117R.

D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Sfetsios, I.; Zamboni, R. (1993)

Spectrochim. Acta, 48B, 387.

D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Sfetsios, I.; Zamboni, R.; Forte, C. (1994)

Analyst, 119, 633.

D'Ulivo, A.; Papoff, P. (1986)

J. Anal. At. Spectrom., 1, 479.

El-Hallaq, Y.H.; Gökmen, L.G.; Aras, N.K.; Gökmen, A. (1992)

Analyst, 117, 447.

Emteborg, E.; Bordin, G.; Rodriguez, A.R. (1998)

Analyst, 123, 245.

EPA (United States Environmental Protection Agency) (1976)

Handbook for sampling and sample preservation of water and waste water, EPA-600/4-76-049 September, Washington DC.

Evans, C.S.; Johnson, C.M. (1966)

J. Chromatogr., 21, 202.

Ferri, T.; Sangiorgio, P. (1996)

Anal. Chim. Acta, 321, 185.

Ferri, T.; Rossi, S.; Sangiorgio, P. (1998)

Anal. Chim. Acta, 361, 113.

Fio, J.L.; Fujii, R. (1990)

Soil Sci. Soc. Am. J., 54, 363.

Fishbein, L. (1991)

Merian E. (ed.), *Metals and their compounds in the Environment*, pp 1153-1179. UHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Foster, S.J.; Kraus, R.J.; Ganther, H.E. (1986)

Arch. Biochem. Biophys., 251, 77.

Friel, J.K.; Skinner, C.S.; Jackson, S.E.; Longerich, H.P. (1990)

Analyst, 115, 269.

Gallus, S.M.; Heumann, K.G. (1996)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 887.

Ganther, H.E.; Kraus, R.J.; Foster, S.J. (1984)

Methods in Enzymol., 107, 582.

Gilon, N.; Astruc, A.; Astruc, M.; Potin-Gautier, M. (1995)

Appl. Organomet. Chem., 9, 623.

Gilon, N.; Potin-Gautier, M.; Astruc, M. (1996)

J. Chromatogr., 750A, 327.

Goessler, W.; Kuchnelt, D.; Schlagenhafen, C.; Kalcher, K.; Abegaz, M.; Irgolic, K.J. (1997)

J. Chromatogr., 789A, 233.

Gonzalez LaFuente, J.M.; Fernández Sanchez, M.L.; Sanz-Medel, A. (1996)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 1163.

Gui-bin, J.; Zhe-ming, N.; Li, Z.; Ang, L.; Heng-bin, H.; Xiao-quan, S. (1992)

J. Anal. At. Spectrom., 7, 447.

Hammel, C.; Kyriakopoulos, A; Rosick, U.; Behne, D. (1997)

Analyst, 122, 1359.

Han, H.B.; Kaiser, G.; Tölg, G. (1981)

Anal. Chim. Acta, 128, 9.

Haraldsson, C.; Pollak, M.; Öhman, P. (1992)

J. Anal. At. Spectrom., 7, 1183.

Harrison, R.M.; Rap Somaniks, S. (1989)

Ellis Horwood Limited, Publishers Chichester (Ed.), *Environmental Analysis using Chromatographic Interfaced with Atomic Spectrometry*, pp 318-341, New York.

Harwood, J.J.; Su, W. (1997)

J. Chromatogr., 788A, 105.

Haygarth, P.M.; Rowland, A.P.; Stürup, S.; Jones, K.C. (1993)

Analyst, 118, 1303.

He, Y.; Moreda-Piñeiro, J.; Cervera, M.L.; de la Guardia, M. (1998)

J. Anal. At. Spectrom., 13, 289.

Hershey, J.W.; Keliher, P.N. (1986)

Spectrochim. Acta, 41B, 713.

Hershey, J.W.; Keliher, P.N. (1989)

Spectrochim. Acta, 44B, 329.

Hill, S.J.; Bloxham, M.J.; Worsfold, P.J. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 499.

Howard, A.G.; Gray, M.R.; Waters, A.J.; Oromiehie, A.R. (1980)

Anal. Chim. Acta, 118,87.

Janghorbani, M.; Ting, B.T.G. (1989)

Anal. Chem., 61, 701.

Jiang, S.; De Jonghe, W.; Adams, F. (1982)

Anal. Chim. Acta, 136, 183.

Jiang, S.; Chakraborti, D.; Adams, F. (1987)

Anal. Chim. Acta, 196, 271.

Johannessen, J.K.; Gammelgaard, B.; Jons, O.; Hansen, S.H. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 999.

Johansson, K.; Örnemark, U.; Olin, A. (1993)

Anal. Chim. Acta, 274, 129.

Kamada, T.; Yamamoto, Y. (1980)

Talanta, 27, 473.

Karlson, U.; Frankenberger, W.T. (1988)

Soil Sci. Soc. Am. J., 52, 678.

Kobayashi, I. (1992)

Adv. Biophys., 28, 81.

Kölbl, G.; Kalcher, K.; Irgolic, K.J. (1993)

Anal. Chim. Acta, 284, 301.

Kölbl, G.; Lintschinger, J.; Kalcher, K.; Irgolic, K.J. (1995)

Mikrochimica Acta, 119, 113.

Laborda, F.; Chakraborti, D.; Mir, J.M.; Castillo, J.R. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 643.

Laborda, F.; Loos-Vollebregt, M.T.C.; Galan, L. (1991)

Spectrochim. Acta, 46B, 1089.

Lamleung, S.Y.; Cheng, V.K.W.; Lam, Y.W. (1991)

Analyst, 116, 957.

Lei, T.; Marshall, W.D. (1995)

Appl. Organomet. Chem., 9, 149.

Lemly, A.D. (1982)

Environ. Technol. Lett., 3, 497.

Lide, D.R.; Frederkse, H.P.R. (1997-1998)

CRC Handbook of Chemistry and Physics, Lide and Frederkse (Eds.), 78th ed., pp. 11.56-57, CRC Press, New York.

Lunzer, F.; Pereiro-García, R; Bordel-García, N.; Sanz-Medel, A. (1995)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 311.

Marchante-Gayón, J.M.; González, J.M.; Fernández, M.L.; Blanco, E.; Sanz-Medel, A. (1996)

Fresenius J. Anal. Chem., 355, 615.

Marshall, G.D.; Van Staden, J.F. (1990a)

J. Anal. At. Spectrom., 5, 675.

Marshall, G.D.; Van Staden, J.F. (1990b)

J. Anal. At. Spectrom., 5, 681.

Martin, J.L.; Gerlach, M.L. (1969)

Anal. Biochem., 29, 257.

Massèe, R.; Maessen, F.J.; Goeij, J.M (1981)

Anal. Chim. Acta, 127,181.

Matni, G.; Azani, R.; Van Calsteren, M.R.; Bissonnette, M.C.; Blais, J.S. (1995)

Analyst, 120, 395.

Mattsson, G.; Nyholm, L.; Olin, Å.; Örnemark, U. (1995)

Talanta, 42, 817.

Mayer, D.; Haubenwallners, S.; Kosmus, W.; Beyer, W. (1992)

Anal. Chim. Asta., 268, 315.

McCarthy, J.P.; Caruso, J.A.; Fricke, F.L. (1983)

J. Chromatogr. Sci., 21, 389.

Measures, C.L.; Burton, J.D. (1980)

Anal. Chim. Acta, 120, 177.

Muñoz Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Cámara, C.; Quevauviller, P. (1994)

Anal. Chim. Acta, 286, 357.

Muñoz Olivas, R.; Quéstel, C.R.; Donard, O.F.X. (1995)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 865.

Muñoz Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Gilon, N.; Potin-Gautier, M. (1996a)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 1171.

Muñoz Olivas, R.; Quéstel, C.R.; Donard, O.F.X. (1996b)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 865.

Muñoz Olivas, R.; Quevauviller, P.; Donard, O.F.X. (1998)

Fresenius J. Anal. Chem., 360, 512.

Nakata, F.; Yasui, Y.; Matsuo, H.; Kumamaru, T. (1985)

Anal. Sciences, 1, 417.

Nakaguchi, Y.; Hirachi, K.; Tamari, Y.; Fukunaga, Y.; Nihikawa, Y.; Shigematsu, T. (1985)

Anal. Sci., 1, 247.

N, Z.-m.; He, B.; Han, H.-b. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 995.

Niss, N.D.; Schabron, J.; Brown, T. (1993)

Environ. Sci. Technol., 27, 827.

Olsen, K.B.; Sklarew, D.S.; Evans, J.C. (1985)

Spectrochim. Acta, 40B, 357.

Örnemark, U.; Olin, Å. (1994)

Talanta, 41, 67.

Örnemark, U.; Pettersson, J.; Olin, Å. (1992)

Talanta, 39, 1089.

Oyamada, N.; Kikuchi, M.; Ishizaki, M. (1987)

Anal. Sci., 3, 373.

Pitts, L.; Fisher, A.; Worsfold, P.; Hill, S.J. (1995)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 519.

Pitts, L.; Worsfold, P.J.; Mill, S.J. (1994)

Analyst, 119, 2785.

Potin-Gautier, M.; Boucharat, C.; Astruc, A.; Astruc, M. (1993)

Appl. Organomet. Chem., 7, 593.

Powell, M.J.; Boomer, D.W.; McVicars, R.J. (1986)

Anal. Chem., 58, 2867.

Pyrzynska, K. (1996)

Analyst, 121, 77R.

Ramachandran, K.; Kaweshvar, R.; Grupta, V.K. (1993)

Talanta, 40, 781.

Raptis, S.E.; Kaiser, G.; Tölg, G. (1983)

Fresenius Z. Anal. Chem., 316:105-123.

Reamer, D.C.; Zoller, W.H. (1980)

Science, 208, 500.

Roden, D.R.; Tallman, D.E. (1982)

Anal. Chem., 54, 307.

Robberecht, H.; Van Grieken, R.E. (1980)

Anal. Chem., 52, 449.

Shepherd, L.; Huber, R.E. (1969)

Can. J. Biochem., 47, 877.

Singh, A.K.; White, T.; Arendt, T.; Jiang, Y. (1997)

J. Chromatog., 690B, 327.

Takayanagi, K.; Wong, G.T.F. (1984)

Marine Chemistry, 14, 141.

Takayanagi, K.; Cossa, D. (1985)

Geochim. Cosmochim. Acta, 49, 539.

Talmi, Y.; Andren, A.W. (1974)

Anal. Chem., 46, 2122.

Tan, Y.; Marshall, W.D. (1997)

Analyst, 122, 13.

Tanzer, D.; Heumann, K.W. (1990)

Atmos. Environ. Part. A, 24, 3099.

Tanzer, D.; Heumann, K.W. (1991)

Anal. Chem., 63, 1984.

Tanzer, D.; Heumann, K.W. (1992)

Int. J. Environ. Anal. Chem., 48, 17.

Tao, G.; Hansen, E.H. (1994)

Analyst, 119, 333.

Tao, H.; Lam, J.W.H.; McLaren, J.W. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 1067.

Tsalev, D.L.; Slaveykova, V.I.; Mandjukov, P.B. (1990)

Spectrochim. Acta Rev., 13, 225.

Uden, P.C.; Bird, S.M.; Kotrebai, M; Nolibos, P.; Tyson, J.F.; Block, E.; Denoyer, E. (1998)

Fresenius j. Anal. Chem., 362, 447.

Vela, N.P.; Caruso, J.A. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 787.

Velinsky, D.J.; Cutter, G.A. (1990)

Anal. Chim. Acta., 235, 419.

Welz, B.; Bosai, G.; Sperling, M.; Radziuk, B. (1992)

J. Anal. At. Spectrom., 7, 505.

Welz, B.; Melcher, M. (1984a)

Anal. Chim. Acta, 165, 131.

Welz, B.; Melcher, M. (1984b)

Analyst, 109, 569.

Wickstrom, T.; Lund, W. (1995)

J. Anal. At. Spectrom., 10, 803.

Wu, S.; Feng, X.; Wittmeier, A. (1997)

J. Anal. At. Spectrom., 12, 797.

Yamada, H.; Hattori, T. (1990)

Soil. Sci. Plant. Nutr., 36, 163.

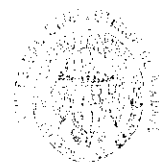
Yang, K-L.; Jiang, S-J. (1995)

Anal. Chim. Acta, 307, 109.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III

APARATOS, REACTIVOS Y PROCEDIMIENTOS



1. APARATOS Y MATERIAL

/// Espectrómetros de masas con plasma de acoplamiento inductivo, modelos:

- VG Eclipse (Fisons Instruments)
- VG PlasmaQuad 3 (PQ3) (Thermo Instruments)

En la Tabla 10 se indican los componentes instrumentales para ambos modelos de ICP-MS.

Tabla 10. Componentes instrumentales de los equipos ICP-MS utilizados.

Nebulizador	flujo concéntrico (Meinhard, de vidrio)
Cámara de expansión	doble paso (Scott)
Antorcha	tipo Fassel (13 cm)
Generador de rf	27.12 MHz
Cono muestreador	níquel, diámetro del orificio = 1.0 mm
Cono Skimmer	níquel, diámetro del orificio = 0.7 mm
Nº de lentes electrostáticas del sistema focalizador	3 (Eclipse) y 5 (PQ3)
Analizador de masas	cuadrupolo (4 barras de molibdeno)
Detector	multiplicador de electrones secundarios
Tratamiento de datos	ordenador IBM de 100 MHz sistema operativo OS2 programa PQ Vision 430

/// pH-metro modelo MicropH 2001 (Crison).

/// Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg (Sartorius).

/// Placa calefactora modelo Plactronic (P-Selecta).

/// Estufa de secado modelo Digitronic (P-Selecta).

- /// Frigorífico y congelador (Zanusi).

- /// Micropipetas de volumen variable y fijo (Biohit).

- /// Separador de fases gas-líquido de vidrio en forma de U, con sistema de refrigeración por recirculación de agua fría. Diseñado en el laboratorio de Química Analítica de la U.C.M.

- /// Bomba eléctrica para extracción a vacío modelo D-95 (Dinko)

- /// Bomba peristáltica (Gilson HP-4).

- /// Bomba de HPLC modelo CM4000 (Milton Roy).

- /// Válvula de inyección de seis vías para sistemas de flujo continuo (Omnifit), provista de bucles de inyección de 50, 100, 150 y 250 μL .

- /// Válvula de inyección de seis vías para HPLC con bucle de inyección de 100 μL (Milton Roy).

- /// Columnas analíticas (Phenomenex):
 - Spherisorb ODS/AMINO de 5 μm , 250 x 4.6 mm.
 - Hamilton PRP1 de 5 μm , 150 x 4.1 mm.
 - Spherisorb SAX de 5 μm , 250 x 4.6 mm.

- /// Papel de filtro, \varnothing 150 mm (Schleicher & Schuell, banda azul).

- /// Discos de nylon de 0.45 μm (Millipore).

- /// Tubos flexibles de Tygon (Gilson).

/// Cartuchos de extracción (500 mg C₁₈) Bond Elut (Varian).

/// Sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore).

/// Argón C-45 (Carburos Metálicos).

2. REACTIVOS Y MUESTRAS

2.1. DISOLUCIONES PATRÓN DE ESPECIES DE SELENIO

/// Disolución patrón de Se^{IV} de 1000 ± 5 mg/L, en medio HNO₃ 0.5 mol/L (Spectrosol). Empleado también, como disolución madre, en la preparación de calibrados de selenio total.

/// Disolución patrón de Se^{VI} de 1000 mg/L, preparada por disolución de 0.61040 g de seleniato sódico (Aldrich) en 250 mL de agua Milli-Q.

/// Disolución patrón de cloruro de trimetilselenonio de 1000 mg/L en Se, preparada por disolución de 0.50490 g de TMSeCl (sintetizado en el laboratorio según el método de Palmer y colaboradores de 1969*) en 250 mL de agua Milli-Q.

/// Disolución patrón de selenometionina de 1000 mg/L en Se, preparada por disolución de 0.62090 g de SeMet (Sygma) en 250 mL de agua Milli-Q.

/// Disolución patrón de selenocistina de 1000 mg/L en Se, preparada por disolución de 0.52890 g de SeCys₂ (Sygma) en 250 mL de HCl 0.36 mol/L.

/// Disolución patrón de selenoetionina de 1000 mg/L en Se, preparada por disolución de 0.66521 g de SeEt (Sygma) en 250 mL de agua Milli-Q.

* Palmer, I.S.; Fisher, D.D.; Halverson, A.W.; Olson, O.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 177, 336 (1969).

A partir de las disoluciones madre de 1000 mg/L se prepararon las disoluciones patrón intermedias de 10 mg/L, las cuales se conservaron en ausencia de luz y a 4 °C durante un periodo de tiempo no superior a tres meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente a partir de los patrones intermedios.

2.2. REACTIVOS

- ⚡ Disolución patrón de indio de 1000 ± 5 mg/L, en medio HNO_3 0.5 mol/L (Spectrosol), empleada como patrón interno tras la correspondiente dilución, en la realización de calibrados de selenio en ICP-MS.
- ⚡ Disolución de borohidruro sódico 0.5% (m/v), preparada por disolución del sólido (Aldrich) en agua Milli-Q y estabilizada con 0.1% (m/v) de hidróxido sódico (Merck). La disolución resultante se filtra para eliminar la turbidez y se conserva en nevera a 4 °C.
- ⚡ Ácido clorhídrico del 37% de riqueza (Carlo Erba, banda azul).
- ⚡ Ácido sulfúrico del 97% de riqueza (Carlo Erba, banda azul).
- ⚡ Ácido nítrico del 70% de riqueza (Merck).
- ⚡ Ácido perclórico del 65% de riqueza (Carlo Erba, banda roja).
- ⚡ Acetonitrilo, metanol y cloroformo de grado HPLC (Carlo Erba y Scharlau).
- ⚡ Para los estudios de interferencias se emplearon sales de Merck y disoluciones de metales para absorción atómica de Fisher.
- ⚡ Para el control y ajuste del instrumento se emplearon disoluciones patrón para ICP-MS, conteniendo 1000 mg/L de Be, Mg, Co, In, Bi, Ce y U (Spectrosol). La

preparación de las disoluciones de trabajo se realizó a través de la dilución adecuada en medio HNO_3 al 2% (v/v).

- /// Silicona anti-espumante (Merck).

- /// Disolución patrón de Litio de 1000 mg/L (Spectrosol), empleada tras la correspondiente dilución, para la determinación del volumen muerto en los acoplamientos HPLC-ICP-MS.

- /// Disoluciones de bromuro de tetraetilamonio de 1.0 mmol/L, preparada por disolución del sólido(Sigma) en agua Milli-Q.

- /// Disolución de 1-pentanosulfonato sódico de 1.0 mmol/L, preparada por disolución del sólido(Sigma) en agua Milli-Q.

- /// Ácido ortofosfórico 85% de riqueza (Carlo Erba), hidrógenofosfato disódico y dihidrógenofosfato sódico (Panreac).

- /// Disolución reguladora de fosfato 5 mmol/L a pH=2.7, preparada por mezcla de disoluciones de H_3PO_4 y NaH_2PO_4 de la misma concentración, hasta alcanzar el pH adecuado.

- /// Disoluciones reguladoras de fosfato 3.5 y 7 mmol/L a pH=6.0, preparadas por mezcla de las disoluciones de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 correspondientes, hasta alcanzar el pH adecuado.

- /// Disolución reguladora de fosfato 0.1 mol/L a pH=7.5, preparada por mezcla de las disoluciones de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 0.1 mol/L, hasta alcanzar el pH adecuado.

- /// Disolución de suero artificial, para ensayos de fuerza iónica, preparada por disolución de 3.5 g de NaCl, 1.5 g KCl, 2.5 g de NaHCO_3 y 20 g de glucosa (Merck) en 500 mL de agua Milli-Q.

⚡ Enzima Subtilisina, procedente de *bacillus subtilis*, actividad 30 mAnson-E/mg a pH=7.5 y 37 °C (Merck).

2.3. MUESTRAS

⚡ Agua certificada en selenio (Setpoint Laboratory Standars, A.P.G.) conteniendo 35.499 ± 5.134 µg/L.

⚡ Agua con valores de concentración recomendados en Se^{IV} y Se^{VI} (BCR CRM603) conteniendo 35 ± 2 y 45 ± 4 µg/L para cada especie respectivamente, en medio NaCl (20.0 g/L).

⚡ Agua con valores de concentración recomendados en Se^{IV} y Se^{VI} (BCR CRM602) conteniendo 5.8 ± 0.4 y 7.7 ± 0.7 µg/L para cada especie respectivamente, en medio NaCl (20.0 g/L).

⚡ Agua de grifo, recogida en los laboratorios de la Facultad de CC. Químicas (U.C.M.)

⚡ Suero sanguíneo liofilizado, Precinorm U (Boehringer Mannheim, Germany).

⚡ Muestra de mejillón liofilizada, certificada en selenio total (CRM. 278) conteniendo 1.66 ± 0.04 µg/g.

⚡ Muestras de atún y mejillón liofilizadas (B.C.R.), no certificadas en selenio con referencias: T22 Tuna (7), T22 Tuna (10), T30 Tuna, No 0426 Tuna, No 0724 Tuna (para las muestras de atún) y T15 Mussel, No 919 Mussel Tissue (para las muestras de mejillón).

3. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO TOTAL Y DE SUS ESPECIES

3.1. ICP-MS

En todos los experimentos realizados se procedió a la optimización de los parámetros operativos del ICP-MS. Para ello se empleó en primer lugar, una disolución patrón conteniendo Be, Mg, Co, In, Bi, Ce y U (25 µg/L para el modelo Eclipse y 10 µg/L para el modelo PQ3). La monitorización de varios elementos es necesaria para la optimización tanto de la sensibilidad del instrumento como de la resolución del cuadrupolo. A continuación, la sensibilidad del equipo se ajustó para la determinación particular de selenio, a través del chequeo de una disolución de este elemento (50 y 20 µg/L para los modelos Eclipse y PQ3 respectivamente). Las condiciones óptimas de operación en el análisis de selenio por ICP-MS se encuentran reflejadas en la Tabla 11, situada al final de este capítulo.

3.1.1. Introducción de muestra por nebulización continua

Las disoluciones conteniendo el analito se nebulizaron durante al menos 2 minutos, para asegurar la estabilidad de la señal con el tiempo. En el estudio de interferencias, este tiempo fue aumentado a 10 minutos, con el fin de evitar posibles errores provocados por la obturación del sistema. Durante el estudio de interferencias, las lecturas de analito obtenidas en presencia del elemento matriz fueron comparadas continuamente con la señal de selenio en ausencia de concomitantes, controlando de este modo las posibles pérdidas de sensibilidad. Además, se procedió al chequeo continuo de la disolución blanco [HNO₃ 2%(v/v)], con el fin de asegurar posibles efectos memoria.

3.1.2. Introducción de muestra por inyección en flujo

Para llevar a cabo la introducción de muestra por inyección en flujo, es suficiente insertar una válvula de inyección (válvula rotatoria hexagonal) entre la bomba

peristáltica y el nebulizador del ICP-MS. En el sistema de inyección en flujo se eligió un volumen de inyección de 100 μL y una longitud del tubo de conexión, entre la válvula de inyección y el nebulizador, de 40 cm (0.5 mm de diámetro interno). Las señales transitorias obtenidas se evaluaron en términos de área de pico.

En ambos métodos de introducción de muestra se realizaron calibrados a relación m/z 77, 78 y 82, con un intervalo de concentraciones entre 5 y 250 $\mu\text{g/L}$ para el modelo Eclipse y entre 0.5 y 50 $\mu\text{g/L}$ para el modelo PQ3.

3.2. HG-ICP-MS

3.2.1. Generación del hidruro en continuo

El acoplamiento del sistema de generación de hidruros (Figura 9, superior) se realizó por conexión de la línea de argón de nebulización al separador de fases gas-líquido y unión de este separador al canal central de la antorcha, a través de un tubo de goma.

Las disoluciones de la muestra ácida [en medio HCl 0.6 mol/L] y del reductor [NaBH_4 0.5% (m/v)] son impulsadas por la bomba peristáltica a un caudal de 3.5 y 1.7 mL/min respectivamente. La muestra ácida y la disolución de reductor confluyen en la cámara de mezcla o reactor, produciéndose la reacción de generación del hidruro. Los productos de la reacción son conducidos hasta el separador gas-líquido en forma de U, produciéndose la decantación de la fase líquida hacia el desecho, mientras que los gases son transportados por una corriente de gas argón (1.0 L/min) hacia la antorcha del ICP. Los análisis se realizaron bajo las condiciones de operación reflejadas en la Tabla 11.

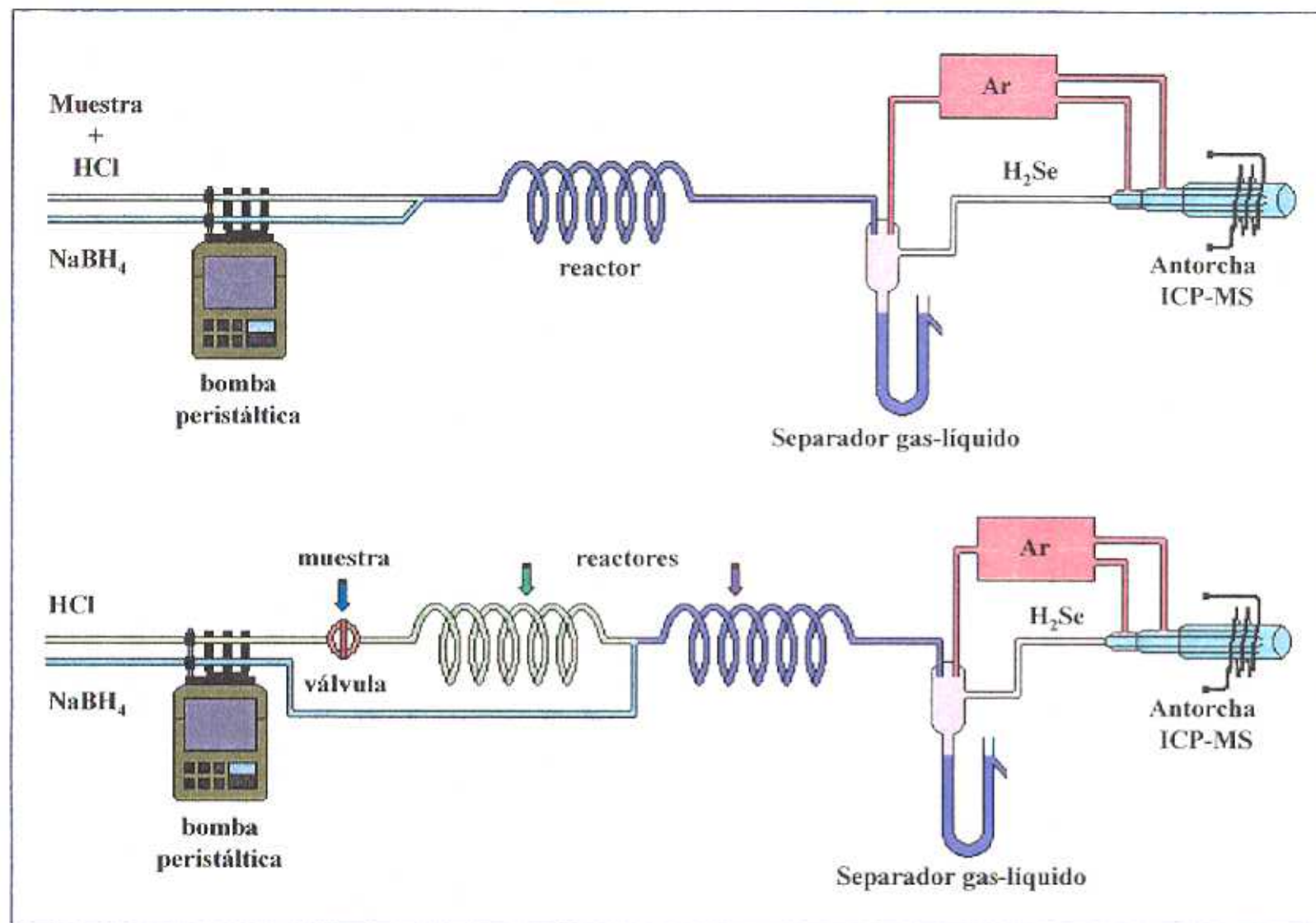


Figura 9. Esquemas de acoplamiento del sistema de generación de hidruros, en continuo (figura superior) y con inyección en flujo (figura inferior), al ICP-MS.

3.2.2. Generación del hidruro con inyección en flujo

En el método por inyección en flujo (Figura 9 inferior) se inyecta un volumen de muestra (100 μL), con la ayuda de la válvula de inyección, en el caudal de la disolución de ácido mezclándose en el primer reactor. Seguidamente, la muestra ácida se hace confluir con la disolución de reductor en la segunda cámara de mezcla, produciéndose el hidruro de selenio, que al igual que en el método en continuo se separa de la fase líquida y se transporta a la antorcha a través de una corriente de argón.

El calibrado se realizó, en ambos procedimientos, entre 0.05 y 10.0 $\mu\text{g/L}$ de Se, a las relaciones m/z 77, 78 y 82.

3.2.3. Preparación de muestras

a) *Tratamiento de muestras de agua para el análisis de selenio inorgánico por generación de hidruros*

Las muestras de agua fueron acidificadas en medio ácido clorhídrico 4.5 mol/L (3 mL de HCl concentrado por cada 5 mL de muestra) y calentadas a 100 °C durante quince minutos, de esta forma los seleniatos se reducen a selenitos permitiendo la determinación del selenio inorgánico total. El proceso se realizó en vasos de precipitado de vidrio Pyrex de 25 mL tapados con vidrios de reloj, sobre placa calefactora. Las muestras se dejaron enfriar y fueron transferidas a matraces aforados de 10 mL, enrasándose con agua Milli-Q. Las muestras se analizaron por HG-ICP-MS en continuo y con inyección en flujo, según el esquema de la Figura 9.

La determinación de Se^{IV} se llevó a cabo sin tratamiento previo de las muestras, bajo las condiciones de operación indicadas en la Tabla 11. En el análisis de la muestra de agua de grifo, fue necesario aumentar la concentración clorhídrica hasta 2 mol/L para eliminar las interferencias procedentes de metales de transición, evitando así el empleo del método de adiciones estándar.

La determinación de Se^{VI} en las muestras se llevó a cabo por diferencia entre la concentración de selenio inorgánico total y la concentración de Se^{IV} .

b) Preparación de muestras de suero para el análisis de selenio total e inorgánico por generación de hidruros

En primer lugar, las muestras de suero liofilizado (Precinorm U) fueron reconstituidas con 5 mL de agua Milli-Q.

La determinación de selenio total se realizó por adición 2 mL de una mezcla $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$, en proporción 3:1:1, a 2.5 mL de muestra. La mineralización se realizó en reactores a presión, mantenidos a 120 °C en estufa durante toda la noche. Para la reducción de Se^{VI} a Se^{IV} , se procedió como en las muestras de agua, aumentando el volumen de ácido clorhídrico concentrado (10 mL) y el tiempo de digestión (30 min), debido a la presencia de ácidos oxidantes. Las muestras se dejaron enfriar y fueron transferidas a matraces aforados de 25 mL, enrasándose con agua destilada Milli-Q.

El análisis del Se^{IV} presente en la muestra de suero, se realizó por simple dilución de 1 mL de muestra, no sometida a mineralización, en un factor de 100. Mientras que la determinación del selenio inorgánico total se realizó a través de la previa reducción del Se^{VI} con HCl concentrado, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para las muestras de agua. La adición de 2 gotas de silicona líquida fue necesaria para evitar la formación de espumas en la reacción de generación del hidruro.

Las muestras se analizaron por HG-ICP-MS en continuo y empleando el método de inyección en flujo, según el esquema de la Figura 9. La determinación de selenio total se realizó mediante calibración convencional, mientras que fue necesario el empleo del método de adiciones estándar en los análisis de Se^{IV} y de selenio inorgánico total.

Los análisis realizados sobre la muestra de suero permitieron la diferenciación entre Se^{IV} , Se^{VI} (por diferencia entre la concentración de selenio inorgánico total y la

concentración de Se^{IV}) y selenio orgánico total (por diferencia entre las concentraciones de selenio total y de selenio inorgánico total).

3.3. HPLC-ICP-MS

La separación cromatográfica de TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} se realizó por inyección de una disolución conteniendo las seis especies en la columna analítica (Spherisorb 5 ODS-AMINO), empleando inicialmente una disolución reguladora de fosfato 3.5 mmol/L a pH=6, como fase móvil, a un caudal de 1.00 mL/min. Después de cinco minutos se cambia de eluyente, a una disolución de fosfato de mayor concentración (7.0 mmol/L) a pH=6, empleando un gradiente lineal de un minuto de duración. El procedimiento finaliza cuando se ha producido la elución de todas las especies (30 minutos), registrándose el cromatograma.

La separación cromatográfica de TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet y SeEt se realizó en modo isocrático empleando una disolución reguladora de fosfato 5 mmol/L a pH=2.8, con un flujo de elución de 1.00 mL/min. El cromatograma se registra durante 10 minutos, habiendo eluido las cuatro especies de la columna analítica.

El acoplamiento HPLC-ICP-MS se realizó por conexión entre la salida de la columna analítica y el nebulizador a través de un tubo capilar de PTFE de 20 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno.

En ambos procedimientos cromatográficos se realizaron calibrados de selenio para cada una de las especies, a relaciones m/z 78 y 82, en el intervalo de concentraciones de 5.0 a 200 $\mu\text{g/L}$ de Se (VG Eclipse) y de 0.5 a 20.0 $\mu\text{g/L}$ de Se (VG PQ3).

3.3.1. Preparación de muestras

3.3.1.1. Tratamiento de muestras de orina

Las muestras de orina humana (4 mL) se filtraron (con la ayuda de un sistema de vacío) a través de cartuchos Bond Elut C₁₈, previamente acondicionados con 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de agua Milli-Q. A continuación se procedió al lavado de los mismos con 5 mL de tampón fosfato 3.5 mmol/L a pH=6. El filtrado se recogió en matraces aforados de 10 mL que fueron enrasados con agua Milli-Q. Este método de preparación de muestra se ha representado en la Figura 10.

La determinación del selenio total presente en las muestras se realizó mediante inyección en flujo en el ICP-MS, mientras que la determinación de las especies se llevó a cabo a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS, empleando el método cromatográfico a pH=6 (descrito en el apartado 3.3). En ambos casos, las muestras se analizaron bajo calibración convencional, registrándose la señal de los isótopos ⁷⁸Se y ⁸²Se, en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 20 µg/L de selenio.

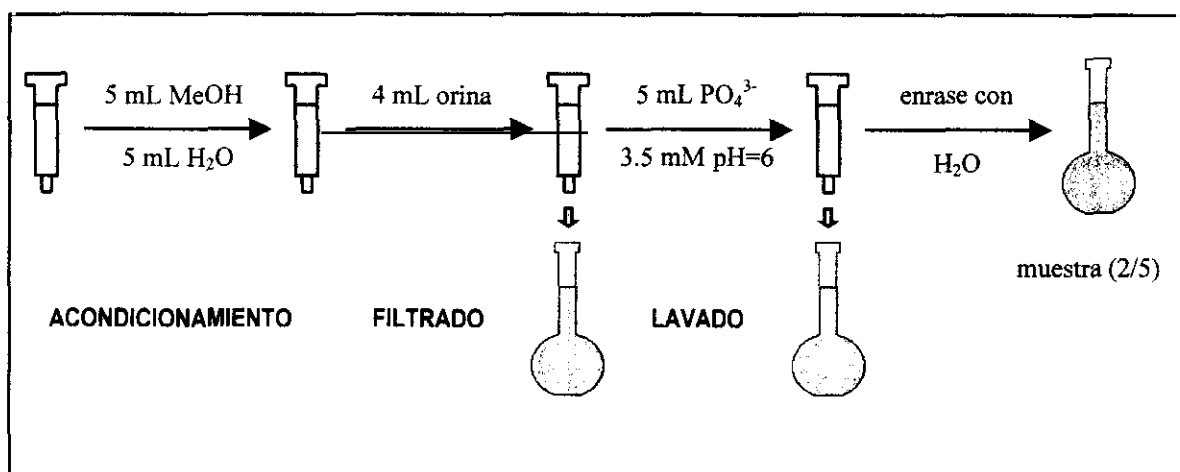


Figura 10. Esquema de preparación de muestras de orina.

3.3.1.2. *Preparación de muestras de atún y mejillón*

a) *Determinación de selenio total*

Se pesaron aproximadamente 250 mg de muestra de pescado o molusco liofilizado, con una precisión de ± 0.01 mg, y se adicionaron 2 mL de la mezcla $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$ en proporción 3:1:1. La mineralización se llevó a cabo en reactores a presión, mantenidos a 120 °C en estufa durante toda la noche. El producto de la digestión se transfirió a matraces aforados de 25 mL y se adicionaron 0.5 μg de indio como patrón interno, finalmente las muestras se enrasaron con agua Milli-Q. El análisis se realizó por nebulización continua en el ICP-MS a relaciones $m/z=78$ y 82, y mediante calibración convencional entre 5.0 y 100 $\mu\text{g/L}$ de selenio, con 20 $\mu\text{g/L}$ de In como patrón interno.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la determinación de selenio total en los extractos líquidos, procedentes de muestras de atún y mejillón sometidas a hidrólisis enzimática.

b) *Determinación de especies de selenio*

Para la determinación de especies de selenio en muestras de pescado se ensayaron procesos de hidrólisis tanto ácida como enzimática. La necesidad de obtención de un extracto limpio, requiere de la previa eliminación de las grasas presentes en las muestras.

EXTRACCIÓN DE GRASAS

Se pesaron entre 200 y 250 mg de muestra de pescado o molusco, con una precisión de ± 0.01 mg, sobre éstas se realizó la extracción de las grasas, en tubos de centrifuga, a través del siguiente procedimiento:

- Primera extracción con 6 mL de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}$ (2:1) con agitación por ultrasonidos durante 5 minutos.
- Segunda extracción con 6 mL de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}$ (1:2) con agitación por ultrasonidos durante 5 minutos.

La fase líquida se desechó y se realizó a la determinación del selenio total presente en el sólido, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, comprobándose la ausencia de pérdidas de selenio durante el proceso de extracción de las grasas.

HIDRÓLISIS ÁCIDA

La muestra de pescado sólida, tras la extracción de las grasas, se sometió a hidrólisis ácida por adición de 5 mL de HCl 3N. El proceso de calefacción se realizó a 70 °C durante 1 hora en bloque de aluminio. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 μm y el extracto líquido se neutralizó con NH_3 , enrasándose finalmente a 10 mL con agua Milli-Q.

Los extractos fueron analizados por HPLC-ICP-MS a relaciones m/z 78 y 82, empleando el método cromatográfico a $\text{pH}=6$ (descrito en el apartado 3.3.), mediante la calibración por adiciones estándar, entre 0 y 30 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Las muestras de atún o mejillón, tras la extracción de grasas, se sometieron al proceso de hidrólisis enzimática en dos etapas: en primer lugar, se llevó a cabo la adición de 20 a 25 mg de subtilisina (10% (m/m) respecto al peso de muestra) y 5 mL de tampón fosfato 0.1 mol/L a $\text{pH}=7.5$, con calentamiento en estufa a 37 °C durante 24 horas. La segunda etapa se realizó por adición de una nueva cantidad de enzima (igual a la empleada en la primera etapa) y de nuevo calentamiento a 37 °C durante 24 horas.

Seguidamente se procedió al filtrado de las muestras a través de cartuchos de C₁₈, acondicionados y lavados según el procedimiento descrito para las muestras de orina en el apartado 3.3.1.1., igualmente, las disoluciones filtradas se recogieron en matraces aforados de 10 mL y se enrasaron con agua Milli-Q.

La determinación de especies de selenio contenido en los extractos, se llevó a cabo a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS, registrando la señal de selenio a relación m/z 78 y 82. La ausencia de especies inorgánicas de selenio en las muestras, permitió el análisis a través del método cromatográfico a pH=2.7, descrito en el apartado 3.3. anterior. Las muestras fueron analizadas interpolando la señal obtenida en un calibrado convencional preparado entre 0.5 y 20 µg/L de selenio por especie.

Tabla 11. Condiciones instrumentales para el análisis de selenio por ICP-MS.

Parámetros comunes (CN, FI y HG)	
Potencia de rf aplicada	1350 W
Potencia de rf reflejada	2.2 W
Caudal de Ar de enfriamiento	14.0 L/min
Caudal de Ar auxiliar	0.9 L/min
Caudal de Ar de nebulización	1.0 L/min
Posición de la antorcha ⁽¹⁾	4 mm
Presión en la zona de expansión	1.95 mbar
Presión en la zona del analizador	7.7×10^{-7} mbar
Temperatura de la cámara de expansión	8 °C
Parámetros específicos de operación en CN	
Caudal de entrada de muestra al nebulizador	0.7 mL/min
Modo de adquisición de datos	Salto de pico
Tiempo de integración	0.5 s
Puntos por pico	3
Parámetros específicos de operación en HG	
Concentración de NaBH ₄	0.5% m/v
Caudal de bombeo de la disolución de NaBH ₄	1.7 mL/min
Concentración de HCl	0.6 mol/L
Caudal de bombeo de la disolución de HCl	3.5 mL/min
Parámetros específicos de operación en FI y HPLC	
Caudal de entrada al nebulizador ⁽²⁾	1.0 mL/min
Volumen de inyección	100 µL
Modo de adquisición de datos	S.I.M. ⁽³⁾
Tiempo de integración	2.5 s
Puntos por pico	499
Parámetros específicos de operación en HPLC	
Columna analítica	Spherisorb ODS/NH ₂
Fases móviles (disolución tampón de fosfato)	5.0 mmol/L (pH=2.7) 3.5 mmol/L (pH=6.0) 7.0 mmol/L (pH=6.0)

⁽¹⁾ Posición respecto a la primera espira del coil del generador de rf.

⁽²⁾ Referido al caudal de la disolución portadora para el método FI y de la fase móvil para el procedimiento por HPLC.

⁽³⁾ Monitorización simple de un sólo ion.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE SELENIO POR ICP-MS

1. ESTUDIOS PRELIMINARES

La técnica de ICP-MS proporciona una elevada sensibilidad en la determinación de la mayoría de elementos del Sistema Periódico, sin embargo el análisis de selenio presenta una serie de problemas. En primer lugar, debido a su elevado potencial de ionización (9.752 eV) el selenio sólo se ioniza en un 33% en un plasma de argón, mientras que la mayoría de elementos se ionizan en un 90% [Jarvis y col., 1992; Stroh y col., 1993; Tao y col., 1993] y por otro lado, su isótopo más abundante, ^{80}Se , sufre severas interferencias espectrales originadas por la formación de dímeros de argón [Pretty y col., 1993; Heitkemper y col., 1990] y esto obliga a la elección de isótopos de menor abundancia relativa, con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

Las prestaciones analíticas de la técnica de ICP-MS se ven fuertemente influenciadas por el sistema de introducción de las muestras en el plasma. La selección del mejor procedimiento de introducción de muestras dependerá de su estado físico (sólido, líquido o gas), de la matriz que acompaña al analito (interferencias que produce, contenido salino), de la cantidad de muestra disponible y del posible deterioro que pueda producir sobre el instrumento (contenido ácido, salino...)

El sistema más empleado para la introducción de muestras líquidas en la técnica de ICP-MS es la nebulización continua, pero existen otros sistemas alternativos entre los que podemos distinguir:

- Aquellos que se emplean para reducir el nivel de interferencias o aumentar la información sobre la muestra en conjunción con el sistema de nebulización convencional, tales como la inyección en flujo (FI) y la cromatografía líquida (generalmente HPLC).
- Los que reemplazan al sistema de nebulización, mejorando la eficiencia de transporte de la muestra y por lo tanto rebajando los límites de detección, como la vaporización electrotérmica (ETV), la generación de hidruros o vapor frío (HG), la cromatografía de gases (GC) y la ablación con láser (LA).

Dentro de los sistemas de nebulización de muestras líquidas, el método convencional es la nebulización neumática. En el desarrollo del presente trabajo se empleó un nebulizador de flujo concéntrico (Meinhard) junto con una cámara de expansión de doble paso (Scott). Con este sistema, la eficiencia de transporte de la muestra al plasma es tan sólo del 1 al 2%.

1.1. DETERMINACIÓN DE SELENIO POR NEBULIZACIÓN CONTINUA

La determinación de selenio por ICP-MS se llevó a cabo mediante monitorización de varios isótopos de selenio. En la elección de éstos se consideró tanto la abundancia natural como la presencia de un menor número de interferencias espectrales. En función de estas propiedades se eligieron tres isótopos: ^{77}Se , ^{78}Se y ^{82}Se .

El trabajo experimental presentado en esta tesis se ha realizado con dos modelos diferentes de ICP-MS: Eclipse (VG, Fisons Instruments) y PQ3 (VG, Thermo Instruments). En algunos casos se realizó la duplicación de experimentos, sin embargo la disponibilidad de ambos instrumentos no fue simultánea por lo que algunos estudios se desarrollaron con un sólo equipo.

1.1.1. Optimización de parámetros instrumentales

El análisis a través de la técnica de ICP-MS requiere de una exhaustiva optimización de parámetros instrumentales. En la presente sección se estudia la influencia de los parámetros instrumentales más críticos en la sensibilidad de la determinación de selenio por ICP-MS, como son el caudal del gas de nebulización y la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma.

Caudal del gas de nebulización

El caudal del gas de nebulización se considera el parámetro instrumental más crítico en la sensibilidad de la técnica, por ello se ha evaluado su influencia sobre la relación señal/ruido para los tres isótopos de selenio más comúnmente empleados en el

análisis por ICP-MS con plasma de argón (^{77}Se , ^{78}Se y ^{82}Se), considerando el ruido como la desviación típica de cinco medidas del blanco.

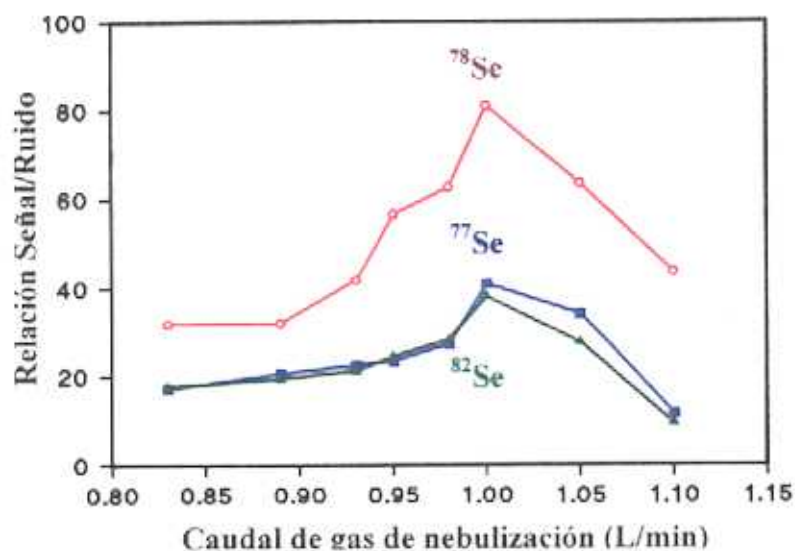


Figura 11. Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (Eclipse) para 50 µg/L de selenio, en función del caudal de gas de nebulización.

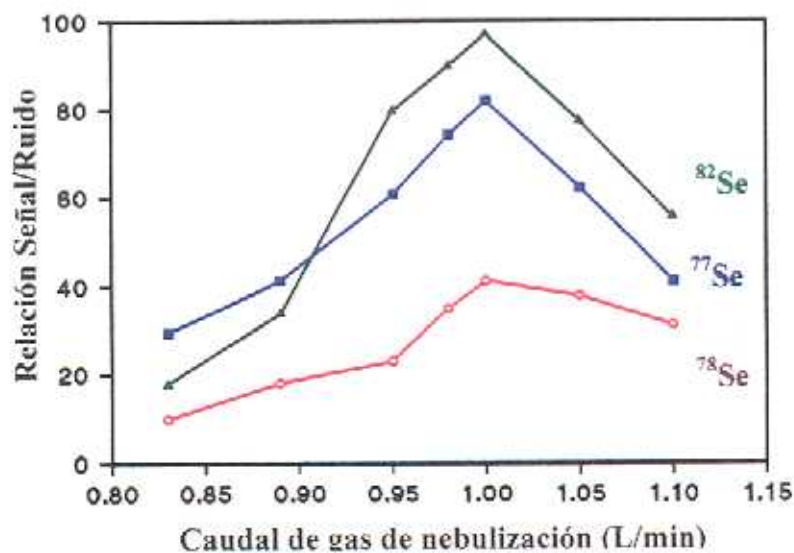


Figura 12. Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (PQ3) para 10 µg/L de selenio, en función del caudal de gas de nebulización.

Las Figuras 11 y 12 muestran los resultados obtenidos en el estudio de este parámetro con los modelos Eclipse y PQ3 respectivamente. Para todos los isótopos de selenio estudiados, la mejor relación señal/ruido se produce a un caudal de argón de nebulización de 1.00 L/min, coincidiendo para ambos modelos de ICP-MS. Sin embargo, los resultados muestran diferencias en cuanto a la elección del mejor isótopo de selenio en función del instrumento empleado, resultando una mejor relación señal/ruido para el isótopo ^{78}Se en el modelo Eclipse, mientras que esta relación es superior para el isótopo ^{82}Se con el modelo PQ3.

Potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma

Ambos modelos de ICP-MS disponen de un generador de radiofrecuencia de 27.12 MHz, sin embargo, por condicionamientos instrumentales, en el modelo Eclipse sólo es posible trabajar a dos valores predeterminados de potencia de entrada 1150 y 1350W, mientras que en el modelo PQ3 es posible variar dicha potencia. La Figura 13 muestra la influencia de la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma sobre la relación señal/ruido de los isótopos de selenio. El estudio fue realizado en el modelo PQ3, manteniendo constantes el resto de parámetros instrumentales.

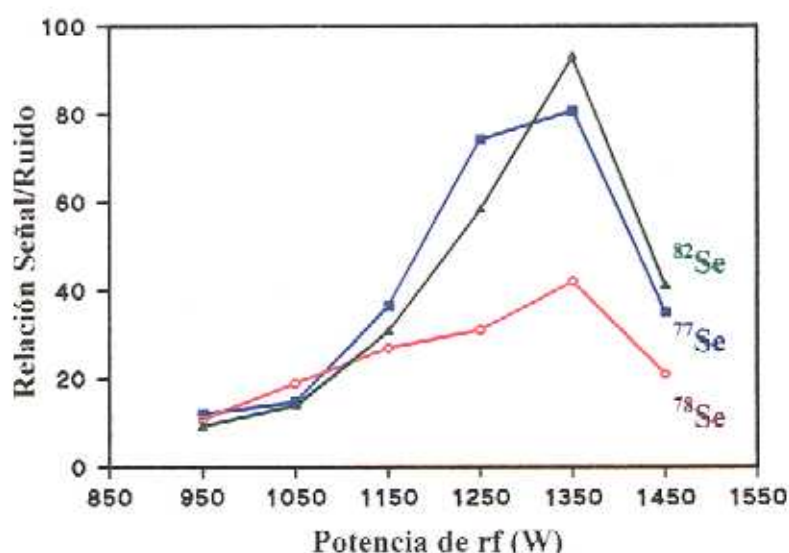


Figura 13. Relación señal/ruido obtenida en ICP-MS (modelo PQ3) para 10 $\mu\text{g/L}$ de Se en función de la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma.

En principio, un valor de potencia de radiofrecuencia de entrada de 1150 W es suficiente para la ionización de la mayoría de los elementos, sin embargo en el caso del selenio la ionización puede mejorar superando este valor debido a su elevado primer potencial de ionización. De los estudios realizados se observa que la potencia de radiofrecuencia de entrada óptima es 1350W, ya que a este valor se alcanza la mejor relación señal/ruido para los tres isótopos de selenio ensayados. En el modelo Eclipse no se encontraron diferencias significativas con el empleo de los dos valores de potencia de radiofrecuencia disponibles.

1.1.2. Características Analíticas

Las características analíticas para la determinación de selenio en ambos modelos de ICP-MS (bajo las condiciones de óptimas de operación indicadas en la Tabla 11), así como los datos de calibración, se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos de calibración y características analíticas para la determinación de selenio por ICP-MS con introducción de muestra por nebulización continua.

Modelo		Ecuación de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	L.D. ($\mu\text{g/L}$)	%RSD*
<i>Eclipse</i>	⁷⁷ Se	$y = (0 \pm 1) \times 10^3 + (51 \pm 1) \times 10^1 c$	0.99992	2.2	1.8
	⁷⁸ Se	$y = (1 \pm 2) \times 10^3 + (166 \pm 2) \times 10^1 c$	0.99996	1.5	1.4
	⁸² Se	$y = (0 \pm 1) \times 10^3 + (59 \pm 1) \times 10^1 c$	0.99992	2.0	1.7
<i>PQ3</i>	⁷⁷ Se	$y = (1 \pm 1) \times 10^2 + (532 \pm 6) c$	0.99992	0.1	0.5
	⁷⁸ Se	$y = (6 \pm 5) \times 10^2 + (168 \pm 3) \times 10^1 c$	0.99990	0.9	1.1
	⁸² Se	$y = (1 \pm 1) \times 10^2 + (658 \pm 6) c$	0.99992	0.1	0.4

"c" es la concentración de Se en $\mu\text{g/L}$ e "y" es la señal en cps (lectura con substracción del blanco).

* Calculada para una concentración de 25 $\mu\text{g/L}$ en el modelo *Eclipse* y 5.0 $\mu\text{g/L}$ en el modelo *PQ3* (n=5).

Los límites de detección (L.D.) fueron calculados siguiendo las normas de la IUPAC [Long y Winefordner, 1983], como tres veces la desviación típica de diez medidas del blanco. La precisión expresada como el porcentaje de desviación típica relativa (%RSD) fue evaluada a partir de cinco medidas de una disolución patrón de selenio conteniendo 25 µg/L para el modelo Eclipse y 5µg/L para el modelo PQ3.

Los resultados obtenidos para la determinación de selenio por ICP-MS, demuestran la existencia de diferencias importantes entre ambos modelos. En primer lugar, los límites de detección para los tres isótopos mejoran de forma considerable con el modelo PQ3. Por otro lado, el análisis isotópico muestra que el menor L.D. lo presenta el isótopo ^{78}Se con el modelo Eclipse, mientras que sucede todo lo contrario con el modelo PQ3. Estas diferencias pueden explicarse a partir de los datos experimentales indicados en la Tabla 13 donde se muestra la señal correspondiente al blanco y a una disolución conteniendo 25 µg/L de selenio en ambos modelos de ICP-MS.

Tabla 13. Señal analítica (media \pm desviación típica) para las tres relaciones m/z de selenio estudiadas en ambos modelos de ICP-MS.

Modelo	disolución	Señal en cps (n=3)		
		^{77}Se	^{78}Se	^{82}Se
<i>Eclipse</i>	HNO ₃ 2% v/v	$(228 \pm 5) \times 10^2$	$(41 \pm 1) \times 10^3$	$(260 \pm 6) \times 10^2$
	25 µg/L de Se*	$(357 \pm 6) \times 10^2$	$(82 \pm 1) \times 10^3$	$(412 \pm 7) \times 10^2$
	Relación s/n**	26	41	25
<i>PQ3</i>	HNO ₃ 2% v/v	$(123 \pm 6) \times 10^1$	$(190 \pm 5) \times 10^2$	$(165 \pm 8) \times 10^1$
	25 µg/L de Se*	$(129 \pm 1) \times 10^2$	$(578 \pm 4) \times 10^2$	$(182 \pm 2) \times 10^2$
	Relación s/n**	194	78	207

* Lectura sin substracción del blanco.

** Calculada como la señal de selenio, para 25 µg/L, menos la señal del blanco y dividida por la desviación típica del fondo.

En la Tabla 13 se observa una considerable reducción en la lectura del blanco en el modelo PQ3, lo que se traduce en una mejora de los límites de detección, sin embargo esta reducción de la señal de fondo se produce para las tres relaciones m/z estudiadas, lo que no explica las diferencias encontradas en el análisis isotópico.

La señal analítica obtenida para un isótopo de un elemento es proporcional a su abundancia relativa, según este principio, la mayor abundancia del isótopo ^{78}Se proporcionaría la mejor sensibilidad. Sin embargo, la relación señal/ruido depende también de la lectura de fondo registrada en la detección y por lo tanto del ruido.

En ambos modelos de ICP-MS, se observa una mayor señal de fondo a relación $m/z=78$ frente a la obtenida a las relaciones 77 y 82, esto es debido a la presencia de interferencias espectrales por especies poliatómicas del argón. En el modelo Eclipse las señales de fondo para las tres relaciones m/z resultan ser del mismo orden numérico (decenas de millar), por lo que la relación señal/ruido se ve significativamente afectada por la mayor abundancia relativa del isótopo ^{78}Se , otorgando a éste la mejor relación y por lo tanto el menor límite de detección. Sin embargo, en el modelo PQ3 se observa una marcada diferencia numérica entre las señales de fondo para las tres relaciones m/z (decena de millar para $m/z=78$ y millar para 77 y 82), por lo que la mayor abundancia isotópica del ^{78}Se se ve contrarrestada por el elevado nivel de fondo, mejorando la relación señal/ruido para los isótopos ^{77}Se y ^{82}Se .

La diferencia en las características de la determinación de selenio entre ambos modelos de ICP-MS, procede de diferencias en la instrumentación. La Tabla 10, presentada en el Capítulo anterior, muestra los componentes instrumentales de ambos modelos observándose una marcada diferencia en el sistema focalizador, el cual tiene gran influencia sobre la señal del fondo y consecuentemente sobre el ruido de la detección. En ambos instrumentos el sistema de detección empleado fue un multiplicador de electrones secundarios, que se coloca en el "eje óptico" del espectrómetro, lo que le hace susceptible de ser alcanzado por partículas no deseadas que incrementan el nivel de fondo [Esteban, 1993]. El sistema focalizador del modelo PQ3 posee dos lentes electrostáticas más que el modelo Eclipse, mejorando tanto la

focalización de iones hacia el espectrómetro de masas como la desfocalización de partículas no deseadas, las cuales al ser desviadas son extraídas más eficazmente por el sistema de vacío con la consiguiente reducción en la señal de fondo.

1.2. DETERMINACIÓN DE SELENIO POR INYECCIÓN EN FLUJO

La introducción de muestras en el ICP-MS mediante un sistema de inyección en flujo (FI) conduce a una mayor tolerancia hacia la introducción de muestras de elevado contenido ácido y salino. Evidentemente, al inyectar un pequeño volumen de muestra, se reducen los problemas derivados de la obturación del sistema (nebulizador y conos) y deterioro de la instrumentación. En previsión del análisis de muestras de matriz compleja, se procedió a la optimización del acoplamiento FI-ICP-MS para la determinación de selenio.

En su configuración original (nebulización continua), la técnica de ICP-MS proporciona señales (cps) adquiridas en función de la relación m/z , mientras que la inyección en flujo se caracteriza por la obtención de señales transitorias en el tiempo. En el acoplamiento, la adquisición de datos puede realizarse de ambas formas:

- ▣ En función de la *relación m/z* : esta modalidad nos permite la determinación multielemental e isotópica de la muestra, sin embargo, el tiempo de detección debe ser repartido entre los isótopos seleccionados, proporcionando menor sensibilidad en el análisis.

- ▣ En función del *tiempo*: bajo esta modalidad se mejora la sensibilidad en la determinación, aunque el análisis debe realizarse a una única relación masa/carga.

En el trabajo desarrollado, se empleó la adquisición de datos en función del tiempo, por lo que fue necesario realizar determinaciones independientes para los tres isótopos de selenio estudiados.

1.2.1. Optimización de parámetros instrumentales

Un parámetro a considerar en el sistema de inyección en flujo es la dispersión de la muestra en el seno de la solución portadora; lo que se traduce en un efecto de dilución. La dispersión puede ser controlada a través del volumen de muestra inyectado y la longitud del camino que recorre la muestra, es decir entre la válvula de inyección y el nebulizador. Con el fin de minimizar la dispersión, la longitud del tubo conector se redujo al mínimo posible (40 cm). En la Tabla 14 se recogen los valores de dispersión obtenidos en función del volumen de muestra inyectado. La dispersión se calculó como la relación entre la señal obtenida en nebulización continua y la lectura, en altura de pico, de la señal transitoria obtenida por inyección en flujo. Los datos indicados son la media de tres determinaciones a dos niveles de concentración de selenio (50 y 100 $\mu\text{g/L}$) y para los tres isótopos estudiados. En la tabla se observa que la dispersión es prácticamente igual a la unidad para un volumen de inyección de 250 μL , es decir no hay pérdidas de sensibilidad frente a la determinación en continuo, sin embargo las señales obtenidas para este volumen de inyección mostraban un perfil con elevado nivel de ruido. Un volumen de inyección de 100 μL presenta una dispersión de 1.5, dando lugar a señales transitorias con un perfil más limpio, por lo que éste fue elegido como óptimo para el desarrollo del resto de experimentos realizados con el sistema de inyección en flujo.

Tabla 14. Dispersión del sistema de inyección en flujo en función del volumen de inyección a un caudal de disolución portadora de 1.0 mL/min. Los resultados son media de los obtenidos para 50 y 100 $\mu\text{g/L}$ de selenio.

Volumen de inyección (μL)	Dispersión
50	2.6 ± 0.1
100	1.5 ± 0.1
250	1.0 ± 0.1

Para evaluar la influencia del caudal de la disolución portadora sobre la señal analítica, éste parámetro fue variado desde 0.4 a 1.0 mL/min. Al aumentar el caudal se

por lo que se eligió un caudal de 1.0 mL/min para los experimentos realizados en inyección en flujo.

1.2.2. Características Analíticas

En la Tabla 15 se recogen los datos de calibración y las características analíticas para la determinación de selenio en ambos modelos de ICP-MS con la introducción de muestra por inyección en flujo, bajo las condiciones óptimas de operación indicadas en la Tabla 11. Los límites de detección (L.D.) fueron calculados a partir de diez determinaciones de la disolución patrón de menor concentración empleada en el calibrado, puesto que no era posible diferenciar la señal del blanco de la línea base. La concentración de esta disolución fue de 5 y 0.5 µg/L de Se para los modelos Eclipse y PQ3 respectivamente. La precisión expresada como el porcentaje de desviación típica relativa (%RSD), fue evaluada a partir de cinco medidas de una disolución patrón de selenio conteniendo 25 µg/L para el modelo Eclipse y 5µg/L para el modelo PQ3.

Tabla 15. Datos de calibración y características analíticas para la determinación de selenio por ICP-MS con inyección en flujo (volumen de inyección de 100 µL).

Modelo	Ecuación de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	L.D. (µg/L)	%RSD*
<i>Eclipse</i>	⁷⁷ Se $y = (1 \pm 2) \times 10^3 + (2712 \pm 3) \times 10^1 c$	0.9998	1.7	2.0
	⁷⁸ Se $y = (8 \pm 9) \times 10^3 + (879 \pm 2) \times 10^2 c$	0.9996	1.1	2.0
	⁸² Se $y = (1 \pm 2) \times 10^3 + (3168 \pm 9) \times 10^1 c$	0.9998	1.5	2.2
<i>PQ3</i>	⁷⁷ Se $y = (2 \pm 2) \times 10^2 + (958 \pm 1) \times 10^1 c$	0.9996	0.2	0.6
	⁷⁸ Se $y = (9 \pm 6) \times 10^2 + (2982 \pm 3) \times 10^1 c$	0.9996	1.1	1.6
	⁸² Se $y = (3 \pm 2) \times 10^2 + (1221 \pm 1) \times 10^1 c$	0.9998	0.1	0.7

"c" es la concentración de Se en µg/L e "y" corresponde al área de la señal transitoria.

* Calculada para 25 µg/L en el modelo *Eclipse* y 5µg/L en el modelo *PQ3* (n=5).

Los L.D. y %RSD mostrados en la tabla anterior son muy semejantes a los que se obtienen por nebulización continua, pero como veremos en el apartado siguiente, este sistema de introducción de muestra disminuye notablemente las interferencias ocasionadas por la matriz.

2. EVALUACIÓN DEL EFECTO INTERFERENTE DE MATRIZ SOBRE LA SEÑAL DE SELENIO EN ICP-MS. COMPARACIÓN ENTRE LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRA POR NEBULIZACIÓN CONTINUA Y POR INYECCIÓN EN FLUJO

Los objetivos del presente estudio fueron: examinar el efecto de ciertos elementos matriz sobre la señal de selenio, determinar la importancia de las condiciones operativas del ICP y evaluar el efecto corrector de la introducción de muestra por inyección en flujo.

Para asegurar una elección adecuada de las sales empleadas en el estudio de interferencias, en primer lugar se evaluó el efecto de los iones nitrato y amonio sobre la señal de selenio, evitándose el empleo de sales conteniendo el ion cloruro, debido a la interferencia espectral que origina sobre el isótopo ^{77}Se . El estudio se llevó a cabo adicionando cantidades crecientes de nitrato amónico a la disolución de analito y midiendo la señal de selenio, a las tres relaciones de m/z estudiadas, en ausencia y presencia de la sal.

Como se muestra en la Tabla 16, la presencia de NO_3^- o NH_4^+ no influye sobre la señal relativa de selenio hasta el máximo nivel de concentración estudiado: 2500 mg/L en nebulización continua y 5000 mg/L en inyección en flujo. Por lo tanto, para la evaluación de interferencias procedentes de otros cationes o aniones, se eligió el empleo de sus correspondientes nitratos o sales amónicas.

Como cationes objeto de estudio se eligieron elementos fácilmente ionizables como Na, K y Ba (P.I.<5.2 eV) y elementos de mayor potencial de ionización (5.2<P.I.<7.8 eV) como Al, Cr, Ca y Mg, de modo que cubrieran un amplio intervalo de

masas, desde $m/z=20$ hasta 140, con el fin de evaluar un posible efecto dependiente de la masa. También se evaluó el efecto interferente debido a la presencia de aniones SO_4^{2-} y PO_4^{3-} , comúnmente presentes en muestras sencillas como las aguas.

La magnitud del efecto interferente de matriz para los distintos elementos concomitantes ensayados, se evaluó a partir de la *Señal Relativa (%)* de selenio, calculada a partir de la relación entre la señal de selenio en presencia y ausencia de elemento matriz, y expresada en porcentaje [ecuación (2)].

$$\% \text{ Señal Relativa} = \frac{\text{cps Se en presencia de elemento interferente}}{\text{cps Se en ausencia de elemento interferente}} \times 100 \quad (\text{ecuación 2})$$

El estudio se llevó a cabo para los tres isótopos de selenio, con relación m/z 77, 78 y 82, no encontrándose diferencias significativas en los resultados para un nivel de confianza del 95%. Este hecho confirma la ausencia de interferencias espectrales, sobre la señal de selenio, por parte de los elementos matriz estudiados. Los resultados representados en todo el estudio de interferencias son la media de los datos obtenidos para los tres isótopos.

2.1. EFECTO INTERFERENTE EN LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS POR NEBULIZACIÓN CONTINUA (CN)

La Tabla 16 muestra la magnitud del efecto interferente sobre la señal de selenio para cada concentración de elemento matriz estudiado. Como reflejan los resultados presentados en la tabla, la presencia de iones sulfato y fosfato en la matriz no interfiere en la determinación de selenio por ICP-MS, hasta la máxima concentración ensayada, 2500 mg/L. Sin embargo, en presencia de Na, K, Ca, Mg, Al o Cr se observó siempre un efecto reductor de la señal de selenio a partir de una concentración de 500 mg/L de elemento matriz, mientras que 250 mg/L de Ba son suficientes para producir una atenuación equivalente de la señal.

Las Figuras 14 y 15 muestran el efecto producido por la presencia de elementos con un valor bajo del primer potencial de ionización (Na, K y Ba) y por elementos

menos fácilmente ionizables (Mg, Ca, Al y Cr) respectivamente. Los resultados obtenidos para dos concentraciones de selenio, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$, se encuentran representados por las líneas "I" y "II" respectivamente, ambas representaciones muestran el mismo comportamiento a los dos niveles de concentración de selenio evaluados, comprobándose que el efecto matriz depende de la cantidad absoluta de elemento concomitante y no de la cantidad relativa respecto al analito.

El mayor efecto depresor sobre la señal de selenio se observó en presencia de bario (Figura 14), mientras que el magnesio (Figura 15) y el sodio (Figura 14) causan el efecto interferente menor.

Con el fin de clarificar la influencia que la masa de los elementos matriz tiene sobre la señal de selenio, se ha representado la magnitud del efecto interferente frente a la concentración molar del elemento matriz (Figura 16 superior). En este caso, los datos de señal relativa son la media de los resultados obtenidos para los tres isótopos de selenio para una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ de Se. Los resultados demostraron que el nivel de interferencia no espectral depende de la masa del elemento matriz, siendo los elementos más pesados los que producen un mayor efecto interferente. En la figura se puede observar que el orden, en cuanto al nivel de interferencia, es el siguiente: $\text{Ba} > \text{Cr} > \text{Ca} \geq \text{K} > \text{Al} > \text{Mg} \geq \text{Na}$.

2.2. EFECTO INTERFERENTE EN LA INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FI)

El acoplamiento de la inyección en flujo al ICP-MS permite un mayor contenido salino en las muestras, como se ha mencionado anteriormente, reduciendo los problemas derivados de la obturación del sistema. Por esta razón, se extendió el intervalo de concentración de interferente respecto al utilizado en la nebulización neumática, desde 2500 mg/L a 5000 mg/L. Las líneas "III" y "IV" representadas en las Figuras 14 y 15 muestran el efecto de los elementos matriz estudiados para la introducción de muestra por inyección en flujo en el ICP-MS, a dos niveles de concentración de selenio: 50 y 100 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

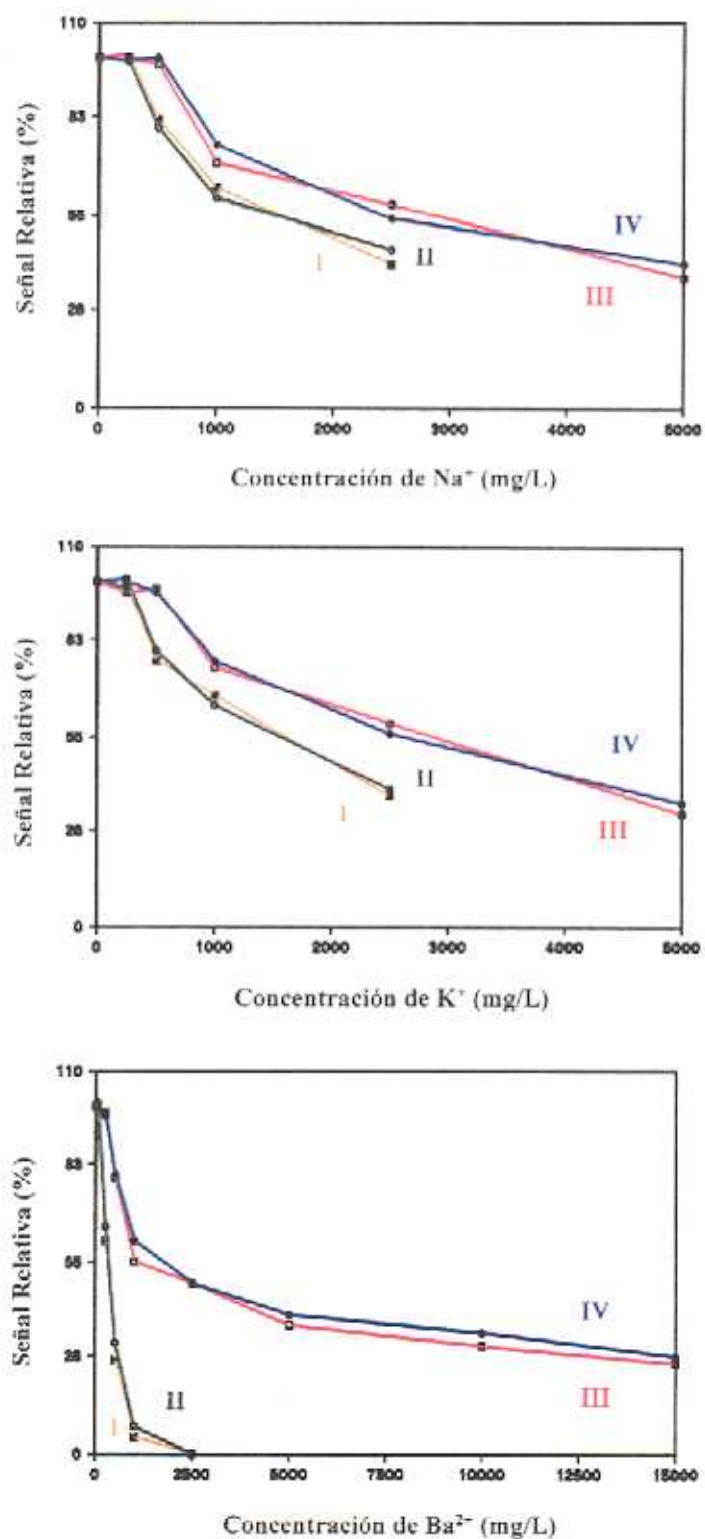


Figura 14. Efecto ejercido sobre la señal de Se por elementos con P.I.<5.2 eV (Na, K y Ba) en la introducción de muestra por nebulización continua (I: 50 y II: 100 mg/L de Se) y por inyección en flujo (III: 50 y IV: 100 mg/L de Se).

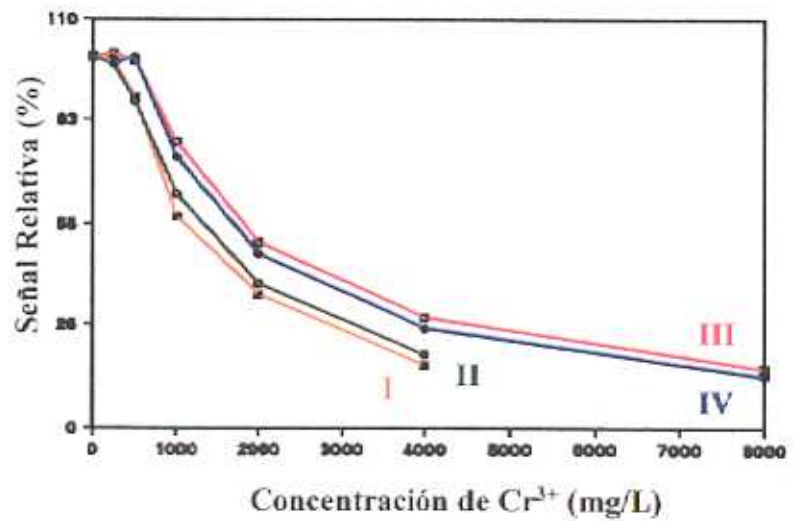
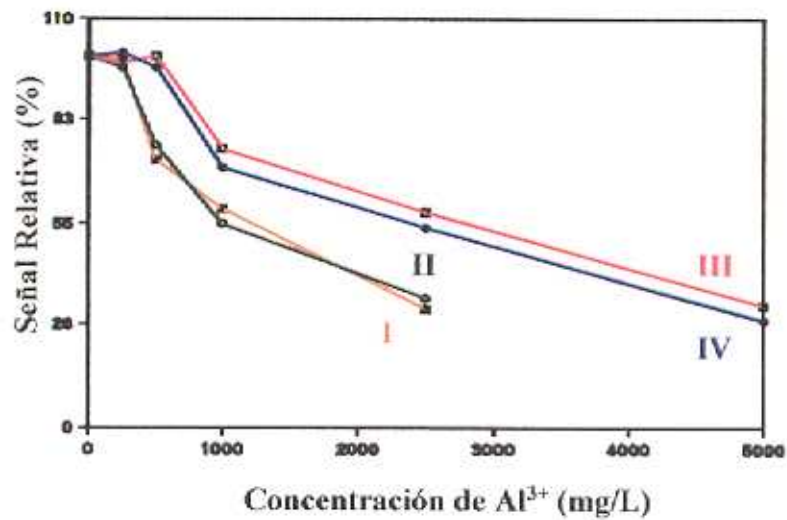
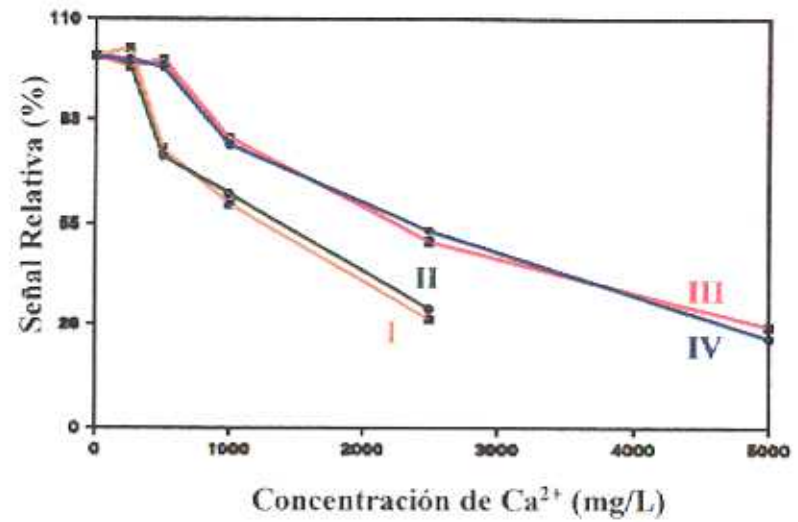
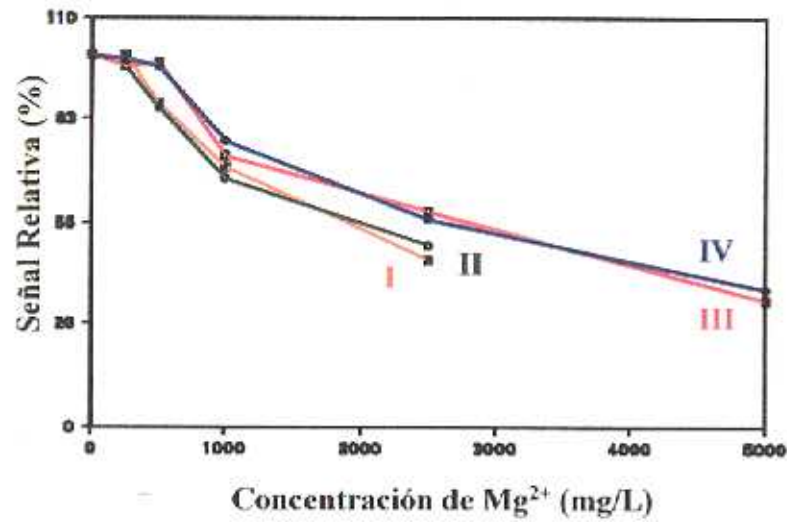


Figura 15. Efecto matriz sobre la señal de Se producido por elementos con $5.2 < P.I. < 7.8$ eV (Mg, Ca, Al y Cr) en la introducción de muestra por nebulización continua (I: 50 y II: 100 $\mu\text{g/L}$ de Se) y por inyección en flujo (III: 50 y IV: 100 $\mu\text{g/L}$ de Se).

Tabla 16.- Efecto interferente de elementos matriz sobre la señal de 50 µg/L de selenio.
Los resultados son la media de los obtenidos a las tres relaciones m/z 77, 78 y 82.

ION (SAL)	1 ^{er} P.I.(eV)	TDS(g/100 mL)	mg/L (ion)	Señal Relativa (%)	
				CN	FI
NH ₄ ⁺ (NH ₄ NO ₃)		0.38	2500	98 ± 2	100 ± 3
		0.76	5000	--	97 ± 3
NO ₃ ⁻ (NH ₄ NO ₃)		0.71	2500	101 ± 3	100 ± 2
		1.43	5000	--	98 ± 3
SO ₄ ²⁻ ((NH ₄) ₂ SO ₄)		0.34	2500	100 ± 1	100 ± 2
		0.69	5000	--	99 ± 2
PO ₄ ³⁻ ((NH ₄) ₃ PO ₄)		0.36	2500	99 ± 2	102 ± 3
		0.72	5000	--	100 ± 4
Na ⁺ (NaNO ₃)	5.16	0.09	250	101 ± 1	99 ± 3
		0.18	500	82 ± 5	98 ± 3
		0.37	1000	63 ± 3	70 ± 4
		0.92	2500	41 ± 5	58 ± 6
		1.85	5000	--	37 ± 5
Mg ²⁺ (Mg(NO ₃) ₂)	7.63	0.15	250	100 ± 2	98 ± 3
		0.30	500	87 ± 3	98 ± 2
		0.61	1000	70 ± 5	77 ± 2
		1.52	2500	47 ± 4	58 ± 3
		3.05	5000	--	35 ± 4
K ⁺ (KNO ₃)	4.33	0.06	250	98 ± 3	97 ± 3
		0.13	500	77 ± 4	98 ± 3
		0.26	1000	67 ± 3	75 ± 4
		0.56	2500	38 ± 4	59 ± 5
		1.30	5000	--	33 ± 4
Ca ²⁺ (Ca(NO ₃) ₂)	6.11	0.10	250	102 ± 3	97 ± 3
		0.20	500	75 ± 4	99 ± 2
		0.41	1000	60 ± 3	78 ± 3
		1.02	2500	29 ± 4	50 ± 4
		2.05	5000	--	27 ± 5
Al ³⁺ (Al(NO ₃) ₃)	5.98	0.19	250	99 ± 3	98 ± 3
		0.39	500	72 ± 3	100 ± 2
		0.79	1000	59 ± 4	75 ± 4
		1.97	2500	32 ± 3	58 ± 4
		3.95	5000	--	33 ± 4
Cr ³⁺ (Cr(NO ₃) ₃)	6.76	0.11	250	99 ± 3	98 ± 2
		0.22	500	89 ± 2	100 ± 2
		0.45	1000	57 ± 4	73 ± 3
		0.91	2000	36 ± 4	47 ± 3
		1.83	4000	17 ± 3	27 ± 4
Ba ²⁺ (Ba(NO ₃) ₂)	5.20	3.66	8000	--	14 ± 4
		0.02	50	99 ± 2	100 ± 3
		0.04	250	61 ± 3	98 ± 2
		0.09	500	27 ± 3	79 ± 3
		0.19	1000	5 ± 3	55 ± 4
		0.47	2500	--	49 ± 3
		0.95	5000	--	37 ± 4
1.90	10000	--	31 ± 3		
2.85	15000	--	26 ± 3		

TDS es el contenido en sólidos disueltos.

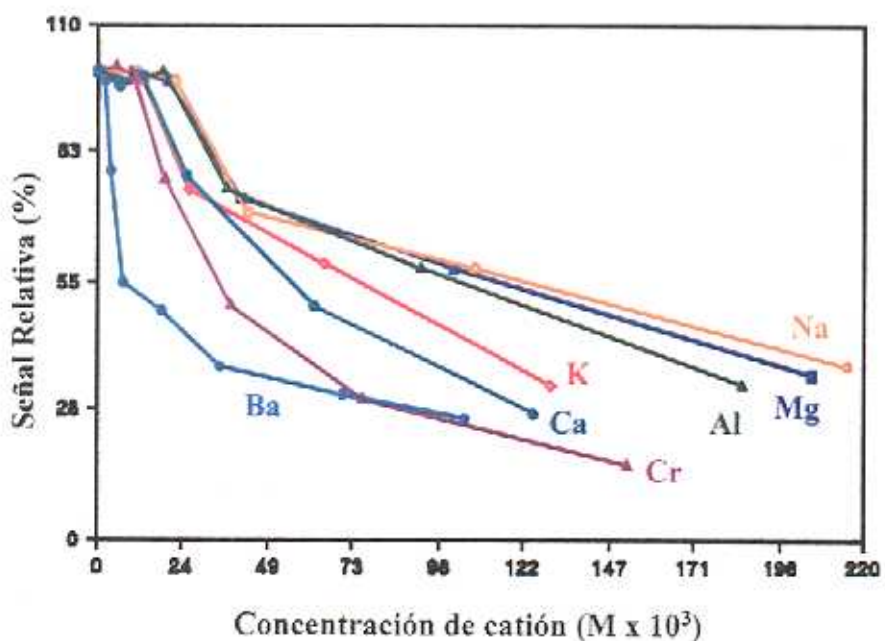
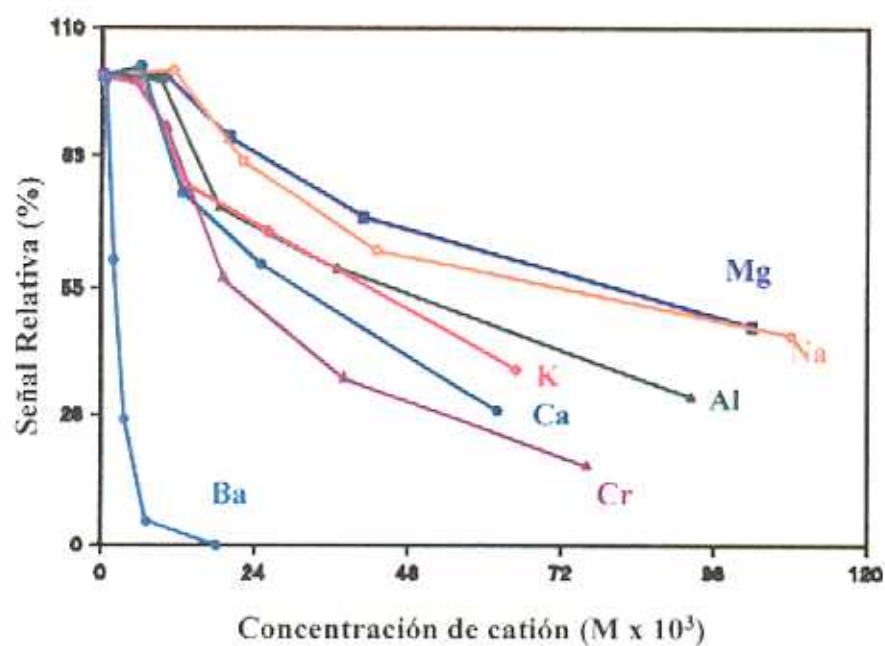


Figura 16. Señal relativa para 50 $\mu\text{g/L}$ de selenio frente a la concentración molar de los cationes interferentes con introducción de muestra por nebulización continua (figura superior) y por inyección en flujo (figura inferior).

Con el empleo de la inyección en flujo, el efecto depresor sobre la señal de selenio aparece a una concentración de 1000 mg/L para la presencia de Na, K, Ca, Mg, Al y Cr y de 500 mg/L para la interferencia de Ba. La presencia de bario (Figura 14) y de magnesio (Figura 15), causan el mayor y menor efecto interferente respectivamente, del mismo modo que ocurre en la introducción de muestra por nebulización continua, aunque con una notable reducción en el nivel de interferencia (Tabla 16).

Al igual que ocurría en el método en continuo, no se encontraron diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre los efectos interferentes sobre las dos concentraciones de selenio ensayadas ni para los distintos isótopos estudiados.

La Figura 16 (inferior) muestra la señal relativa de selenio frente a la concentración molar del elemento matriz para la técnica de inyección en flujo. Los resultados muestran un comportamiento similar al obtenido con el método en continuo, con la consiguiente reducción en el nivel de interferencia y mostrando la misma dependencia con la masa del elemento interferente.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el empleo de la técnica de inyección en flujo proporciona una significativa reducción en el nivel de interferencia, para todos los elementos matriz estudiados. Sin embargo es posible que esta reducción se deba a la dispersión de la muestra en el sistema, es decir a un efecto de dilución.

Para el estudio del efecto de la dispersión del sistema sobre el nivel de interferencias no espectrales, se evaluó el efecto interferente debido a la presencia de 2500 mg/L de Mg, Ca o Cr sobre la señal de 50 $\mu\text{g/L}$ de selenio, a tres valores de dispersión: 1.5, 16.4 y 28.0, obtenidos por aumento de la longitud del tubo de conexión entre la válvula de inyección y el nebulizador (40, 100 y 250 cm). Los resultados representados en la Tabla 17, demuestran que cuando la dispersión del sistema aumenta, el efecto de cada elemento interferente disminuye gradualmente.

Tabla 17. Estudio del efecto de la dispersión del analito en el sistema de inyección en flujo sobre la señal de selenio para 50 µg/L, en presencia de 2500 mg/L de Mg, Ca o Cr.

Resultados expresados como Señal Relativa (%).

ION	D = 1.5	D = 16.4	D = 28.0
Mg ²⁺	57 ± 3	80 ± 4	109 ± 3
Ca ²⁺	52 ± 3	104 ± 3	110 ± 4
Cr ³⁺	45 ± 3	85 ± 4	107 ± 3

Los resultados presentaron una buena correlación con las medidas en nebulización continua de las muestras sometidas a dilución, en un factor igual al correspondiente valor de dispersión. Este hecho nos permite concluir que la reducción en el nivel de interferencia a través del empleo de la inyección en flujo, corresponde a un efecto de dilución de la muestra. A pesar de esto, es importante considerar las ventajas que aporta el empleo de la técnica de inyección en flujo como son: el menor grado de manipulación de la muestra y la posibilidad de automatización, siendo recomendable su utilización para la reducción de interferencias de matriz en ICP-MS.

2.3. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES EN LAS INTERFERENCIAS DE MATRIZ

Las variables elegidas para evaluar la influencia que ejercen los parámetros operativos del plasma sobre el nivel de interferencias no espectrales fueron: el caudal de gas de nebulización y la potencia de radiofrecuencia aplicada. El efecto de la variación en el potencial de las lentes del sistema focalizador no se consideró ya que en estudios anteriores realizados por Wang y colaboradores (1990), no se encontró una significativa influencia de este parámetro instrumental sobre el nivel de interferencias no espectrales. Por otro lado, en la optimización del instrumento, el potencial aplicado a las lentes es un parámetro variable entre experimentos realizados en diferentes días.

La posible influencia que los parámetros instrumentales tienen sobre la magnitud de los efectos interferentes sobre la señal de selenio, se estudió para tres elementos: Mg,

Ba y Cr (1000 mg/L), los cuales tienen diferentes potenciales de ionización y diferente masa.

2.3.1. Caudal del gas de nebulización

La Figura 17 muestra la influencia del caudal de gas de nebulización sobre la señal de selenio expresada en cuentas por segundo, tanto en ausencia como en presencia de los elementos interferentes, puede observarse como el caudal de gas de nebulización ejerce una fuerte influencia sobre el nivel de interferencia en la señal de selenio. El efecto varía desde supresión a incremento de la señal analítica, y el comportamiento depende de cada elemento matriz evaluado.

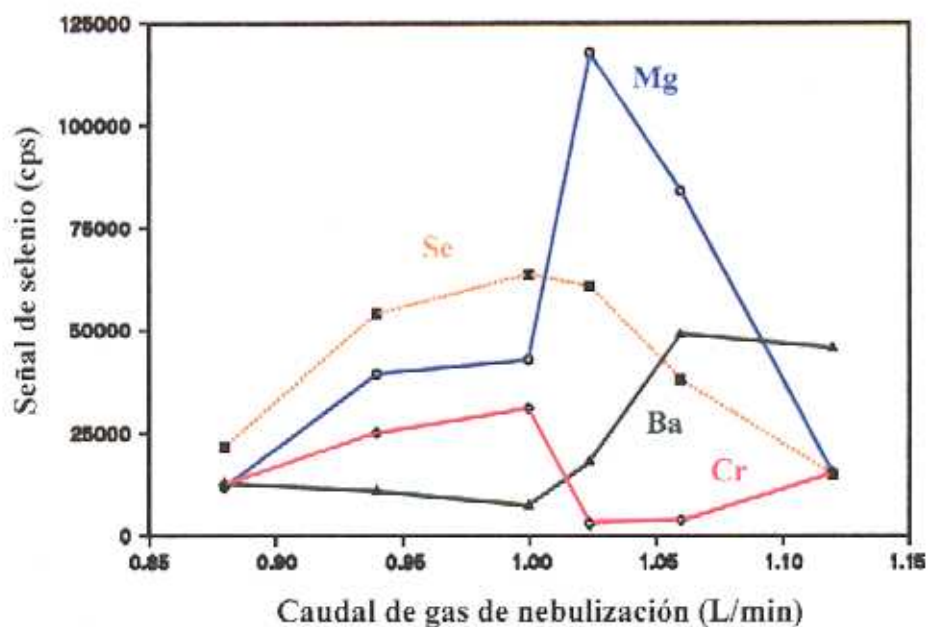


Figura 17. Efecto del caudal de nebulización sobre la señal de selenio (25 $\mu\text{g/L}$) en ausencia (Se) y presencia de 1000 mg/L de **Mg**, **Ba** o **Cr**.

La presencia de magnesio causa un 30-40% de reducción de la señal de selenio a caudales de gas de nebulización entre 0.88 a 1.00 L/min, sin embargo, se observa un substancial aumento a caudales mayores, alcanzando un máximo a 1.02 L/min. A pesar de que a 1.12 L/min el efecto interferente parece ser eliminado, desafortunadamente a dicho caudal de gas se produce una significativa pérdida de sensibilidad para selenio

aun en ausencia de elementos interferentes. La presencia de bario ofrece el efecto depresor mayor sobre la señal analítica a caudales de gas de nebulización por debajo de 1.00 L/min, sin embargo el efecto cambia proporcionando un ligero aumento a caudales mayores. En el caso del cromo, la influencia del caudal de nebulización es prácticamente opuesta al comportamiento en presencia de Ba, aunque en ningún caso se observó aumento de la señal analítica.

Ya que la influencia del caudal de gas de nebulización es variable en función del elemento interferente presente en la matriz, y puesto que en las muestras se encuentran presentes de forma simultánea muchos de estos elementos, se aconseja el ajuste de este parámetro operativo en ausencia de elementos matriz, como es habitual, resultando para el caso del selenio de 1.00 L/min.

2.3.2. Efecto de la potencia de radiofrecuencia aplicada

En la Figura 18 se ha representado el efecto de la potencia de rf aplicada al ICP sobre la señal de selenio en ausencia y presencia de elementos matriz. Se observa un comportamiento similar para la presencia de magnesio o cromo, con un efecto reductor en la señal analítica en todo el intervalo de potencia de radiofrecuencia ensayado. En presencia de bario, la tendencia es significativamente diferente, produciéndose un incremento sobre la señal de selenio a valores de potencia de rf bajos, por debajo de 1150 W, mientras que se produce casi la anulación de la señal de analito a valores de potencia de rf mayores, especialmente a 1300 W, donde el selenio alcanza un máximo de señal en ausencia de interferencia.

Las interferencias no espectrales según todo lo expuesto, se han mostrado dependientes de las condiciones experimentales utilizadas. En algunos casos se produce un cambio desde supresión a aumento de la señal analítica, lo que podría explicar los datos conflictivos que aparecen en la literatura. No se han encontrado condiciones experimentales recomendables para evitar los efectos interferentes de matriz, ya que los cambios varían en función del elemento concomitante estudiado. Por ello es necesario

trabajar bajo las condiciones óptimas de operación para el analito, en nuestro caso selenio.

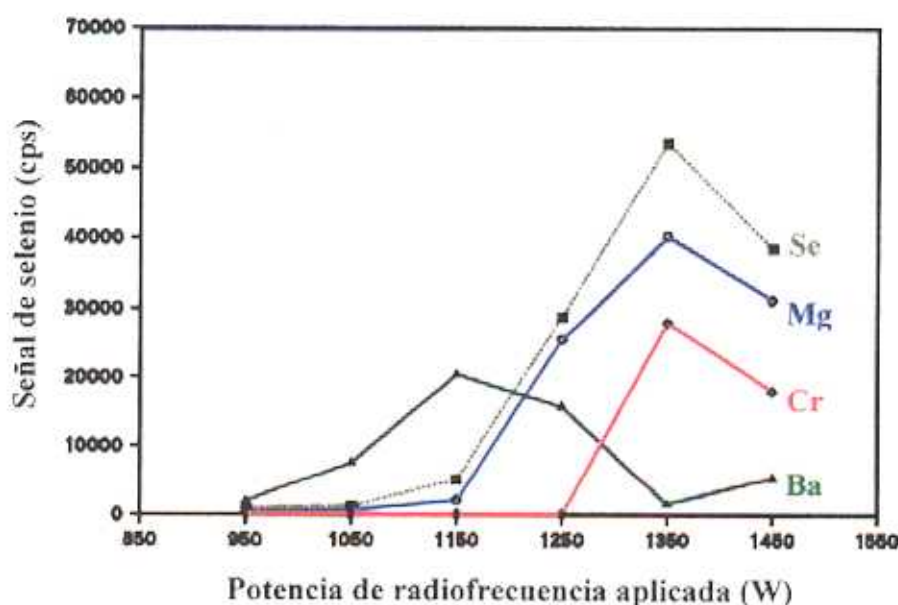


Figura 18. Efecto de la potencia de radiofrecuencia aplicada sobre la señal de selenio (25 µg/L) en ausencia (Se) y en presencia de 1000 mg/L de Mg, Ba o Cr.

2.4. CORRELACIÓN CON LAS TEORIAS PROPUESTAS SOBRE EL ORIGEN DE LAS INTERFERENCIAS NO ESPECTRALES EN ICP-MS

Como quedó reflejado en la introducción (Capítulo I, apartado 2.2.2), varios autores han propuesto diversas teorías para justificar la presencia de interferencias no espectrales en ICP-MS. Los resultados obtenidos, presentados en la Tabla 16, demuestran que no existe relación entre el efecto interferente y el potencial de ionización de los elementos matriz estudiados. La presencia de Na o Mg produce un efecto interferente similar sobre la señal de selenio a pesar de la gran diferencia existente entre sus potenciales de ionización, por lo que no deben contribuir significativamente en la densidad electrónica del plasma. Este hecho parece estar de acuerdo con los cálculos teóricos publicados por Gillson y colaboradores en 1988.

Por otro lado, la presencia de 1000 mg/L de Ba [Ba(NO₃)₂] causa el efecto interferente mayor a pesar de proporcionar un contenido bajo en sólidos disueltos

totales (0.19%), mientras que la misma concentración de Al [Al(NO₃)₃] provoca un menor efecto interferente, a pesar de su elevado contenido en TDS (1.97%). Por esta razón las interferencias de matriz estudiadas no muestran correlación con cambios en la eficiencia de transporte del aerosol ocasionado por un elevado contenido salino.

En el presente estudio, se ha mostrado una clara dependencia del nivel de interferencia en función de la masa del elemento concomitante (Figura 13), lo que está de acuerdo con el efecto dependiente de la masa, relacionado con la teoría de efecto espacio-carga en el haz iónico.

En conclusión, la determinación de selenio por ICP-MS se ve afectada por la presencia de interferencias procedentes de la matriz. El efecto interferente procede principalmente de las repulsiones electrostáticas que se producen en el haz iónico debido a la pequeña relación espacio-carga. Sin embargo, la marcada influencia de los parámetros instrumentales muestra la posible presencia de varios mecanismos con predominancia variable en función de las condiciones de operación instrumental.

3. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE LA GENERACIÓN DE HIDRUROS POR INYECCIÓN EN FLUJO AL ICP-MS

La capacidad de análisis de la técnica de ICP-MS se ve fuertemente influenciada por el sistema de introducción de muestras. El objetivo de este trabajo fue estudiar las prestaciones aportadas por un sistema de introducción de muestras alternativo, eligiéndose el estudio del acoplamiento con la generación de hidruros.

3.1. INTRODUCCIÓN

La introducción de la muestra como gas (hidruro), como ya se indicó en el Capítulo II (apartado 2.2), ofrece algunas ventajas frente a la introducción de la muestra como aerosol líquido. La mejora en la eficiencia de transporte, así como de la atomización e ionización del analito y la disminución de interferencias tanto espectrales como no espectrales, mejoran la relación señal/ruido y por lo tanto la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, existen también algunos inconvenientes en el acoplamiento HG-ICP-MS. Por un lado, la introducción de muestras en estado gaseoso en el plasma provoca una mayor inestabilidad del mismo, inducida por la variación en la composición del gas inyector debido a la entrada de otros gases desprendidos en la reacción (H_2 , CO_2 y vapor de agua), y por otro lado, la generación de hidruros se ve afectada por otro tipo de interferencias inherentes a la propia reacción (Capítulo II, apartado 2.2).

Los estudios de optimización presentados a continuación fueron realizados a las tres relaciones m/z estudiadas (77, 78 y 82), obteniendo resultados equivalentes para los tres isótopos de selenio, con variaciones sólo en cuanto a sensibilidad.

3.2. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA GENERADOR DEL HIDRURO

La reacción de generación del hidruro de selenio, como se ha indicado previamente, es específica para la especie Se^{IV} , produciéndose por reacción con un reductor en medio ácido. Las concentraciones de ácido (normalmente clorhídrico) y de

agente reductor (generalmente borohidruro sódico) influyen de forma crítica en la eficiencia de la reacción de generación del hidruro de selenio.

Para el empleo de técnicas semiautomáticas (en continuo y por inyección en flujo) se deben optimizar los caudales de bombeo de la muestra ácida y del reductor. En el caso concreto de la inyección en flujo es importante la optimización del volumen de inyección.

3.2.1. Optimización de la concentración de borohidruro sódico

La optimización de la concentración de borohidruro sódico se evaluó variando ésta desde 0.1 a 2% (m/v), manteniendo el resto de parámetros constante. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19, observándose un máximo en la señal de selenio para una concentración de reductor de 0.5% (m/v), por lo que esta concentración fue adoptada como óptima para posteriores experimentos.

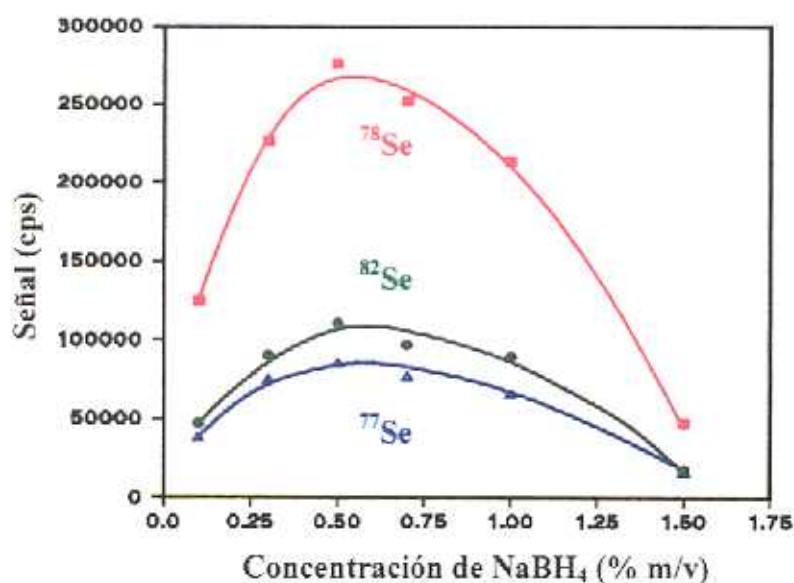


Figura 19. Efecto de la concentración de NaBH₄ sobre la señal de 2 µg/L de Se^{IV}.

El empleo de concentraciones elevadas de NaBH₄ provoca un exceso de hidrógeno en el plasma, pudiendo desestabilizarlo incluso extinguirlo. En la experimentación, se comprobó que este hecho tenía lugar a concentraciones superiores al 1.5% (m/v).

3.2.2. Optimización de la concentración de ácido clorhídrico

La eficiencia de la reacción de generación de hidruros depende del tipo de ácido así como de su concentración. Se evaluó el efecto de la concentración de HCl sobre la generación del hidruro de selenio, variando su concentración desde 0.1 a 6.0 mol/L. El estudio se realizó para una concentración de NaBH₄ de 0.5% (m/v) y 2 µg/L de selenio. La Figura 20 muestra un incremento en la señal de selenio cuando la concentración de ácido aumenta desde 0.1 a 0.5 mol/L, manteniéndose la señal alcanzada hasta una concentración de 4.0 mol/L. Para posteriores estudios se eligió una concentración de HCl 0.6 mol/L.

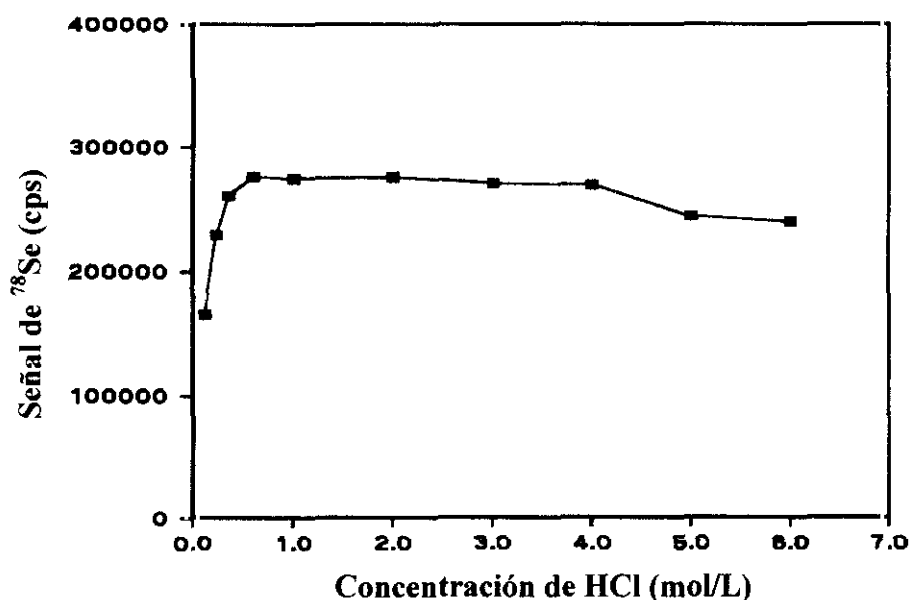


Figura 20. Efecto de la concentración de HCl sobre la señal de 2 µg/L de Se^{IV}.

3.2.3. Influencia de los caudales de ácido y reductor

Para determinar los caudales óptimos de las disoluciones de HCl y NaBH₄, este parámetro fue variado desde 1.0 a 4.5 mL/min. El estudio se realizó para tres relaciones de caudales (HCl:NaBH₄) de 1:1, 1:0.5 y 1:0.33. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 21. Dicha figura muestra un incremento de la señal de selenio a caudales mayores. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas, para un nivel

de confianza del 95%, entre las señales obtenidas para las relaciones 1:1 y 1:0.5, mientras que se produce una pérdida de sensibilidad para la relación 1:0.33.

En el estudio se comprobó que caudales mayores de 3.5 mL/min provocaban disturbios en el plasma, en consecuencia, se eligió un caudal para la disolución de ácido de 3.5 mL/min y de 1.7 mL/min para la disolución de reductor.

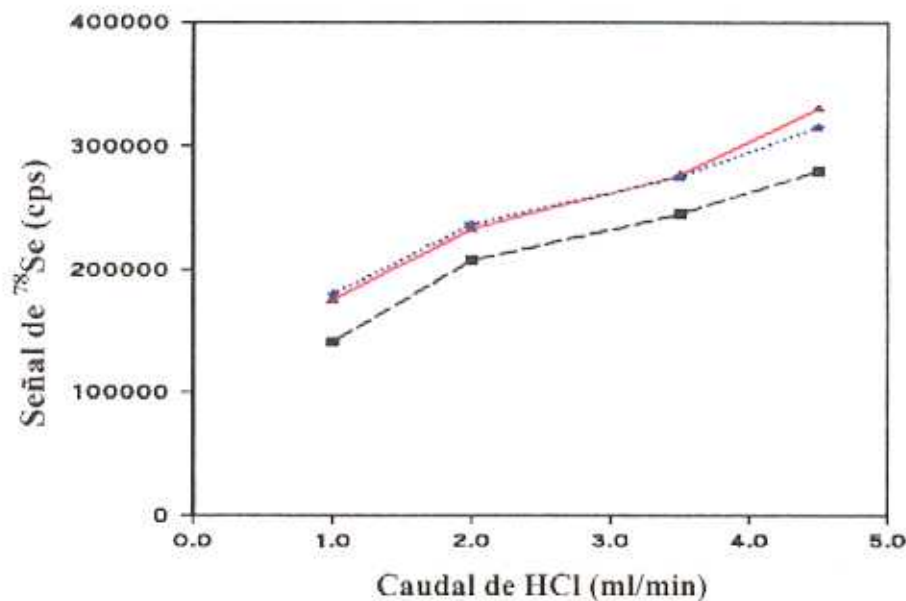


Figura 21. Efecto de la relación entre los caudales de HCl y NaBH_4 sobre la sensibilidad para 2.0 $\mu\text{g/L}$ de Se^{IV} . (HCl: NaBH_4 = 1:1; 1:0.5 y 1:0.33).

3.2.4. Optimización del volumen de inyección

La influencia que el volumen de inyección tiene sobre la señal analítica se evaluó variando el volumen del bucle de inyección en el intervalo de 25-500 μL . La mayor altura de pico de la señal transitoria se obtuvo para un volumen de 100 μL . El empleo de bucles de mayor volumen daba lugar al desdoblamiento de los picos como muestra la Figura 22, posiblemente debido a una incompleta reacción, este problema desapareció con el empleo de reactores de mayor longitud (de 30 a 200 cm). La dispersión del sistema FI-HG-ICP-MS resultó igual a la unidad con volumen de inyección de 100 μL y una longitud en los reactores de 30 cm (0.5 mm d.i).

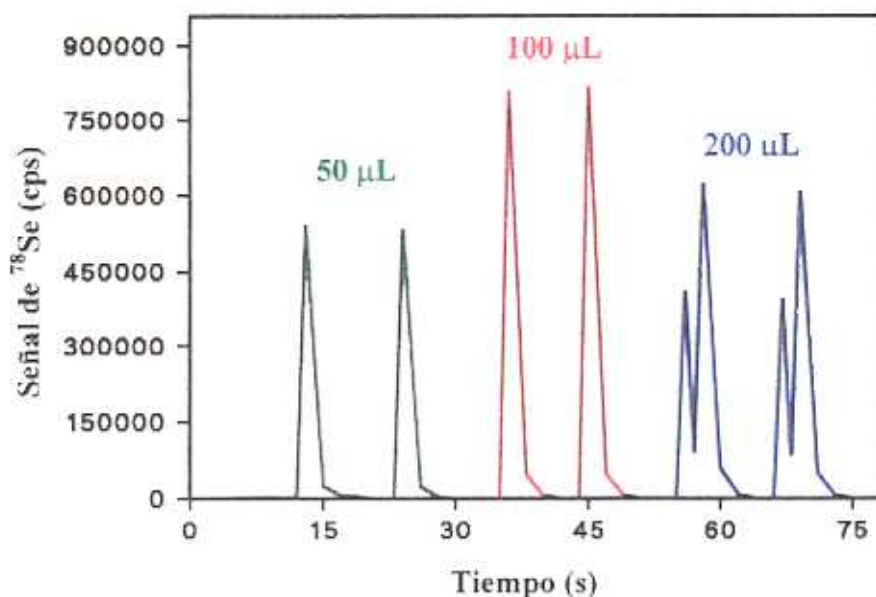


Figura 22. Señales transitorias para 2 $\mu\text{g/L}$ de Se^{IV} obtenidas por FI-HG-ICP-MS en función del volumen de inyección.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y DE ATOMIZACIÓN DEL HIDRURO DE SELENIO

El transporte del hidruro generado hacia el sistema de atomización se realizó por transferencia directa, arrastrando los gases producidos en la reacción a través de una corriente de argón. Para conseguir transportar sólo los gases producidos en la reacción, se situó a continuación de la cámara de mezcla, un sistema de separación de fases gas-líquido, consistente en un tubo de vidrio en forma de U.

Los parámetros que influyen en el transporte y atomización del hidruro son: el caudal del gas portador del hidruro y la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma. Un caudal de gas portador muy bajo puede permitir la descomposición de los hidruros por calentamiento del tubo de conexión con el plasma, mientras que un caudal elevado produce una mayor dilución, además de una disminución del tiempo de residencia del analito en el plasma, con la consiguiente pérdida de sensibilidad en ambos casos. En cuanto a la potencia de rf aplicada al plasma, a niveles bajos (800 W), pueden producirse fluctuaciones en el plasma por la presencia de otros gases (H_2 , CO_2 ,...), lo que afecta

directamente a la precisión del análisis, mientras que a potencias elevadas (2000 W), pueden producirse altos fondos debido al mayor nivel de fotones que llega al detector.

En el método propuesto se optimizó el caudal de gas portador para los dos valores de potencia de radiofrecuencia disponibles en el modelo Eclipse (1150 y 1350 W). La Figura 23 muestra el efecto de ambos parámetros en la sensibilidad de la determinación del isótopo ^{78}Se . Puede observarse un máximo de señal para un caudal de gas portador de 1.0 L/min, independientemente de la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma.

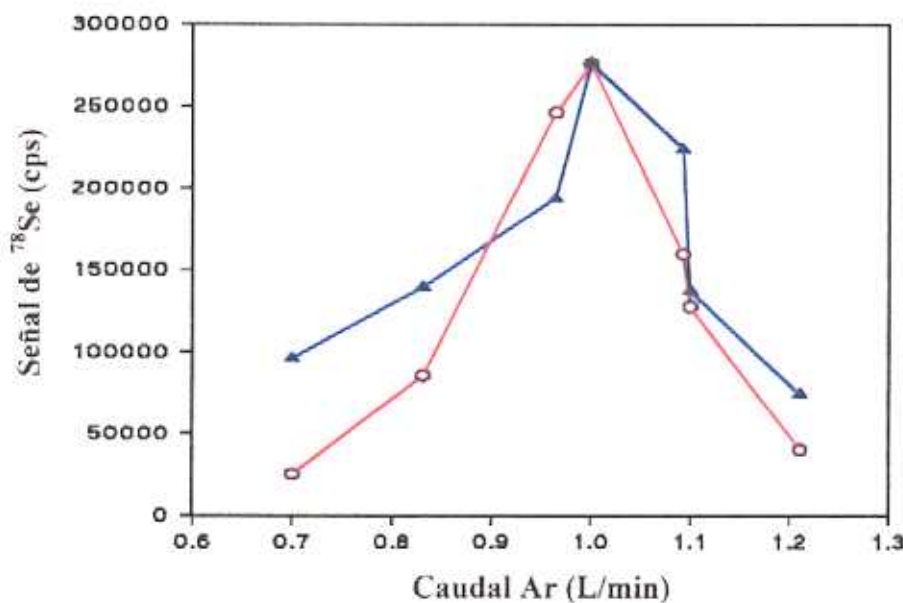


Figura 23. Variación de la señal para 2.0 $\mu\text{g/L}$ de Se^{IV} con el caudal de gas portador y la potencia de radiofrecuencia aplicada al plasma: **1150 y 1350W**.

La estabilidad del plasma se mostró dependiente de la potencia de radiofrecuencia de entrada. En la Tabla 18 se indican los datos de desviación típica relativa (RSD) obtenidos a partir de cinco réplicas, para 5.0 y 2.0 $\mu\text{g/L}$ de Se^{IV} , en función de la potencia de radiofrecuencia de entrada. Se observa que una potencia de 1350 W proporciona una mejor precisión tanto para el método de introducción de muestra en continuo como por inyección en flujo.

Tabla 18. Efecto que la potencia de rf de entrada ejerce sobre la precisión (expresada como desviación típica relativa) en la determinación de Se^{IV} por HG-ICP-MS (m/z=78), a través de la introducción de muestra en continuo y por inyección en flujo.

Se ^{IV} (µg/L)	Método	Potencia de rf (W)	
		1150	1350
5.0	FI	3.4%	2.0%
	Continuo	3.7%	2.4%
2.0	FI	3.9%	2.5%
	Continuo	4.4%	2.9%

3.4. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS EN LA GENERACIÓN DEL HIDRURO DE SELENIO

Se evaluó la posible interferencia procedente de 31 elementos en el análisis de selenio por FI-HG-ICP-MS, los resultados expresados como señal relativa (ecuación 2) se muestran en la Tabla 19. El estudio se llevó a cabo para una concentración de Se^{IV} de 5 µg/L, generándose el hidruro en medio HCl 0.6M y con una concentración de NaBH₄ del 0.5% (m/v). La presencia de los aniones NO₃⁻, PO₄³⁻, Cl⁻ y SO₄²⁻ así como de los cationes Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ no da lugar a interferencias para una concentración 10000 veces mayor que la concentración de selenio (5.0 µg/L). La presencia de algunos elementos de transición produce serias interferencias negativas, sólo el telurio provoca un incremento en la señal (+20% para un relación Te:Se=1000).

Algunos autores han encontrado que la interferencia de Cu²⁺ y Ni²⁺ en la generación del hidruro de selenio puede ser eliminada por formación de sus clorocomplejos estables, empleando como medio ácido en la reacción HCl 7.5 mol/L [Hwang y col., 1990]. Por esta razón se evaluó la posible reducción de las interferencias provocadas por la presencia de estos metales a través del aumento de la concentración de HCl desde 0.6 a 8.0 mol/L. Con el empleo de concentraciones de HCl 2 mol/L la presencia de níquel no interfiere a un nivel de concentración 1000 veces superior a la concentración

de selenio, sin embargo para la eliminación de la interferencia de cobre, tan sólo hasta una relación de concentración Cu:Se=100, es necesario aumentar la concentración de la disolución de HCl hasta 8 mol/L.

Tabla 19. Máxima relación *Ion interferente:Se^{IV}* tolerada en el análisis de 5.0 µg/L de Se^{IV} por FI-HG-ICP-MS.

Ion	Ion:Se ^{IV}	Señal Relativa (%)
NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻	10000*	102 ± 3
Na ^I , K ^I , Ca ^{II} , Mg ^{II}	10000*	98 ± 4
As ^{III} , As ^V , Sb ^{III} , Sb ^V Al ^{III} , Cr ^{III} , Mn ^{II} , Zn ^{II} Co ^{II} , Ti ^{III} , V ^V , Fe ^{III} , F ^I Hg ^{II} , Cd ^{II} , Ge ^{II} , Ni ^{II} **	1000*	101 ± 2
Ni ^{II} , Pb ^{II} , Te ^{IV} , Bi ^{III} Sn ^{II} , Pt ^{II} , Cu ^{II} ***	100	97 ± 3
Cu ^{II} , Pd ^{II} , Ag ^I	1	98 ± 3

* Máxima relación de concentración *Ion interferente: Se^{IV}* evaluada.

** Con el empleo de HCl 2 mol/L.

*** Con el empleo de HCl 8 mol/L.

3.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Las características analíticas del acoplamiento HG-ICP-MS se evaluaron para los métodos de introducción de muestra en continuo y por inyección en flujo. La Tabla 20 recoge los datos de calibración, así como la precisión (%RSD) y el límite de detección (L.D.) para los tres isótopos de selenio estudiados, bajo las condiciones óptimas de operación reflejadas en la Tabla 11. El límite de detección fue calculado siguiendo las normas de la IUPAC, como tres veces la desviación típica de diez medidas del blanco.

Tabla 20. Datos de calibración y características analíticas para la introducción de muestras en continuo y por inyección en flujo (FI) en HG-ICP-MS.

Método		Ecuación de calibración $y = (a \pm s_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	L.D. ($\mu\text{g/L}$)	%RSD ($2.0 \mu\text{g/L}$)
Continuo	^{77}Se	$y = (0 \pm 2) \times 10^2 + (2392 \pm 3) \times 10^1 c$	0.9992	0.13	3.6
	^{78}Se	$y = (-1 \pm 4) \times 10^2 + (7962 \pm 5) \times 10^1 c$	0.9998	0.10	2.9
	^{82}Se	$y = (0 \pm 3) \times 10^2 + (2819 \pm 4) \times 10^1 c$	0.9994	0.13	3.4
FI*	^{77}Se	$y = (0 \pm 1) \times 10^3 + (426 \pm 1) \times 10^2 c$	0.9994	0.07	3.0
	^{78}Se	$y = (-1 \pm 4) \times 10^3 + (1418 \pm 6) \times 10^2 c$	0.9996	0.04	2.5
	^{82}Se	$y = (1 \pm 1) \times 10^3 + (502 \pm 1) \times 10^2 c$	0.9994	0.07	2.9

"c" es la concentración de Se^{IV} en $\mu\text{g/L}$ e "y" es la señal en cps para el método en continuo o el área de la señal transitoria para el método de inyección en flujo.

*Volumen de muestra inyectado $100 \mu\text{L}$.

3.6. ANALISIS DE MUESTRAS

La validación del método propuesto se realizó a través del análisis de una muestra de agua certificada en selenio total (Setpoint Laboratory Standars, A.P.G.) y una muestra de agua con valores de concentración recomendados en Se^{IV} y Se^{VI} (CRM 602), no encontrándose diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre los resultados obtenidos y los valores certificados (Tabla 21). La determinación está ausente de interferencias de matriz, por lo que se puede emplear la calibración convencional.

La determinación de selenio inorgánico total se llevó a cabo hirviendo la muestra en medio HCl 4.5N de forma previa a la generación del hidruro de selenio. El contenido en la especie Se^{VI} se cuantificó por diferencia entre la concentraciones de selenio total y Se^{IV} . En la muestra de agua certificada en selenio total la única especie encontrada fue Se^{VI} .

Tabla 21. Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de selenio por FI-HG-ICP-MS.

Muestra		Valor certificado ($\mu\text{g/L}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g/L}$)
Agua certificada en selenio total	Se_{Total}	35.499 ± 5.134	33.6 ± 1.4
Agua CRM 602	Se^{IV}	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.3
	Se^{VI}	7.7 ± 0.7	7.4 ± 0.4

Por otro lado, se realizó el análisis de selenio en una muestra de agua de grifo y en una muestra de suero sanguíneo liofilizado. Esta última se eligió por su compleja matriz, con el fin de evaluar posibles efectos interferentes debido a la presencia de compuestos orgánicos en la muestra.

En el análisis del agua de grifo no se detectó la presencia de selenio inorgánico. Para estudiar el efecto de la matriz de la muestra en la generación del hidruro de selenio, ésta fue enriquecida con Se^{IV} . Debido a la presencia de interferencias de matriz se obtuvieron bajas recuperaciones a través del método de calibración convencional, siendo necesario la aplicación del método de adiciones estándar. Otra forma de eliminar las interferencias de matriz consistió en aumentar la concentración de ácido clorhídrico a 2.0 mol/L , por lo que estas interferencias podrían ser atribuibles a la presencia de metales de transición en el agua. La Tabla 22 muestra los resultados obtenidos.

Para el análisis de selenio en la muestra de suero liofilizado, ésta fue previamente reconstituida con 5 mL de agua Milli-Q, tomándose esta disolución como muestra original. Sobre la muestra, se llevaron a cabo tres tipos de determinaciones:

1. Determinación del selenio total, realizando una etapa previa de mineralización y posterior reducción con HCl concentrado para transformar en Se^{IV} todas las posibles especies presentes en la muestra.

2. Determinación del selenio inorgánico total, a través de la reducción previa del Se^{VI} presente en la muestra a Se^{IV} por ebullición en medio clorhídrico 4.5N.
3. Determinación del Se^{IV} por simple dilución de la muestra.

Los resultados obtenidos se encuentran reflejados en la Tabla 23. En el primer caso, no se observaron diferencias significativas entre las pendientes correspondientes a los métodos de calibración convencional y de adiciones estándar, pudiéndose concluir la ausencia de efecto matriz. En el segundo y tercer caso fue necesario emplear el método de adiciones estándar, no consiguiendo compensar el efecto matriz a través del empleo de mayores concentraciones de ácido clorhídrico, lo que nos permite concluir que en el análisis de la muestra de suero, las interferencias de matriz observadas deben proceder de la presencia de compuestos orgánicos en la muestra y no sólo por metales de transición.

Tabla 22. Resultados obtenidos en los estudios de recuperación sobre muestras de agua de grifo adicionadas con Se^{IV} . Análisis realizado por FI-HG-ICP-MS.

Datos de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	Se adicionado ($\mu\text{g/L}$)	Se encontrado ($\mu\text{g/L}$)	%Recuperación
$y = (-1 \pm 4) \times 10^3 + (1422 \pm 6) \times 10^2 c^{(\alpha)(\beta)}$	0.9996	2.50	$1.22 \pm 0.04^{(\alpha)}$	$49 \pm 2^{(\alpha)}$
		"	$2.47 \pm 0.04^{(\beta)}$	$99 \pm 2^{(\beta)}$
		5.00	$2.31 \pm 0.07^{(\alpha)}$	$46 \pm 1^{(\alpha)}$
		"	$4.67 \pm 0.07^{(\beta)}$	$93 \pm 1^{(\beta)}$
$y = (157 \pm 4) \times 10^3 + (1187 \pm 4) \times 10^2 c^{(\chi)}$	0.9994	2.50	2.60 ± 0.05	104 ± 2
$y = (298 \pm 3) \times 10^3 + (1186 \pm 4) \times 10^2 c^{(\chi)}$	0.9992	5.00	5.0 ± 0.1	100 ± 2

"c" es la concentración de Se^{IV} en $\mu\text{g/L}$ e "y" es el área de la señal transitoria.

^(α) Calibración convencional bajo las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 11.

^(β) Calibración convencional con HCl 2.0 mol/L.

^(χ) Calibración por adiciones estándar.

De la comparación entre los resultados obtenidos en los tres análisis realizados sobre la muestra de suero (selenio total, selenio inorgánico total y Se^{IV}), se obtienen los

siguientes resultados: puesto que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de selenio inorgánico total y de Se^{IV} podemos concluir que no existe la especie Se^{VI} en el suero; sin embargo la concentración de selenio total es superior a la concentración de Se^{IV} , por lo que deben existir otras especies de selenio orgánicas en la muestra, posiblemente seleno-aminoácidos.

Tabla 23. Resultados obtenidos en el análisis de una muestras de suero liofilizado por FI-HG-ICP-MS.

Datos de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	Se adicionado ($\mu\text{g/L}$)	Se encontrado ($\mu\text{g/L}$)	%Recuperación
Se_{Total} (muestra sometida a mineralización y reducción)				
$y = (-1 \pm 4) \times 10^3 + (1422 \pm 6) \times 10^2 c^{(\alpha)}$	0.9994	-	74 ± 1	-
$y = (51 \pm 4) \times 10^3 + (1410 \pm 5) \times 10^2 c^{(\beta)}$	0.9996	-	73 ± 2	-
Se^{IV} + Se^{VI} (muestra sometida a reducción)				
$y = (22 \pm 3) \times 10^3 + (620 \pm 4) \times 10^2 c^{(\beta)}$	0.9998	-	35 ± 1	-
Se^{IV} (analizada por simple dilución 1:100)				
$y = (22 \pm 3) \times 10^3 + (623 \pm 4) \times 10^2 c^{(\beta)}$	0.9998	-	$0.35 \pm 0.02^{(x)}$	-
		1.00	$1.32 \pm 0.03^{(x)}$	97 ± 3
		2.50	$2.81 \pm 0.05^{(x)}$	98 ± 2
		5.00	$5.56 \pm 0.09^{(x)}$	104 ± 2

"c" es la concentración de Se en $\mu\text{g/L}$ e "y" es el área de la señal transitoria.

^(α) Calibración convencional bajo las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 11.

^(β) Calibración por adiciones estándar.

^(x) Datos de concentración referidos a la muestra diluida (1:100).

Al no disponer de material de referencia (suero sanguíneo) certificado en selenio, se llevó a cabo un enriquecimiento del mismo en la especie Se^{IV} , con el fin de realizar un estudio de recuperación. En la Tabla 23 se puede observar los resultados obtenidos con una recuperación media del $100 \pm 4\%$.

4. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS ENTRE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO MEDIANTE ICP-MS.

En la Tabla 24 se ha realizado una recopilación de los límites de detección obtenidos para la determinación de selenio en ambos modelos de ICP-MS, bajo los diferentes sistemas de introducción de muestra empleados:

- ▣ Nebulización neumática en continuo (CN).
- ▣ Nebulización neumática con inyección en flujo (FICN).
- ▣ Generación de hidruros en continuo (HG).
- ▣ Generación de hidruros con inyección en flujo (FIHG).

Tabla 24. Límites de detección obtenidos para la determinación de selenio en ambos modelos de ICP-MS en función del sistema de introducción de muestra.

Método	Modelo ICP-MS	L.D. ($\mu\text{g/L}$)		
		^{77}Se	^{78}Se	^{82}Se
CN	<i>Eclipse</i>	2.2	1.5	2.0
	<i>PQ3</i>	0.1	0.9	0.1
FICN*	<i>Eclipse</i>	1.7	1.1	1.5
	<i>PQ3</i>	0.2	1.1	0.1
HG	<i>Eclipse</i>	0.13	0.10	0.13
FIHG*	<i>Eclipse</i>	0.07	0.04	0.07

* Resultados obtenidos a través de la cuantificación en términos de área de pico y para un volumen de inyección de 100 μL , resto de condiciones indicadas en la Tabla 11.

En cuanto a los resultados obtenidos en ambos equipos de ICP-MS, los límites de detección mejoran con el modelo PQ3 debido a que proporciona una disminución en la

señal de fondo. Este efecto se hace más acusado para las relaciones m/z 77 y 82, ya que la reducción del fondo se produce en un orden de magnitud (Tabla 13).

Los límites de detección obtenidos a través de las técnicas de inyección en flujo fueron similares a los obtenidos empleando los sistemas en continuo, sin embargo, se observa una considerable mejora en la determinación de selenio con la introducción de la muestra a través de la generación del hidruro, debido principalmente a la mayor eficiencia en el transporte del analito al plasma (próxima al 100%) frente a la nebulización neumática convencional (1-2%).

Tabla 25. Desviaciones típicas relativas obtenidas a través de los diferentes sistemas de introducción de muestra acoplados al ICP-MS. Condiciones de operación indicadas en la Tabla 11.

Método	Modelo ICP-MS	%RSD (n=5)		
		^{77}Se	^{78}Se	^{82}Se
CN	<i>Eclipse</i> (25 $\mu\text{g/L}$)	1.8	1.4	1.7
	<i>PQ3</i> (5 $\mu\text{g/L}$)	0.5	1.1	0.4
FICN	<i>Eclipse</i> (25 $\mu\text{g/L}$)	2.0	2.0	2.2
	<i>PQ3</i> (5 $\mu\text{g/L}$)	0.6	1.6	0.7
HG	<i>Eclipse</i> (2 $\mu\text{g/L}$)	3.6	2.9	3.4
FIHG	<i>Eclipse</i> (2 $\mu\text{g/L}$)	3.0	2.5	2.9

La Tabla 25 muestra las precisiones obtenidas para los diferentes sistemas de introducción de muestra empleados, expresada como desviación típica relativa y calculada a partir de cinco medidas de la disolución patrón correspondiente, según el modelo de ICP-MS y el sistema de introducción de muestra empleado. Los resultados demostraron una notable mejora en la precisión de las determinaciones para el modelo PQ3 frente al modelo Eclipse, a pesar del menor nivel de concentración ensayado. Como hemos comentado anteriormente, este hecho es atribuible al menor nivel de fondo que proporciona el instrumento PQ3.

La introducción de muestra a través de la generación de hidruros reduce la precisión del análisis debido a la mayor inestabilidad del plasma cuando se introducen cantidades variables de otros gases. En general, las precisiones obtenidas fueron mejores que el 5% por lo que todos los sistemas de introducción de muestra estudiados son adecuados para el análisis de selenio por ICP-MS.

Entre todos los sistemas de introducción de muestra empleados en ICP-MS, la generación de hidruros proporciona los mejores límites de detección junto con buenas precisiones, por lo tanto este método resulta muy adecuado para el análisis de muestras que presenten una concentración de selenio total a nivel de trazas, sin embargo la necesidad de la previa transformación de especies a Se^{IV} hace más compleja la especiación, sobre todo para las especies orgánicas. En la determinación de especies de selenio, las características analíticas que otorgan los sistemas de nebulización pueden resultar adecuados para el análisis de la mayoría de las muestras.

5. BIBLIOGRAFÍA

Esteban, L. (1993)

ACK (eds.), *La Espectrometría de Masas en imágenes*, pp. 39-40.

Gillson, G.R.; Douglas, D.J.; Fulford, J.E.; Halligan, K.W.; Tanner, S.D. (1988)

Anal. Chem., 60, 1472.

Heitkemper, D.T.; Caruso, J.A. (1990)

Appl. Spectrosc., 44, 228.

Hwang, J.D.; Huxley, H.P.; Diomiguardi, J.P.; Vaughn, W.J. (1990)

Appl. Spectrosc., 44, 491.

Jarvis, K.E.; Gray, A.L.; Houk, R.S. (1992)

Chapman y Hall (eds.), *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, pp. 15-17, New York.

Long, L.G.; Winefordner, J.D. (1983)

Anal. Chem., 55, 713.

Pretty, J.R.; Blubaugh, E.A.; Caruso, J.A. (1993)

Anal. Chem., 65, 3396.

Stroh, A.; Völlkott, U. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 35.

Tao, H.; Lam, J.W.H.; McLaren, J.W. (1993)

J. Anal. At. Spectrom., 8, 1067.

Wang, J.; Shen W-L.; Sheppard, B.S.; Evans, H.; Caruso, J.A.; Fricke, F.L. (1990)

J. Anal. At. Spectrom., 5, 445.

CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO

1. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO POR HPLC-ICP-MS

1.1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades tóxicas y esenciales del selenio dependen no sólo del nivel de concentración sino también de la forma química en que esté presente, como ha quedado reflejado en la introducción. Por lo tanto, el análisis del contenido total de selenio en las muestras ofrece poca información. Este hecho, ha conducido en los últimos años al desarrollo de un elevado número de trabajos enfocados hacia la determinación de especies de selenio, sin embargo, la mayoría de éstos permiten diferenciar entre especies de selenio de características fisicoquímicas similares, esto es, entre especies orgánicas volátiles (por cromatografía de gases), entre especies inorgánicas (por cromatografía líquida de cambio iónico) o bien entre seleno-aminoácidos (generalmente por cromatografía líquida de fase inversa con formación de pares iónicos). La separación conjunta de especies orgánicas e inorgánicas de selenio no había sido resuelta al comenzar este trabajo (ver Tabla 9 en el Capítulo II).

Nuestro primer objetivo fue desarrollar un método sencillo para la determinación simultánea de especies inorgánicas y orgánicas de selenio, con la finalidad de aplicar el método seleccionado a muestras medioambientales (aguas), fluidos biológicos (orina) y alimentos (pescados y moluscos). Debido al tipo de muestras a analizar, las especies elegidas en el estudio fueron: seleniato, selenito, trimetilselenonio, selenocistina, selenometionina y selenoetionina. La técnica de separación fue la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), dado el carácter no volátil de estas especies, evitando así el empleo de etapas previas de derivatización.

Debido al bajo nivel de concentración en que están presentes las especies de selenio en las muestras, su análisis requiere técnicas de alta sensibilidad. El presente trabajo se ha realizado con detección por ICP-MS debido a sus buenas prestaciones en cuanto a sensibilidad y selectividad.

1.2. ESTUDIO DE DIFERENTES MODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Entre los posibles modos cromatográficos se consideraron más adecuados la cromatografía líquida de fase inversa con formación de pares iónicos y la cromatografía de cambio iónico, realizándose un completo estudio para optimizar las condiciones de la separación. Los estudios preliminares se realizaron únicamente con cuatro especies: selenocistina, selenometionina, selenito y seleniato.

La retención de los analitos en la fase estacionaria se ha expresado en términos de *factor de capacidad o de retención* k' (calculado según la ecuación 3), ya que este parámetro es independiente del caudal de fase móvil empleado y de las dimensiones de la columna. La efectividad de la separación se ha evaluado en términos de *resolución cromatográfica* R_S (calculada según la ecuación 4).

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{ecuación 3}) \quad R_S = 2 \frac{t_{r1} - t_{r2}}{w_1 + w_2} \quad (\text{ecuación 4})$$

t_m (tiempo muerto) corresponde al tiempo de elución de una especie no retenida, t_r (tiempo de retención) corresponde al tiempo de elución para una especie retenida y w corresponde a la anchura del pico en su base.

1.2.1. Cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos

La cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos se ha aplicado a la separación de especies de selenio empleando tanto contraiones aniónicos como catiónicos. Los primeros no reaccionan con las especies inorgánicas (ya que también presentan forma aniónica), por lo que estas especies eluyen en el volumen muerto, sin embargo, esta modalidad cromatográfica se ha empleado como método de separación de selenoaminoácidos. El empleo de contraiones catiónicos hace posible la retención en la fase estacionaria tanto de especies orgánicas como de las especies inorgánicas.

1.2.1.1. Empleo de contraión catiónico

Los estudios presentados a continuación se basan en los previamente realizados por Potin-Gautier y colaboradores en 1993. El método permitía la separación de selenocistina y selenometionina sobre una columna polimérica Hamilton PRP-1, con una fase móvil conteniendo 0.625 mmol/L de bromuro de tetraetilamonio (TEAB) a pH=4.0 y la adición de un 3% (v/v) de acetonitrilo como modificador orgánico. La separación se realizaba a un caudal de 0.4 mL/min, siendo necesaria la recolección de fracciones a la salida de la columna para su detección por ETAAS. Los autores mostraron la posibilidad de separación de seleno-aminoácidos y especies inorgánicas (Se^{IV} y Se^{VI}).

Todos los estudios expuestos en este apartado se desarrollaron acoplando la columna cromatográfica al ICP-MS (modelo Eclipse) y registrando la señal para el isótopo ^{78}Se en función del tiempo. Las condiciones instrumentales empleadas en el estudio corresponden a las indicadas en la Tabla 11, con excepción de los parámetros específicos para HPLC.

En primer lugar se procedió a optimizar el caudal de fase móvil empleado para la separación cromatográfica. A la presión de gas de nebulización óptima en la determinación de selenio por ICP-MS, el nebulizador Meinhard posee un caudal de autoalimentación de 0.6 mL/min, por lo que no resulta adecuado trabajar a caudales de aspiración de muestra inferiores. El límite superior de trabajo para este parámetro también se encuentra limitado a un valor próximo a 1 mL/min, tanto por el nebulizador como por la presión originada sobre la columna del sistema cromatográfico. Por lo tanto, en el estudio para la optimización del caudal de fase móvil, éste fue variado entre 0.6 y 1.0 mL/min.

En general, el aumento en el caudal de fase móvil proporciona picos más altos y estrechos, aunque también provoca una reducción en los tiempos de retención. La eficiencia de la columna se evaluó a través de la relación entre el tiempo de retención y la anchura de pico cromatográfico (t_r/w) para cada una de las especies estudiadas, ya que este parámetro es directamente proporcional al número de platos teóricos de la fase estacionaria. En la

Tabla 26 se presentan los valores medios de " t_r/w " junto con los resultados obtenidos en el cálculo de la resolución cromatográfica " R_S ". La desviación típica relativa de las medidas fue mejor del 2% ($n=3$).

Tabla 26. Valores de t_r/w y de resolución cromatográfica obtenidos en función del caudal de fase móvil empleado en la separación cromatográfica* (25 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie).

Especie	0.6 mL/min		0.8 mL/min		1.0 mL/min	
	t_r/w	R_S	t_r/w	R_S	t_r/w	R_S
SeCys ₂	2.33		2.30		2.32	
		0.26		0.25		0.26
Se ^{IV}	1.23		1.21		1.24	
		0.60		0.58		0.61
Se ^{VI}	1.82		1.78		1.81	
		0.27		0.26		0.26
SeMet	3.77		3.80		3.79	

*Separación realizada en una columna Hamilton PRP-1, con 0.625 mmol/L de TEAB a pH=4 y 3% (v/v) de acetonitrilo.

La variación del caudal en el intervalo estudiado no dio lugar a diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre los valores de t_r/w o de R_S obtenidos para las distintas especies de selenio, por ello se eligió un caudal de fase móvil de 1.0 mL/min con el fin de reducir el tiempo del cromatograma.

El cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas presentadas por Potin-Gautier y colaboradores se muestra en la Figura 24. La concentración de selenio fue de 25 $\mu\text{g/L}$ para cada una de las especies y el volumen de inyección de 100 μL . Los resultados muestran la separación entre las especies orgánicas (SeCys₂ y SeMet), mientras que las especies inorgánicas eluyen entre los seleno-aminoácidos empeorando la resolución en la separación. Por este motivo, se procedió a evaluar las diferentes variables que

influyen sobre el proceso cromatográfico, con el fin de encontrar las condiciones óptimas de separación para las cuatro especies anteriormente mencionadas.

El tiempo muerto del sistema fue evaluado a diferentes caudales de fase móvil, a partir del tiempo de elución correspondiente a una disolución de un catión pequeño (Li^+ , registrado a $m/z=7$), el cual no reacciona con el contraión y por lo tanto no interacciona con la fase estacionaria de la columna. Para que este parámetro resulte independiente del caudal de fase móvil, se ha expresado en términos de volumen muerto, resultando un valor medio de 1.26 ± 0.03 mL.

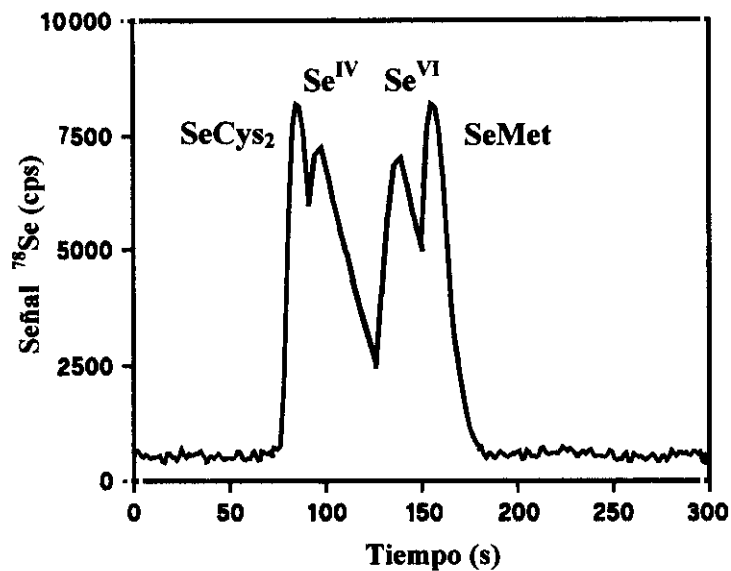


Figura 24. Cromatograma obtenido para $25 \mu\text{g/L}$ de Se por especie, en una columna Hamilton PRP-1 con 0.625 mmol/L de TEAB a $\text{pH}=4.0$ y un 3% de acetonitrilo [Potin-Gautier y col., 1993]. Detección por ICP-MS a un caudal de fase móvil de 1.0 mL/min .

Influencia de la concentración de TEAB

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración de TEAB, ésta fue variada entre 0.1 y 10 mmol/L , manteniendo constante el resto de condiciones cromatográficas (indicadas en la Figura 24). La Figura 25 muestra el efecto de este parámetro sobre los factores de capacidad para las cuatro especies de selenio estudiadas.

Al aumentar la concentración de contraión se incrementa la retención de las especies inorgánicas, como corresponde a un mecanismo de formación de pares iónicos, ya que se favorece la formación del mismo disminuyendo la atracción electrostática entre el soluto y la fase móvil. Por otro lado, la elución de las especies orgánicas no se ve influenciada por este parámetro. La selenocistina eluye en el tiempo muerto, quizás por un efecto de impedimento estérico debido a su gran tamaño y por presencia de dos cargas positivas en la molécula. La selenometionina presenta el mayor tiempo de retención y no se modifica al variar la concentración de TEAB, lo que hace pensar en una interacción con la fase estacionaria a través de un mecanismo de fase inversa con la parte no polar de la molécula. Esto está de acuerdo con lo publicado por Gilon y colaboradores en 1996.

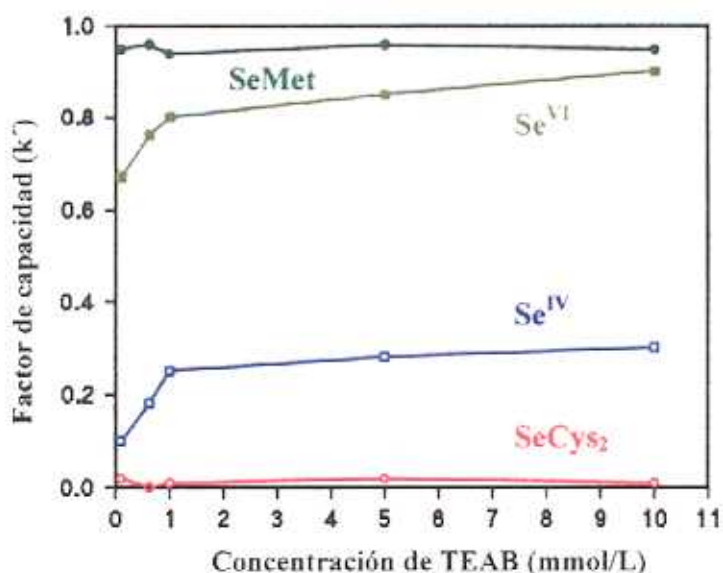


Figura 25. Efecto de la concentración de TEAB sobre la retención de las cuatro especies de selenio estudiadas sobre una columna Hamilton PRP-1 (25 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie).

Es importante considerar el efecto de la concentración de TEAB sobre la anchura de los picos cromatográficos, ya que esto influye directamente sobre la resolución cromatográfica. La Tabla 27 muestra la resolución obtenida entre picos contiguos en función de este parámetro, observándose una pobre resolución cromatográfica a cualquier valor de concentración de contraión estudiado (teniendo en cuenta que para considerar separadas dos especies R_s debe ser ≥ 1.5).

Tabla 27. Valores de R_s obtenidos para diferentes concentraciones de contraión (TEAB) en una columna Hamilton PRP-1.

Especies	Concentración TEAB (mmol/L)				
	0.10	0.62	1.0	5.0	10
SeCys ₂ y Se ^{IV}	0.17	0.25	0.48	0.61	0.73
Se ^{IV} y Se ^{VI}	0.55	0.61	0.82	0.92	1.29
Se ^{VI} y SeMet	0.29	0.27	0.23	0.14	0.06

El aumento de la concentración de TEAB proporcionó un estrechamiento de los picos correspondientes a las especies inorgánicas, no afectando a la elución de los seleno-aminoácidos. Considerando en conjunto ambos aspectos: tiempo de retención y anchura de pico, el aumento de la concentración de contraión mejora la resolución entre SeCys₂ y Se^{IV}, y entre Se^{IV} y Se^{VI}, mientras que empeora para las especies Se^{VI} y SeMet. Como situación de compromiso se eligió una concentración de TEAB 1.0 mmol/L para el estudio del resto de las variables que influyen en la separación cromatográfica.

Efecto del pH de la fase móvil

El pH de la fase móvil influye en esta modalidad cromatográfica sobre el grado de ionización del analito. Un aumento del mismo favorece la formación del par iónico y por lo tanto su retención en la fase estacionaria. El efecto del pH fue evaluado en el intervalo de 3.0 a 7.0, donde las especies inorgánicas se encuentran cargadas negativamente y los seleno-aminoácidos en forma de zwitterion (Tabla 2), no observándose ningún efecto sobre la separación cromatográfica por variación de este parámetro y en consecuencia, se mantuvo el pH en 4.0 para la realización del resto de experimentos.

Efecto del porcentaje del modificador orgánico en la fase móvil

En el estudio del porcentaje de modificador orgánico empleado en la fase móvil, se evaluó el efecto de la adición de acetonitrilo desde 1 a 5% (v/v), no superándose esta

concentración con el fin de evitar fluctuaciones en el plasma. En la Tabla 28 se presenta el efecto de esta variable sobre la resolución de los picos cromatográficos.

El aumento del porcentaje de acetonitrilo de 1 a 5% no afecta a los tiempos de retención de las especies estudiadas, sin embargo provoca un leve ensanchamiento de los picos correspondientes a las especies orgánicas, empeorando la resolución cromatográfica. Por otro lado, el aumento en la cantidad de disolvente orgánico ejerce un efecto reductor en la señal de selenio. En vista de los resultados, se eligió un porcentaje de un 1% de acetonitrilo para el resto de experimentos.

Tabla 28. Efecto del porcentaje de acetonitrilo presente en la fase móvil (1.0 mmol/L de TEAB a pH=4) sobre la resolución cromatográfica, en una columna Hamilton PRP-1.

Especies	Acetonitrilo		
	1%	3%	5%
SeCys ₂ y Se ^{IV}	0.67	0.48	0.41
Se ^{IV} y Se ^{VI}	0.80	0.82	0.80
Se ^{VI} y SeMet	0.27	0.22	0.12

La Figura 26 muestra el cromatograma obtenido para SeCys₂, SeMet, Se^{IV} y Se^{VI} (25 µg/L de Se por especie), bajo las mejores condiciones encontradas en las pruebas experimentales. A pesar de la mejora experimentada, se observa una pobre resolución cromatográfica sin posibilidad de diferenciación entre especies.

Tras la optimización del método se puede concluir que éste no es efectivo ni siquiera para la diferenciación entre los seleno-aminoácidos (SeCys₂ y SeMet), al menos en muestras en las que puedan estar presentes especies inorgánicas.

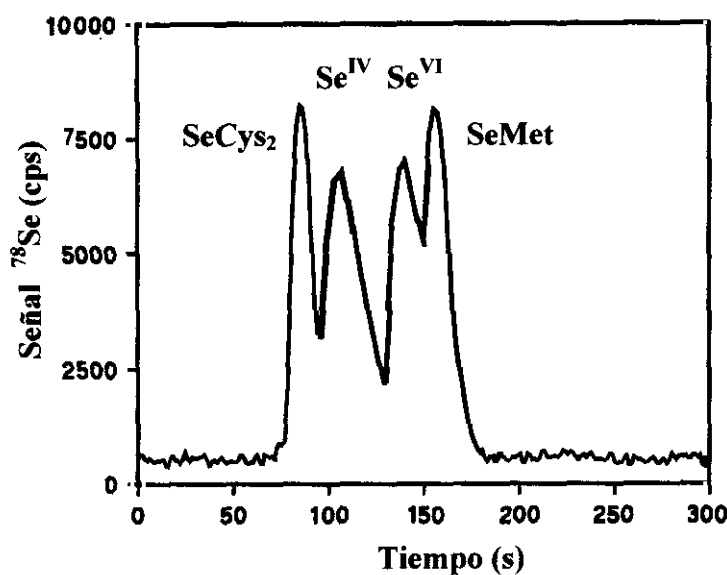


Figura 26. Cromatograma obtenido sobre un columna Hamilton PRP-1, empleando como fase móvil TEAB 1.0 mmol/L a pH=4, en Acetonitrilo al 1% (v/v) a 1.0 mL/min.

1.2.1.2. Empleo de contraíón aniónico

El empleo de un contraíón aniónico se evaluó, con el fin de disponer de un método cromatográfico capaz de diferenciar al menos entre especies orgánicas de selenio. Bajo esta modalidad cromatográfica es de esperar que las especies inorgánicas eluyan juntas en el volumen muerto, sin interferir en la determinación del resto de especies. El estudio se realizó sobre la columna Hamilton PRP-1 empleando como contraíón pentanosulfonato sódico (PSNS). La detección se llevó a cabo por acoplamiento al ICP-MS modelo Eclipse, registrándose la señal de ^{78}Se en el tiempo. En el estudio de las condiciones cromatográficas óptimas, el resto de variables experimentales se mantuvo constante de acuerdo con los datos reflejados en la Tabla 11.

Efecto de la concentración de PSNS

Para comprobar el efecto de la concentración de contraíón presente en la fase móvil sobre la separación cromatográfica, se varió ésta desde 0.1 a 1.0 mmol/L, manteniendo

constante el pH en 4.0 y con un 1% (v/v) de acetonitrilo como modificador orgánico. La Figura 27 muestra el efecto de este parámetro sobre la retención de las especies de selenio en la columna cromatográfica.

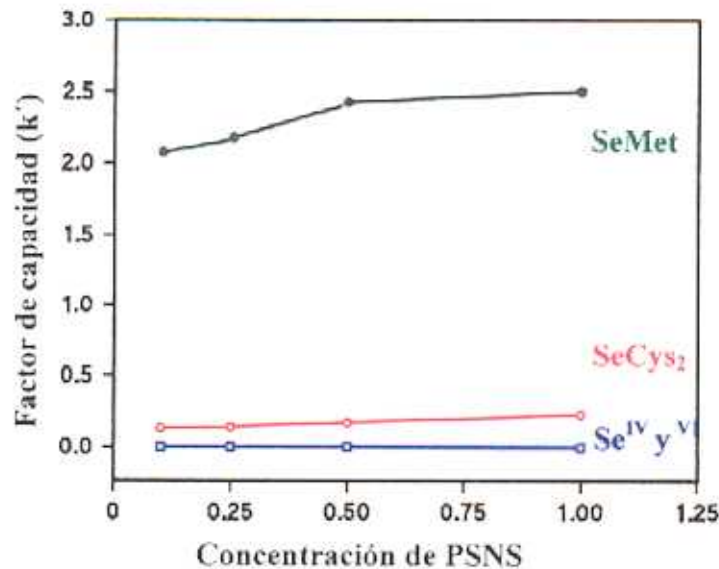


Figura 27. Efecto de la concentración de PSNS sobre los factores de capacidad de las especies de selenio en una columna Hamilton PRP-1 (25 µg/L de selenio por especie).

Las especies de selenio inorgánicas no interaccionan con la fase estacionaria eluyendo de forma conjunta en el volumen muerto y por tanto no se ven afectadas por el aumento de la concentración de PSNS. Sin embargo, el incremento en la concentración de PSNS favorece ligeramente la retención de los seleno-aminoácidos. Mientras que se produce una mayor retención de la especie selenometionina, la selenocistina eluye próxima al tiempo muerto. De nuevo parece que el gran tamaño de su cadena alquílica dificulta la interacción con las pequeñas partículas de la fase estacionaria (tamaño de partícula = 5 µm).

A la vista de los resultados se eligió una concentración de PSNS de 1.0 mmol/L, ya que al aumentar la concentración de PSNS se produce un ligero incremento en la retención de la especie SeCys₂, mejorando la separación entre este seleno-aminoácido y las especies inorgánicas.

Efecto del pH de la fase móvil

Con el objeto de estudiar la influencia del pH de la fase móvil sobre la retención de SeCys₂ y SeMet, este parámetro fue variado desde 2.4 a 7.0. La Figura 28 muestra los resultados obtenidos para una concentración de 25 µg/L de Se por especie.

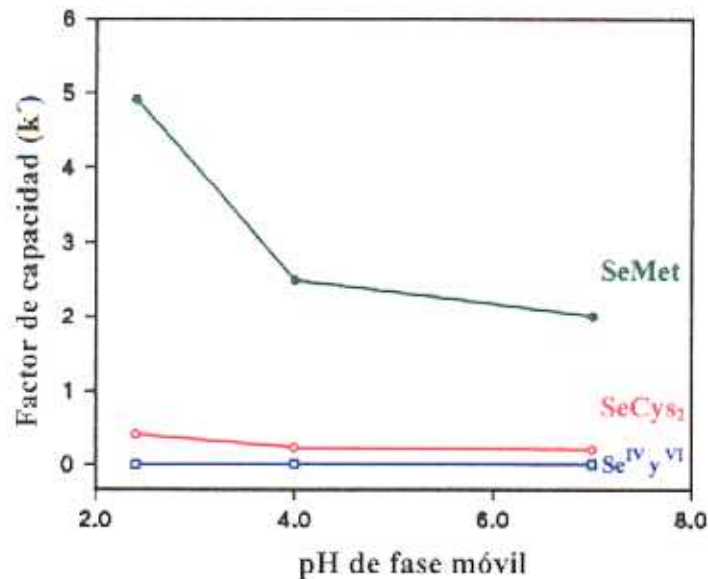


Figura 28. Efecto del pH de la fase móvil (PSNS 1.0 mmol/L a pH=4 y un 1% v/v de acetonitrilo) sobre la retención de las especies de selenio en una columna Hamilton PRP-1.

Al aumentar el pH de la fase móvil se produce una reducción en el tiempo de retención de las especies orgánicas, hecho que es mucho más marcado para la especie SeMet. A pHs ácidos, próximos a 2, los grupos carboxílicos de los aminoácidos se encuentran protonados, confiriendo a las moléculas una carga neta positiva (debido al grupo -NH₃⁺), mientras que a pHs superiores adquieren la forma de zwitterion. Esto podría explicar la reducción en la retención a pHs superiores, donde la carga negativa del grupo carboxilato puede disminuir la formación del par iónico por repulsiones electrostáticas. La especie SeCys₂ posee dos grupos carboxílicos con valores de pKa de 1.68 y 2.15, lo que indica que a pHs próximos a 2 se produce la desprotonación de al menos uno de sus grupos, este hecho puede estar dificultando la formación del par iónico y por lo tanto la retención de esta especie.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó un pH=2.4 para la realización de los estudios posteriores, ya que a este valor de pH se conseguía la mejor separación.

Efecto de la concentración de modificador orgánico

El aumento del porcentaje de acetonitrilo produce una reducción en la retención de las especies orgánicas. Además, la adición de cantidades crecientes de modificador orgánico ocasiona una disminución de la señal de selenio por ICP-MS. En consecuencia se eligió un porcentaje del 1% de acetonitrilo para la separación cromatográfica.

En la Figura 29 se presenta el cromatograma obtenido para las cuatro especies de selenio estudiadas (25 µg/L de selenio por especie) bajo las condiciones de operación optimizadas.

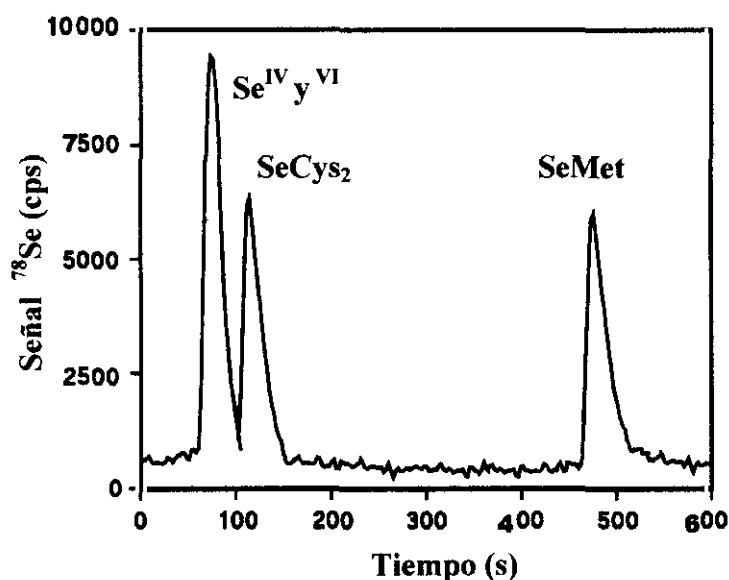


Figura 29. Cromatograma obtenido con una columna Hamilton PRP-1, empleando como fase móvil PSNS 1.0 mmol/L a pH=4.0 y con un 1% (v/v) de acetonitrilo a 1.0 mL/min.

Los resultados obtenidos con esta modalidad cromatográfica no fueron satisfactorios, al no permitir la separación de las especies orgánicas e inorgánicas

simultáneamente. Por ello se inició el estudio de la separación mediante cromatografía de intercambio iónico.

1.2.2. Cromatografía de cambio iónico

El empleo de la cromatografía de cambio iónico para la separación simultánea de especies orgánicas e inorgánicas de selenio no resultaba muy prometedor, debido a la semejanza de sus constantes ácidas (Figura 2). Puesto que en casi todo el intervalo de pH, las especies inorgánicas se encuentran en forma aniónica y los seleno-aminoácidos en forma de zwitterion, se eligió la cromatografía de cambio aniónico.

1.2.2.1. Cambio aniónico fuerte

El estudio se realizó sobre una columna Spherisorb SAX, cuya fase estacionaria está formada por cadenas de octadecil sílice (ODS) con unión a grupos amonio cuaternario [concretamente $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$]. El pH de trabajo queda restringido al intervalo de 2 a 8, por requerimiento de la fase estacionaria, siendo recomendable no alcanzar estos límites.

En la Figura 30 se presenta el cromatograma obtenido para una mezcla de disoluciones patrón conteniendo 20 $\mu\text{g/L}$ de selenio por especie, la elución se realizó empleando como fase móvil una disolución reguladora de fosfato 10 mmol/L a pH 6.8. En estas condiciones de trabajo no fue posible diferenciar entre especies orgánicas, ya que posiblemente la forma de zwitterion que presentan los aminoácidos dificulta su retención en la columna de intercambio aniónico, eluyendo en las proximidades del tiempo muerto (123 s para un caudal de 1.0 mL/min), el cual fue calculado a partir de una disolución conteniendo 20 $\mu\text{g/L}$ de Li^+ y registrando la señal en el tiempo a relación $m/z=7$. Las especies inorgánicas presentan una buena resolución en la separación.

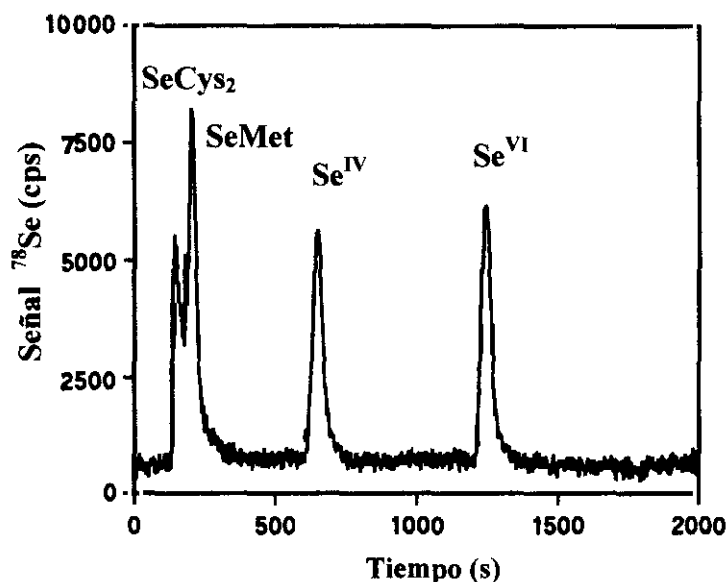


Figura 30. Cromatograma obtenido por cromatografía de cambio aniónico fuerte, con una columna Spherisorb SAX y detección por ICP-MS (20 $\mu\text{g/L}$ de selenio por especie).

Estudios posteriores han desarrollado métodos cromatográficos para la separación de estas especies por cambio aniónico, a través del empleo de fases estacionarias poliméricas, capaces de soportar pHs superiores a 8. De este modo, los seleno-aminoácidos presentan una mayor retención debido a que a pHs tan básicos se presentan en forma aniónica [Emteborg y col., 1998; Alsing Pedersen y col., 1997].

1.2.2.2. Cambio aniónico débil

Los métodos cromatográficos anteriormente descritos no permiten la separación simultánea de especies orgánicas e inorgánicas, haciendo necesario el empleo de dos sistemas cromatográficos diferentes. La separación de especies orgánicas, puede realizarse por cromatografía de fase inversa empleando contraión aniónico, mientras que la separación de especies inorgánicas requiere el empleo de la cromatografía de cambio aniónico. El hecho de trabajar con dos sistemas cromatográficos totalmente diferentes conlleva ciertos inconvenientes prácticos, debido al tiempo requerido por cada fase

estacionaria para la equilibración inicial y la limpieza final. Así pues, la determinación de especies orgánicas e inorgánicas en una muestra, supone un elevado tiempo de análisis.

Con el fin de conseguir la separación simultánea de especies orgánicas e inorgánicas de selenio, se eligió una columna de cambio aniónico débil: Spherisorb ODS/AMINO, cuya fase estacionaria consiste en una mezcla equimolecular de grupos octadecil y amino, sobre un soporte de sílice. Las especificaciones comerciales mostraban un carácter mixto, permitiendo operar tanto en fase inversa como cambio aniónico, siendo necesario para esta última modalidad la protonación de los grupos amino a través de la fase móvil adecuada.

Los estudios presentados en esta sección comenzaron a desarrollarse con acoplamiento al ICP-MS modelo Eclipse, registrando la señal para el isótopo 78 en función del tiempo y se continuaron en el modelo PQ3, monitorizándose la señal del isótopo 82 por su mejor relación señal/ruido. Puesto que las diferencias entre ambos equipos radican en la sensibilidad de la determinación, los parámetros cromatográficos fueron los mismos. El desarrollo experimental se realizó bajo las condiciones operativas indicadas en la Tabla 11. La concentración de selenio para cada una de las especies fue de 20 $\mu\text{g/L}$ en el modelo Eclipse y de 5 $\mu\text{g/L}$ en el modelo PQ3.

El tiempo muerto del sistema se obtuvo a partir del tiempo de elución correspondiente a una disolución de Litio (10 $\mu\text{g/L}$), registrado a $m/z=7$, el cual no interacciona con la fase estacionaria de la columna. Este parámetro fue evaluado a diferentes caudales de fase móvil, resultando un volumen muerto medio de 2.04 ± 0.01 mL.

Influencia del pH de la fase móvil

Para evaluar la influencia del pH sobre la retención de los analitos en la fase estacionaria, se emplearon diferentes disoluciones reguladoras de fosfato 5.0 mmol/L en el intervalo de pH de 2.5 a 7.0. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 31.

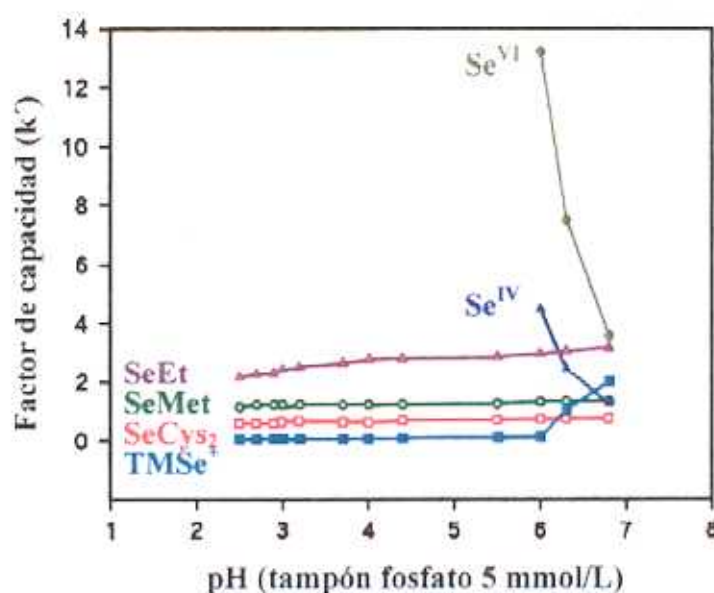


Figura 31. Efecto del pH de la fase móvil (fosfato 5.0 mmol/L) empleada en una columna Spherisorb ODS/NH₂ (5 µg/L de Se por especie).

Como se refleja en la Figura 31, las especies inorgánicas (selenito y seleniato) no eluyen a pHs inferiores a 6. Dentro del intervalo de pH estudiado, ambas especies se encuentran presentes en forma aniónica (HSeO₃⁻ y SeO₄²⁻) mientras que los grupos amino de la fase estacionaria se encuentran protonados (-NH₃⁺), produciéndose una interacción de tipo electrostático. A pHs inferiores a 6, la especie H₂PO₄⁻ predomina en la disolución reguladora, mientras que a pHs más básicos la forma predominante es HPO₄²⁻, la cual compete con las especies inorgánicas de selenio por los grupos -NH₃⁺ de la fase estacionaria, provocando su elución. El aumento de pH de la fase móvil provoca una importante reducción en los tiempos de retención de éstas especies, junto con una reducción en la anchura de sus picos. Las características mostradas corresponden a un proceso de retención-elución a través de un mecanismo de cambio aniónico.

Dentro de las especies orgánicas, el tiempo de retención de los seleno-aminoácidos (SeCys₂, SeMet y SeEt) no se ve apenas influenciado por cambios de pH en la fase móvil, sin embargo el aumento de pH da lugar a un leve incremento en la anchura de los picos cromatográficos. La especie TMSe⁻ eluye en el tiempo muerto a pHs bajos, debido a un

efecto de repulsión electrostática entre el catión y los grupos amino protonados de la fase estacionaria. Esta especie incrementa su retención al aumentar el pH de la fase móvil, junto con un notable ensanchamiento de banda a pHs superiores a 6.0. Este hecho parece indicar una interacción de esta especie con los grupos silanol de la fase estacionaria, que se encontrarán parcialmente desprotonados a estos valores de pH (Si-O⁻).

En la Tabla 29 se muestran los valores de la resolución cromatográfica (R_S) frente al pH de la fase móvil (fosfato 5mmol/L). Los cálculos se han realizado en un intervalo de pH desde 2.5 a 6.0, ya que a pHs más básicos la especie $TMSe^+$ eluye como una banda ancha, interfiriendo notablemente en la resolución cromatográfica.

Tabla 29. Valores de R_S para las especies de Se(5 μ g/L de Se por especie) en función del pH de la fase móvil, en una columna Spherisorb ODS/ NH_2 y a un caudal de 1.0 mL/min.

Especies	pH de fase móvil (fosfato 5 mmol/L)								
	2.5	2.7	3.0	3.2	3.7	4.0	4.4	5.5	6.0
$TMSe^+$ y $SeCys_2$	1.23	1.24	1.22	1.10	1.05	1.03	0.95	0.90	0.83
$SeCys_2$ y $SeMet$	1.35	1.36	1.36	1.28	1.22	1.16	1.14	1.08	1.02
$SeMet$ y $SeEt$	2.52	2.53	2.51	2.48	2.43	2.39	2.36	2.34	2.30
$SeEt$ y Se^{IV}	-	-	-	-	-	-	-	-	1.23
Se^{IV} y Se^{VI}	-	-	-	-	-	-	-	-	8.11

Sobre la tabla se observa que la mejor resolución entre especies orgánicas se produce a pHs ácidos, entre 2.5 y 3.0, sin embargo las especies inorgánicas no eluyen a pH inferiores a 6.0. Debido a los resultados obtenidos, la separación simultánea de las seis especies de selenio podría realizarse a través de un gradiente de pH desde 2.7 a 6.0. En estas condiciones, el análisis no es operativo debido al tiempo necesario para la equilibración de la columna hasta alcanzar el pH deseado, produciéndose la elución de las especies inorgánicas al cabo de aproximadamente una hora desde el inicio del cromatograma. Este hecho obliga a realizar la separación en condiciones de pH isocrático, al pH mínimo donde se produce la elución de las especies inorgánicas (pH=6.0). Sin

embargo, según se observa en la Tabla 29, a este pH se produce un elevado grado de solapamiento entre las especies TMSe^+ y SeCys_2 , con una pobre resolución entre las especies $\text{SeCys}_2/\text{SeMet}$ y $\text{SeEt}/\text{Se}^{\text{IV}}$, menor de 1.5; con el fin de mejorar las condiciones de la separación, se procedió al estudio de otras variables cromatográficas.

Efecto del caudal de fase móvil

El estudio para seleccionar el caudal óptimo de fase móvil empleado en la separación, se llevó a cabo variando este parámetro desde 0.6 a 1.0 mL/min. En la Tabla 30 se indican los resultados obtenidos para la relación " t_r/w " en función del caudal de fase móvil (fosfato 5.0 mmol/L a pH=6.0). El estudio se realizó para cuatro especies de selenio (selenocistina, selenometionina, selenito y seleniato) con una concentración de 5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie.

Tabla 30. Valores de t_r/w obtenidos para especies de selenio en función del caudal de fase móvil (fosfato 5.0 mmol/L a pH=6.0) en una columna Spherisorb ODS/ NH_2 .

Especie	Caudal de fase móvil (mL/min)		
	0.6	0.8	1.0
SeCys_2	3.18±0.05	3.29±0.07	3.43±0.07
SeMet	3.92±0.08	3.98±0.10	4.07±0.08
Se^{IV}	4.24±0.11	5.15±0.12	5.15±0.14
Se^{VI}	10.67±0.16	11.09±0.18	13.67±0.14

Los resultados muestran una mayor relación " t_r/w " y por lo tanto una mejor eficacia de la columna, así como una mejor resolución, para un caudal de fase móvil de 1.0 mL/min, por lo que éste fue elegido como óptimo para el desarrollo del resto de experimentos.

Influencia de la concentración de fase móvil

El estudio de la influencia de la concentración de fase móvil sobre la separación cromatográfica, se llevó a cabo variando la concentración de la disolución fosfato desde 2.5

a 7.0 mmol/L, manteniendo constante el pH en 6.0. El empleo de concentraciones más elevadas de disolución reguladora se encuentra limitado para prevenir la deposición de sales y por lo tanto la obturación del nebulizador y conos del ICP-MS.

La Figura 32 muestra la influencia de la concentración de fosfato sobre la retención de las especies de selenio. La elución de las especies orgánicas no se vio alterada por efecto de este parámetro, como corresponde a un mecanismo de retención-elución a través de un proceso de partición. Por el contrario, el aumento en la concentración de fosfato provoca una considerable reducción en el tiempo de retención de las especies inorgánicas, junto con un ligero estrechamiento de los picos, como corresponde a un mecanismo de cambio iónico.

Por otro lado, al aumentar la concentración de fosfato en la fase móvil, se produce un acercamiento de la especie Se^{IV} a la especie SeEt. La mejor resolución cromatográfica entre estas especies, se produce para una concentración de fosfato de 3.5 mmol/L, donde se alcanza un valor de $R_S=2.60$.

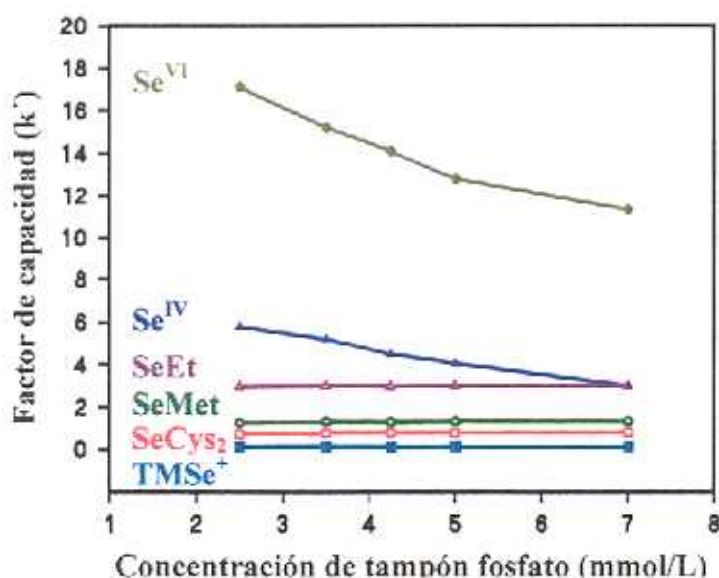


Figura 32. Efecto de la concentración de tampón fosfato empleado como fase móvil a pH=6.0, sobre la retención de las especies de selenio (5 $\mu\text{g/L}$ de Se por cada especie) en una columna Spherisorb ODS/ NH_2 .

De los resultados obtenidos podemos concluir que es necesario el empleo de una concentración de tampón fosfato 3.5 mmol/L para conseguir una óptima separación entre las especies SeEt y Se^{IV}, sin embargo, para esta concentración, la elución de la especie Se^{VI} se retrasa considerablemente, aumentando por ello el tiempo de análisis. Puesto que a mayores concentraciones de fosfato se produce una reducción en el tiempo de retención de esta especie, se procedió a realizar la elución a través de un gradiente de concentración desde 3.5 a 7.0 mmol/L, manteniendo el pH constante en 6.0.

La Figura 33 muestra el cromatograma obtenido, para una concentración de 5 µg/L de selenio por especie, en la separación de las seis especies de selenio (TMSe⁺, SeCys₂, SeMet, SeEt, Se^{IV} y Se^{VI}) sobre la columna Spherisorb ODS/NH₂. La elución se realizó empleando como fase móvil tampón fosfato a pH=6 y con gradiente de concentración desde 3.5 a 7 mmol/L (resto de condiciones indicadas en la Tabla 11). El método propuesto, que en adelante nombraremos como "*método cromatográfico a pH=6*", permite la separación entre las seis especies de selenio, si bien la resolución entre TMSe⁺ y SeCys₂ no es buena.

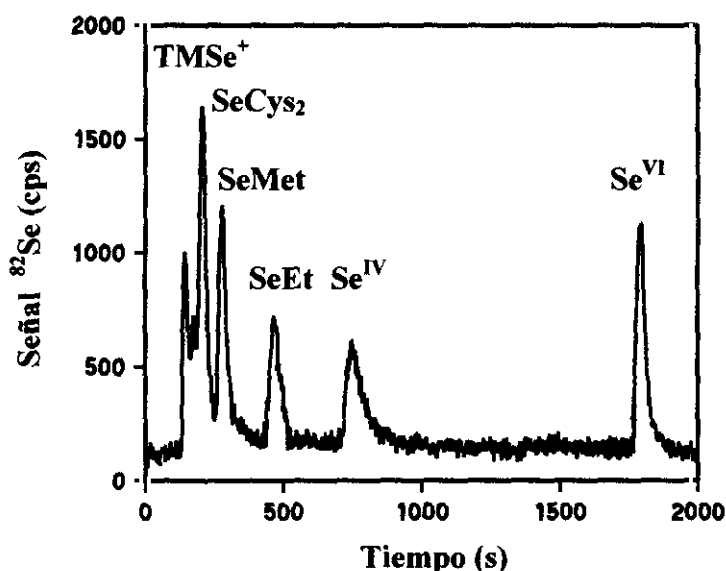


Figura 33. Cromatograma obtenido sobre una columna Spherisorb ODS/NH₂ empleando un gradiente de concentración de fosfato desde 3.5 a 7.0 mmol/L a pH=6.0 (*método cromatográfico a pH=6*).

Observando los datos de resolución cromatográfica expuestos anteriormente en la Tabla 29, se produce una mejora en la separación de especies orgánicas a pHs inferiores a 3.0. La Figura 34 muestra el cromatograma obtenido empleando una fase móvil de fosfato 5.0 mmol/L a pH=2.7, manteniendo constantes el resto de condiciones según las indicadas en la Tabla 11, con una buena resolución entre las cuatro especies orgánicas de selenio. En adelante nos referiremos a este procedimiento como "método cromatográfico a pH=2.7".

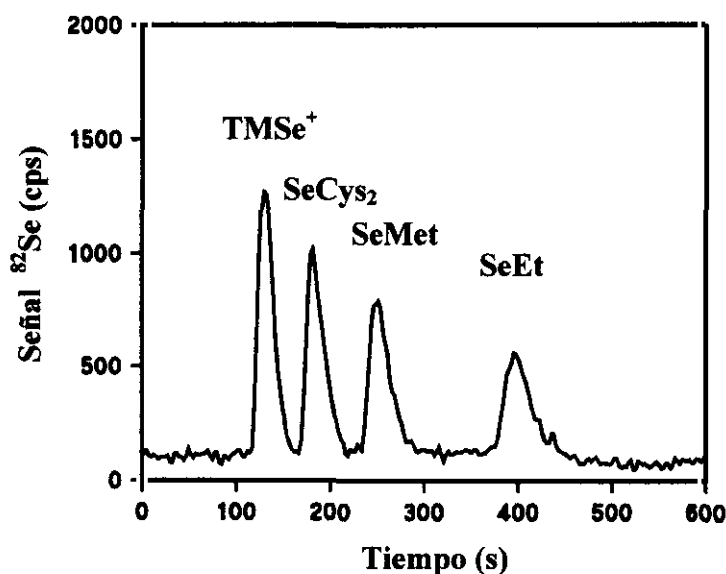


Figura 34. Cromatograma obtenido sobre una columna Spherisorb ODS/NH₂ empleando como fase móvil una disolución de fosfato 5.0 mmol/L a pH=2.7 (*método cromatográfico a pH=2.7*).

En conclusión, es posible realizar la separación y determinación de especies orgánicas e inorgánicas de selenio bajo dos metodologías cromatográficas, mediante un simple cambio de las condiciones de pH y concentración de la fase móvil. Por otro lado, en muestras donde no estén presentes todas las especies de forma simultánea es posible realizar el análisis bajo uno de los métodos indicados.

Efecto de la fuerza iónica

El efecto que la fuerza iónica (μ) ejerce sobre la separación cromatográfica se evaluó registrando los cromatogramas correspondientes a la separación de las seis especies de selenio en concentración de 5 $\mu\text{g/L}$, en presencia de cantidades crecientes de cloruro sódico o de suero salino. El intervalo de fuerza iónica estudiado fue de 1.6 a 850 mmol/L en el caso del NaCl (0.01-5% NaCl p/v) y de 4.0 a 220 mmol/L empleando suero salino (KCl, NaCl, NaHCO_3 y glucosa).

La Figura 35 muestra el efecto de la fuerza iónica sobre la retención de las especies de selenio estudiadas, empleando el *método cromatográfico a pH=6.0*. Se observa que este parámetro no afecta a la elución de los seleno-aminoácidos (SeCys₂, SeMet y SeEt), mientras que su aumento provoca un retraso en la elución de las especies TMSe^+ , Se^{IV} y Se^{VI} . En consecuencia, la salinidad del medio induce a un mayor solapamiento entre las especies TMSe^+ y SeCys₂, hecho que fue observado para cualquier valor de pH de la fase móvil.

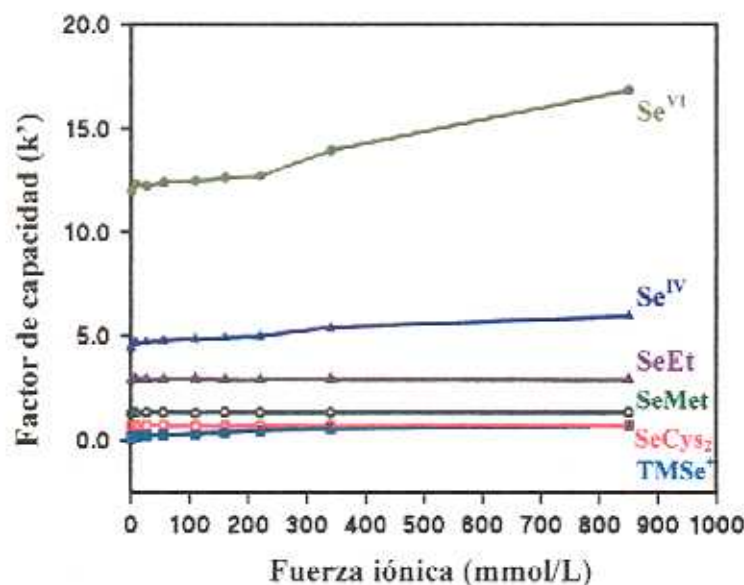


Figura 35. Influencia de la fuerza iónica sobre la retención de las especies de selenio (5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) empleando el *método cromatográfico a pH=6*.

La fuerza iónica del medio además de influir en la resolución cromatográfica puede modificar la señal analítica. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 31 y se han expresado en términos de señal relativa, calculada como la relación entre la señal de selenio en presencia y ausencia de NaCl o suero salino y expresada en porcentaje, la señal fue evaluada en términos de área de pico, registrándose la señal de los isótopos ^{78}Se y ^{82}Se en el ICP-MS.

Tabla 31. Efecto de la fuerza iónica sobre la señal de selenio (5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) por HPLC-ICP-MS empleando el *método cromatográfico a pH=6*.

Fuerza Iónica (mmol/L)	Señal Relativa (%)					
	TMSe ⁺	SeCys ₂	SeMet	SeEt	Se ^{IV}	Se ^{VI}
1.6	98±2	99±2	98±3	101±2	102±3	92±4
4.0	97±3	93±3	102±4	99±3	99±2	99±3
8.0	101±3	99±3	94±4	103±4	103±4	97±2
16.0	99±4	91±5	99±3	97±3	101±3	96±3
18.0	97±3	92±3	103±4	100±4	100±3	91±4
27.0	100±3	93±3	94±3	97±2	102±4	88±3
40.0	102±4	95±4	101±3	95±4	98±3	80±4
55.0	98±3	94±3	102±4	102±3	101±3	70±5
80.0	99±4	89±4	96±3	99±2	98±4	65±4
110.0	96±3	96±4	97±4	97±3	102±3	54±4
170.0	96±4	101±3	98±3	101±2	100±5	50±4
220.0	98±3	95±4	102±4	104±5	103±3	45±3
340.0*	102±3	105±4	98±3	99±2	101±4	42±4
850.0*	103±4	104±3	103±4	101±3	102±3	38±3

* Obtenido sólo a partir de NaCl

Los resultados obtenidos mediante la adición de NaCl o de suero salino, para un mismo valor final de fuerza iónica, no dieron lugar a diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95%. Sobre la tabla se observa ausencia de efecto sobre la señal analítica para todas las especies salvo para Se^{VI} , que experimenta una reducción creciente en la señal obtenida a partir de una fuerza iónica de 27 mmol/L.

Debido al efecto que ejerce la fuerza iónica sobre la elución de la especie TMSe^+ , los estudios relativos a esta especie fueron realizados por separado para evitar el solapamiento con la especie SeCys_2 . El efecto sobre el resto de las especies fue realizado de forma conjunta en la misma disolución.

Características analíticas

La Tabla 32 muestra los datos de calibración y las características analíticas obtenidas para las seis especies de selenio estudiadas, empleando el *método cromatográfico a pH=2.7* para las especies orgánicas y el *método cromatográfico a pH=6* para las especies inorgánicas selenito y seleniato.

Los límites de detección (L.D.) fueron calculados a partir de diez determinaciones de la disolución patrón de menor concentración empleada en el calibrado, ya que la señal procedente del blanco no era discernible de la línea base del cromatograma. La concentración de esta disolución fue de 0.5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie. La precisión del método, expresada como el porcentaje de desviación típica relativa (%RSD), se obtuvo a partir de cinco determinaciones de una disolución patrón conteniendo 5 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie, resultando en todos los casos mejor que el 4%.

Tabla 32. Datos de calibración y características analíticas para la determinación de especies de selenio por HPLC-ICP-MS (volumen de inyección de 100 μ L).

Especie	Ecuación de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)c$	r^2	L.D. (μ g/L Se)	RSD/% (5 μ g/L)
TMSe ⁺	$y = (-3 \pm 6) \times 10^2 + (673 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9994	0.09	3.2
SeCys ₂	$y = (-4 \pm 6) \times 10^2 + (650 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9996	0.10	2.8
SeMet	$y = (4 \pm 6) \times 10^2 + (618 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9996	0.11	3.5
SeEt	$y = (-2 \pm 7) \times 10^2 + (599 \pm 9) \times 10^1 c$	0.9996	0.13	3.0
Se ^{IV}	$y = (4 \pm 7) \times 10^2 + (604 \pm 8) \times 10^1 c$	0.9992	0.12	3.3
Se ^{VI}	$y = (-4 \pm 6) \times 10^2 + (662 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9996	0.09	2.9

"c" es la concentración de Se en μ g/L e "y" corresponde al área del pico cromatográfico a relación $m/z=82$, para el tiempo de integración empleado de 2.5 s.

Los resultados indicados en la Tabla 32 corresponden a los ensayos realizados con el modelo PQ3, registrando la señal del isótopo ⁸²Se con el tiempo. Los límites de detección obtenidos con el modelo Eclipse para la relación $m/z=78$ fueron peores debido al mayor nivel de fondo que presenta el instrumento, resultando de 2.0, 2.0, 1.0, 2.3, 1.6 y 1.2 μ g/L de selenio para las especies TMSe⁺, SeCys₂, SeMet, SeEt, Se^{IV} y Se^{VI} respectivamente. Puesto que las posteriores aplicaciones a muestras fueron realizadas sólo con el modelo PQ3, no se ha considerado de interés presentar otra tabla de características analíticas correspondientes al modelo Eclipse.

El método propuesto fue aplicado al análisis de dos muestras de agua con valores de concentración recomendados para las especies de selenio inorgánico (BCR CRM 602 y 603). La validación del método para las especies orgánicas de selenio fue realizado a través de estudios de recuperación, debido a la ausencia de materiales certificados. La Tabla 33 muestra los resultados obtenidos.

La presencia de 20 g/L de NaCl en la matriz de ambos materiales de referencia ($\mu=340$ mmol/L) hizo necesario realizar la calibración a través del método de adiciones estándar para la cuantificación de la especie Se^{VI} . Los estudios de recuperación para las especies TMSe^+ y SeCys_2 fueron realizados de forma separada debido al solapamiento que se produce en la elución de dichas especies, al nivel de fuerza iónica mencionado.

Los resultados de la Tabla 33 muestran la ausencia de diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre los valores encontrados y los valores recomendados, junto con una excelente recuperación de las especies orgánicas adicionadas. Todos los valores se encuentran comprendidos dentro del intervalo 96-104%.

Tabla 33. Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de especies de selenio por HPLC-ICP-MS, bajo las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 11.

Muestra	Especie	Se recomendado ($\mu\text{g/L}$)	Se adicionado ($\mu\text{g/L}$)	Se encontrado ($\mu\text{g/L}$)	%Recuperación
CRM 602	Se^{IV}	5.5 ± 0.4		5.6 ± 0.3	
	Se^{VI}	7.6 ± 0.6		7.4 ± 0.4	
	TMSe^+		5.0	5.2 ± 0.3	104 ± 6
	SeCys_2		5.0	4.8 ± 0.2	96 ± 4
	SeMet		5.0	4.9 ± 0.2	98 ± 4
	SeEt		5.0	5.1 ± 0.3	102 ± 6
CRM 603	Se^{IV}	35 ± 2		36 ± 1	
	Se^{VI}	45 ± 4		41 ± 1	
	SeCys_2		20	20.3 ± 0.5	101 ± 2
			40	41 ± 1	103 ± 3
	SeMet		20	19.6 ± 0.8	98 ± 4
			40	39 ± 1	96 ± 3

Como sucede generalmente en los métodos cromatográficos, la aplicación a muestras ofrece mayores dificultades frente al análisis de disoluciones patrón, cuyo medio es simplemente agua destilada. En este caso, la salinidad de la matriz afecta seriamente a la elución de las especies TMSe^+ y Se^{VI} . La interferencia mostrada en la determinación de la especie seleniato puede ser evitada a través de la aplicación del método de calibración por adiciones estándar. Sin embargo, la interferencia mostrada por la salinidad del medio sobre la elución de la especie TMSe^+ es un problema de mayor consideración, aunque sólo afectará a aquellas muestras donde estén presentes las especies TMSe^+ y SeCys_2 de forma simultánea. En este casos, el problema puede solucionarse por dos vías:

1. Debido a la elevada sensibilidad de la técnica de detección (ICP-MS), en muchos casos es posible emplear la simple dilución de la muestra para reducir su fuerza iónica.
2. Cuando el nivel de concentración de estas especies en la muestra sea muy bajo y no permita la dilución de la misma, es posible llevar a cabo la cuantificación realizando el cromatograma a dos pHs diferentes. Por un lado, a $\text{pH} < 6$ donde se realizaría la cuantificación del conjunto debido al solapamiento de ambas especies, y por otro lado a pHs superiores (6-7), donde la especie TMSe^+ retrasa considerablemente su tiempo de elución permitiendo la cuantificación de la especie SeCys_2 . La concentración de TMSe^+ en la muestra se obtendría por diferencia.

2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ORINA

2.1. INTRODUCCIÓN

Parte del selenio ingerido por el hombre y por los animales terrestres es excretado a través de la orina, es por ello que la determinación de selenio en este fluido biológico se emplea como un indicador del nivel de este elemento en el organismo. En la orina humana, cantidades de selenio entre 20 y 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ se consideran como nivel de excreción normal, mientras que la excreción de niveles de concentración fuera de este intervalo, se ha asociado a problemas tanto de deficiencia como de toxicidad en este elemento [Sanz Alaejos y col., 1993 y 1995]. Sin embargo, conocer únicamente la concentración total de selenio en la orina ofrece poca información, siendo necesario el conocimiento de las formas químicas y de su concentración, para poder ayudar a los especialistas a completar el ciclo biológico de este elemento en el organismo.

La tarea del químico analítico comprende el desarrollo de métodos de análisis aplicables a muestras, pero en muchos casos, la complejidad de la matriz, así como los bajos niveles de concentración en que se encuentran las especies a analizar, dificulta la etapa de aplicación. Algunos métodos propuestos para la determinación de especies de selenio en orina han sido aplicados a muestras enriquecidas [Blais y col., 1991; Marchante-Gayón y col., 1996], sin embargo, pocos trabajos han conseguido la identificación de especies presentes en la orina, mostrando en general diferencias entre ellos [Fodor y col., 1983; Yang y col., 1995; Das y col., 1996; González LaFuente y col., 1996].

Palmer y colaboradores, en 1970, fueron los primeros en identificar la especie TMSe^+ como el producto mayoritario de la excreción de selenio a través de la orina. Puesto que gran parte de los mecanismos biológicos implican reacciones de reducción y metilación, desde los primeros estudios se ha considerado a esta especie como unos de los productos resultantes del mecanismo de detoxificación del organismo [Palmer y col., 1969; Foster y col., 1984; Glover y col., 1979; Nahapetian y col., 1984; Janghorbani y col., 1989]. Posteriores estudios han corroborado la presencia de esta especie en la orina, aunque en un intervalo de concentración muy variado, del 10 al 70% del selenio total

[Kraus y col., 1985; Blotcky y col., 1985 y 1987; Shibata y col., 1992]. Otros trabajos publicados muestran la presencia mayoritaria de especies inorgánicas de selenio en orina humana, con una menor presencia e incluso ausencia, de la especie TMSe^+ . Por ejemplo, Yang y colaboradores en 1995, encontraron una mayor contribución de la especie Se^{IV} (entre 100 y 400 $\mu\text{g/L}$), mientras que la especie TMSe^+ fue detectada en algunas de las muestras y a un nivel de concentración de tan sólo 10 $\mu\text{g/L}$. Por otro lado, Fodor y Barnes en 1983, realizaron el análisis de especies de selenio inorgánico en la orina de once individuos sanos, encontrando un contenido medio de Se^{VI} (8.6 $\mu\text{g/L}$) tres veces superior a la concentración de Se^{IV} (3.1 $\mu\text{g/L}$). A diferencia de los anteriores, Muñoz Olivas y colaboradores en 1996, encontraron en orina humana un pico principal que podía ser atribuido a la especie SeCys_2 , sin evidencia de la presencia de la especie TMSe^+ . Mientras que otros trabajos muestran la presencia de selenio inorgánico en la orina humana, junto con otras especies de selenio desconocidas, diferentes a SeMet , SeEt , TMSe^+ , DMSe_2 , MMSe [González LaFuente y col., 1996].

El carácter esencial del selenio y los desórdenes biológicos provocados por su deficiencia en el organismo, ha conducido a diversos estudios sobre la incorporación del selenio administrado de forma suplementaria en la dieta. La biodisponibilidad del selenio y su distribución en el organismo depende en una gran extensión del tipo de especies ingeridas, produciéndose una mayor retención de la especie SeMet frente a la administración de otros seleno- aminoácidos o especies inorgánicas [Thomson, 1998]. En estos estudios, el análisis de la orina es de gran interés, ya que permite evaluar la relación entre las especies de selenio ingeridas y excretadas.

Se ha comprobado que tras la administración de elevadas cantidades de selenometionina y selenocistina a ratas, se produce un incremento en la excreción de TMSe^+ en la orina [Kraus y col., 1985; Foster y col., 1986]. Blotcky y colaboradores, en 1985, observaron un aumento en el nivel de concentración de la especie TMSe^+ en la orina de trabajadores expuestos a este elemento. Por otro lado, la ingestión de vitaminas enriquecidas con Se^{VI} o SeMet conduce a un aumento en la excreción de Se^{VI} y SeCys_2 en la orina [Gómez y col., 1998]. En conclusión, aunque muchos autores han encontrado cantidades significativas de la especie TMSe^+ en la orina, los altos niveles de

concentración parecen estar asociados a un exceso en la ingestión [Shibata y col., 1992] y las diferencias encontradas en cuanto a las especies presentes en la orina de forma original, pueden proceder de diferencias en la alimentación.

La complejidad de la matriz de la muestra hace necesario abordar los problemas de estabilidad y almacenamiento de la misma. Se han realizado varios estudios sobre la estabilidad de especies de selenio en disolución acuosa [Cobo y col., 1994; Héninger y col., 1997; Muñoz Olivas y col., 1998]. Muñoz Olivas y colaboradores, en 1998, observaron una excelente estabilidad para las especies TMSe^+ , SeCys_2 y SeMet durante tres meses bajo todas las condiciones estudiadas, aunque las mejores condiciones de almacenamiento se encontraron en contenedores de vidrio pyrex a 4 y 20 °C y en oscuridad. Las especies inorgánicas en solución acuosa se han mostrado estables durante doce meses en contenedores de PTFE a -20 °C, en estas condiciones no es necesario acidificar las muestras [Cobo y col., 1994].

Estos resultados no pueden extrapolarse a los fluidos biológicos, ya que la presencia de la matriz puede modificar las condiciones de muestreo y almacenamiento. En contraste con la mayoría de elementos, la contaminación de selenio es poco probable, sin embargo la estabilidad de las especies de selenio es un problema a considerar. A temperatura ambiente la proliferación bacteriana transforma la urea en amoníaco, causando una orina alcalina. Los cambios de pH pueden afectar a la composición de la orina [Ames, 1987] y a la estabilidad de las especies de selenio [Héninger y col., 1997]. Algunos autores aseguran la estabilidad del selenio cuando las muestras de orina se almacenan a 4 °C en botellas de polietileno durante 12 horas [Sanz Alaejos y col., 1995], sin embargo el estudio se refiere al contenido en selenio total, y por lo tanto no considera la posible transformación de especies. Recientemente, se ha estudiado la estabilidad de las especies TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet , Se^{IV} y Se^{VI} en muestras de orina filtradas a través de cartuchos de C_{18} durante un periodo de tiempo de dos días [Gómez y col., 1998]. Las muestras de orina adicionadas con 100 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie fueron almacenadas en frascos de polietileno a -4 °C, mostrando pérdidas para las especies Se^{IV} y SeCys_2 en un tiempo superior a ocho horas desde la toma de muestra. Los autores recomiendan el análisis inmediato de las muestras de orina para evitar pérdidas de estas especies.

El objetivo principal de este estudio se encaminó hacia la determinación de especies de selenio en orina humana, junto con la descripción de un tratamiento de muestra capaz de mejorar la estabilidad de las especies presentes y así evitar la necesidad de un análisis inmediato.

2. 2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ORINA

Las muestras de orina pueden ser analizadas por simple dilución en agua Milli-Q, generalmente 1/5, e inyección directa en la columna cromatográfica [Yang y col., 1995]. De este modo se realizó el análisis de muestras de orina procedentes de tres individuos sanos, a los que nos referiremos como A, B y C, todos ellos sujetos a una dieta alimenticia normal. Los análisis se realizaron a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS con el modelo PQ3, registrando la señal en función del tiempo para los isótopos ^{82}Se y ^{78}Se . Los resultados obtenidos para ambas relaciones m/z fueron los mismos, diferenciándose tan sólo en su correspondiente relación señal/ruido (ver Estudios Preliminares en el Capítulo IV).

Las Figuras 36 y 37 muestran los cromatogramas obtenidos para las tres muestras de orina a través de los *métodos cromatográficos a pH=2.7 y 6.0* respectivamente (apartado 1.2.2.2.). Puede observarse como el perfil cromatográfico obtenido para las tres muestras fue cualitativamente el mismo. En todos los casos, se obtuvieron dos picos a pH=2.7 y 3 picos a pH=6.0. Para la identificación de las especies presentes en las muestras de orina se procedió a la adición de disoluciones patrón de las especies conocidas. La Figura 38 muestra la comparación de los cromatogramas obtenidos para la orina_A (a dilución 1/5), con y sin la adición de 5 $\mu\text{g/L}$ de Se para las especies TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet y SeEt , a través del *método cromatográfico a pH=2.7*. Por otro lado, la Figura 39 muestra la comparación entre el cromatograma obtenido para la misma muestra (dilución 1/5), empleando el *método cromatográfico a pH=6.0*, y la adición de 5 $\mu\text{g/L}$ de Se para las especies orgánicas e inorgánicas (TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI}).

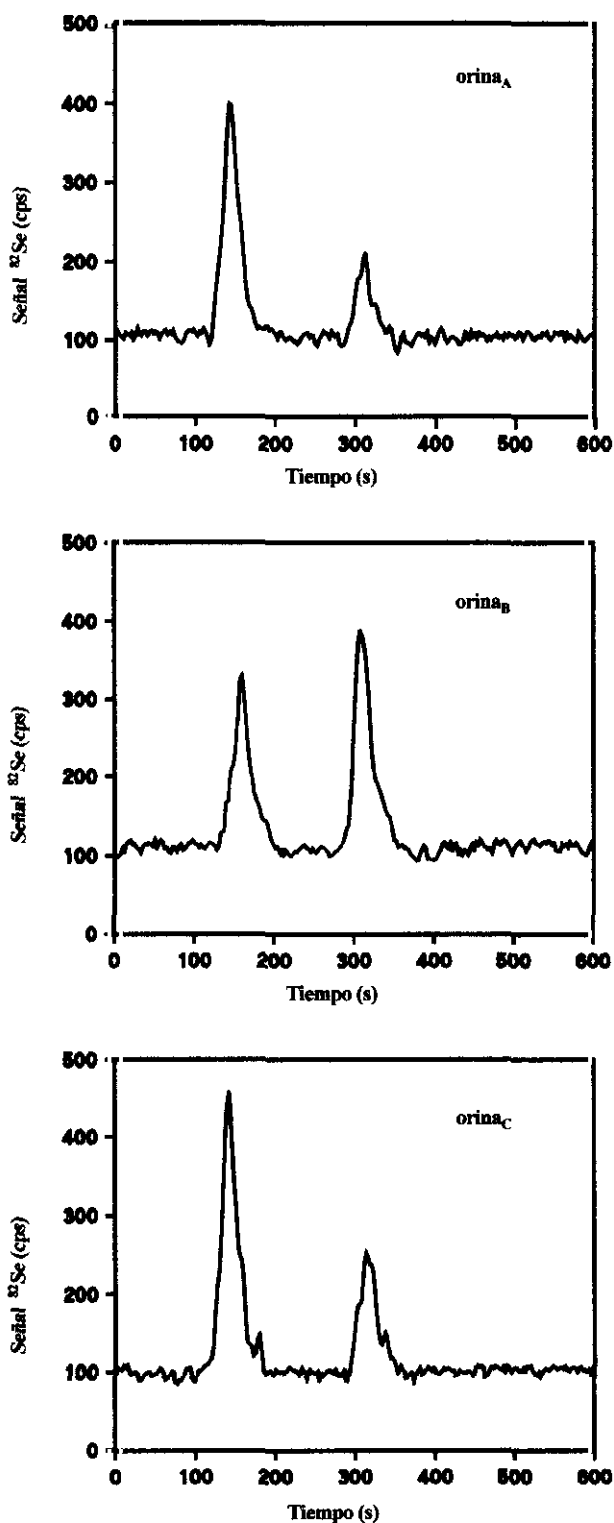


Figura 36. Cromatogramas obtenidos por HPLC-ICP-MS, para las muestras de orina (dilución 1/5) de tres individuos (A, B y C) a través del *método cromatográfico a pH=2.7* (Spherisorb ODS/NH₂, fosfato 5 mmol/L a pH=2.7).

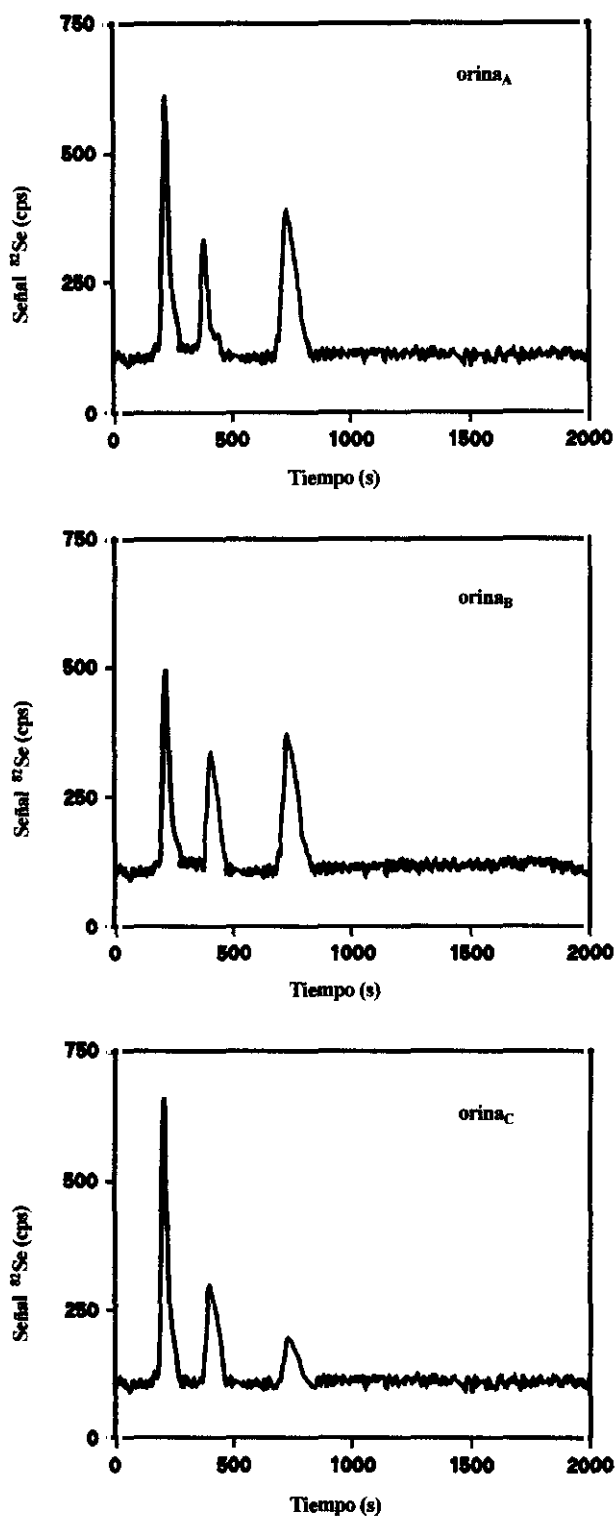


Figura 37. Cromatogramas obtenidos por HPLC-ICP-MS, para las muestras de orina (dilución 1/5) de tres individuos (A, B y C) a través del *método cromatográfico a pH=6.0* (Spherisorb ODS/NH₂, fosfato 3.5 y 7 mmol/L a pH=6.0).

El primer pico presente en la orina, eluye a 150 segundos bajo el *método cromatográfico a pH=2.7*, y retrasa ligeramente su elución en el *método cromatográfico a pH=6.0*. La Figura 39 muestra que no es posible diferenciar entre las especies TMSe^+ y SeCys_2 a $\text{pH}=6.0$, mientras que en la Figura 38 se observa la elución de ambas especies por separado con el *método cromatográfico a pH=2.7*. El aumento en el área del primer pico presente en la muestra tras la adición de la especie TMSe^+ , permite asegurar la ausencia de SeCys_2 en la orina y la probable presencia de TMSe^+ , lo que se corresponde con gran parte de los antecedentes bibliográficos. Debido a que la elución de esta especie se produce en el volumen muerto a $\text{pH}=2.7$, no se ha descartado la posibilidad, de que este primer pico que aparece en los cromatogramas de las muestras de orina, se deba a otra especie catiónica de selenio o a una mezcla de varias, como son la selenoniocolina $[(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$ y la selenoniobetaina $[(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{CH}_2\text{COOH}]$.

El segundo pico encontrado en el análisis de las muestras de orina eluye a 315 segundos en el *método cromatográfico a pH=2.7* y a 340 segundos a $\text{pH}=6.0$. Como se observa en las Figuras 38 y 39, la elución se produce entre las especies SeMet y SeEt . Este pico presente en la muestra no puede ser atribuido a ninguna de las especies de selenio estudiadas, ya que la adición de disoluciones estándar no induce a un aumento en el área del pico encontrado en la muestra. El tiempo de retención de la especie desconocida sugiere la posibilidad de que se trate de otro seleno-aminoácido diferente a los estudiados, o de una forma metilada de la especie SeMet . En adelante nos referiremos a esta especie como "*Desconocida₁ (D₁)*".

El tercer pico encontrado en las tres muestras de orina sólo eluye a través del *método cromatográfico a pH=6.0*, al igual que las especies inorgánicas. Con un tiempo de retención de 630 segundos, era de esperar que correspondiera a la especie Se^{IV} , sin embargo, como se muestra en la Figura 39, la adición de disoluciones estándar de esta especie provoca la aparición de otro pico próximo al anterior, pero con diferente tiempo de retención. Puesto que no fue posible identificar esta especie presente en las muestras de orina, en adelante nos referiremos a ella como "*Desconocida₂ (D₂)*". El hecho de que esta especie desconocida de selenio no eluya a pH s de fase móvil ácidos, sugiere la presencia de un fuerte carácter aniónico como ocurre con las especies inorgánicas.

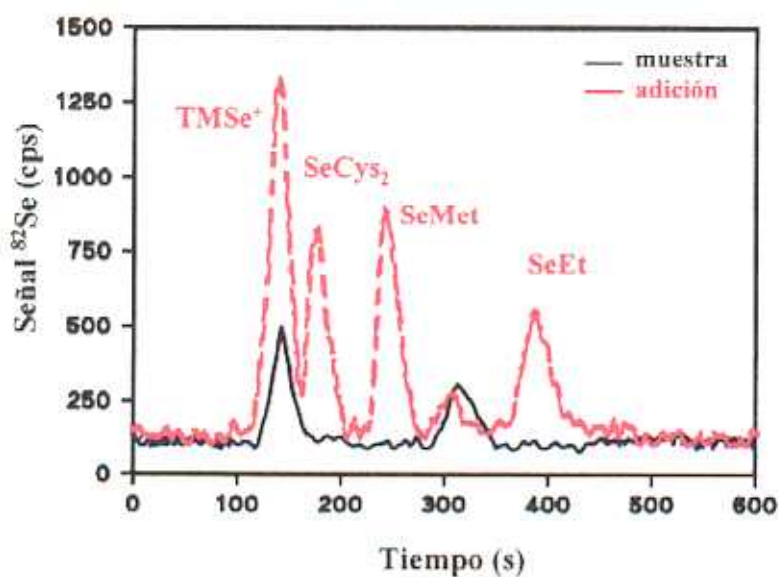


Figura 38. Comparación entre el cromatograma obtenido para la orina (individuo A) a dilución 1/5 y su adición de 5 µg/L de Se como TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet y SeEt , a través del método cromatográfico a $\text{pH}=2.7$.

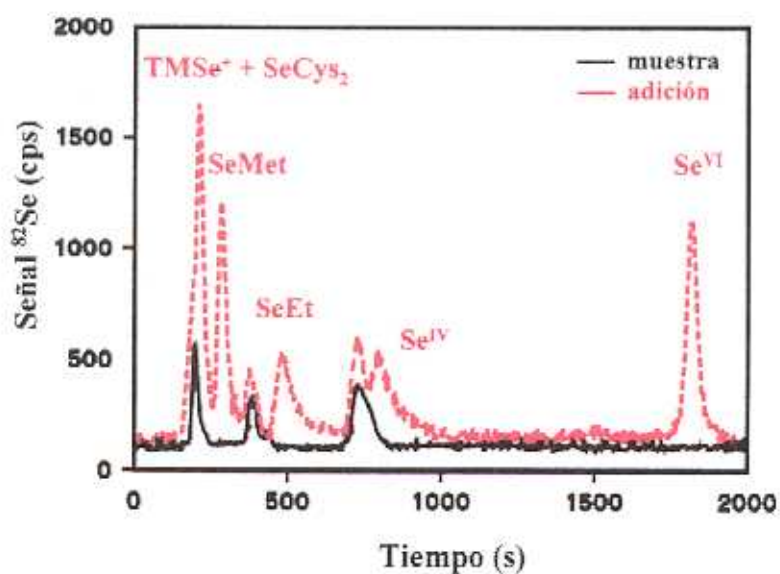


Figura 39. Comparación entre el cromatograma obtenido para la orina (individuo A) a dilución 1/5 y su adición de 5 µg/L de Se como TMSe^- , SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} a través del método cromatográfico a $\text{pH}=6.0$.

La Figura 40 muestra el cromatograma obtenido para la muestra de orina del individuo A (dilución 1/5) con adición de la especie Se^{IV} y empleando como fase móvil una disolución de fosfato 2.5 mmol/L a pH=6. Al reducir la concentración de la fase móvil, se produce un retraso en la elución de la especie Se^{IV} adicionada, mejorando la resolución entre las especies D_2 y Se^{IV} . El hecho de que la elución de la especie D_2 no se vea afectada por la concentración de la fase móvil, a diferencia de las especies de selenio inorgánicas, pero si por el pH de ésta, sugiere un mecanismo de retención-elución mixto entre fase inversa y cambio aniónico, lo que hace pensar en una molécula orgánica cargada negativamente.

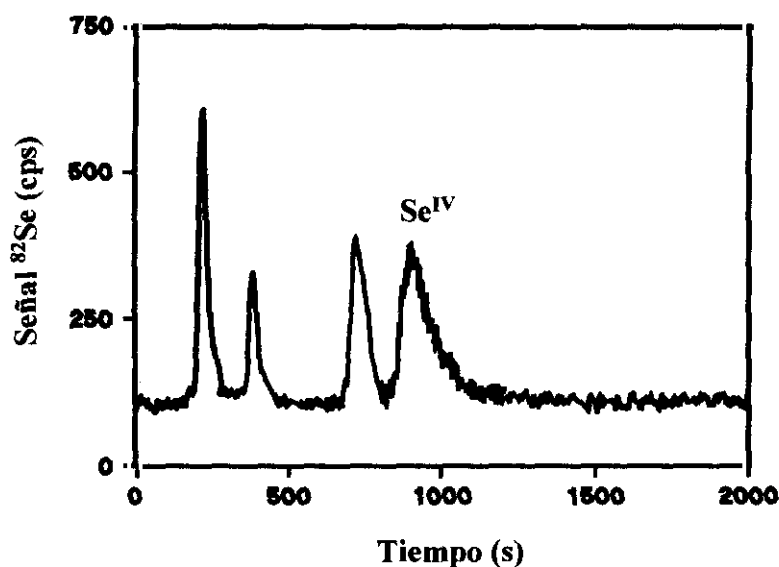


Figura 40. Cromatograma obtenido en la columna Spherisorb ODS/ NH_2 para la orina (individuo A) a dilución 1/5, con la adición de $5 \mu\text{g/L}$ de Se^{IV} , empleando como fase móvil una disolución de fosfato 2.5 mmol/L a pH=6.

En conclusión, puesto que no se encontraron evidencias de la presencia de la especie SeCys_2 , evitando así su solapamiento con la especie TMSe^+ en el *método cromatográfico a pH=6.0*, y dado que las especies desconocidas (D_1 y D_2) no solapan en su elución, las muestras de orina pueden ser analizadas empleando éste como único procedimiento cromatográfico.

2.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Las muestra de orina deben ser almacenadas a 4 °C y analizadas dentro de las primeras ocho horas desde su recolección [Ames, 1987]. Esta inestabilidad de las muestras sugiere la necesidad de estabilizarlas para evitar el análisis inmediato de las mismas. Con esta finalidad, algunos autores adicionan a la orina compuestos como son: tolueno, formaldehído, ácido clorhídrico, ácido nítrico y otros, para así prevenir la proliferación bacteriana y minimizar las pérdidas de selenio por adsorción [Sanz Alaejos y col., 1995]. Sin embargo, estos aditivos pueden inducir a la transformación de especies, así como producir interferencias en la técnica instrumental empleada en el análisis. Otros trabajos muestran complejos métodos de tratamiento de muestra, basados en la precipitación de proteínas, preconcentración de especies de selenio mediante evaporación a sequedad y posterior redisolución del residuo en un pequeño volumen [Blais y col., 1991]. El estudio se realizó sobre muestras de orina adicionadas con las especies TMSe^+ y selenionicolina $[(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$, sin embargo, los métodos que implican procedimientos de precipitación y evaporación pueden dar lugar a pérdidas de especies debido a procesos de adsorción o volatilización.

Ya que la inestabilidad de las muestras de orina procede de su matriz orgánica, se pensó en su eliminación a través de un sencillo tratamiento por extracción en fase sólida, empleando cartuchos de C_{18} .

En el intervalo de pH de trabajo (entre 2.7 y 6.0), todas las especies de selenio estudiadas se encuentran en forma iónica (Figura 2). Las especies inorgánicas están presentes como HSeO_3^- y SeO_4^{2-} , la especie trimetilselenonio es un catión y los selenoaminoácidos (SeCys_2 , SeMet y SeEt) están presentes como zwitteriones (Tabla 2). Puesto que sólo las especies no polares pueden ser retenidas en los cartuchos de C_{18} , las especies de selenio serán eluidas y por lo tanto separadas de la mayor parte de la matriz orgánica. Sin embargo, la matriz de la orina podría inducir a un cambio en el comportamiento de estas especies, por ello se procedió a estudiar la recuperación de todas las especies después de la filtración de las muestras enriquecidas, a través de cartuchos de C_{18} .

Tabla 34. Estudio de recuperación sobre muestras de orina procesadas a través de cartuchos de C₁₈, adicionadas con 5 µg/L de cada una de las especies de selenio. Los resultados son la media ± s, para 3 experimentos separados.

Especie	Disolución de lavado	
	Agua Milli-Q	Fosfato 3.5 mmol/L (pH=6)
TMSe ⁺	97 ± 4%	101 ± 3 %
SeCys ₂	73 ± 8%	94 ± 4 %
SeMet	89 ± 7%	98 ± 3 %
SeEt	71 ± 5%	95 ± 5 %
Se ^{IV}	102 ± 4%	99 ± 4 %
Se ^{VI}	96 ± 5%	98 ± 3 %
D ₁	85 ± 5%	97 ± 6 %
D ₂	90 ± 4%	102 ± 5 %

El estudio se realizó a través de la adición de 0.1 µg de cada una de las especies de selenio a diferentes alícuotas de orina humana (8 mL). Cada alícuota fue dividida en dos fracciones y sólo una de ellas fue procesada a través de los cartuchos de C₁₈. Las fracciones filtradas fueron sometidas a dos procedimientos de lavado de los cartuchos: uno empleando 5 mL de agua Milli-Q y el otro con 5 mL de disolución de fosfato 3.5 mmol/L a pH=6.0. Finalmente, todas las porciones fueron diluidas a 10 mL con agua Milli-Q e inyectadas en la columna analítica. En el caso de las especies desconocidas de selenio presentes en la muestra de orina (D₁ y D₂), se obtuvieron los resultados por comparación entre los obtenidos antes y después del filtrado en los cartuchos. La Tabla 34 muestra las recuperaciones obtenidas, las cuales se evaluaron como el porcentaje de la relación entre la señal de selenio obtenida para las muestras no filtradas y para las muestras procesadas a través de los cartuchos de extracción. Los resultados muestran pérdidas de alrededor del 30% para las especies SeCys₂ y SeEt cuando los cartuchos de C₁₈ eran lavados con agua Milli-Q, mientras que con el empleo de disolución fosfato en la fase de lavado, las recuperaciones se muestran prácticamente del 100% para todas las especies de selenio. Las pérdidas de especies orgánicas mostradas en el estudio de recuperación, podrían atribuirse

a una retención parcial sobre la fase estacionaria de C_{18} , este hecho se ve compensado con un incremento en la fuerza iónica de la disolución empleada en el lavado. Basándonos en los resultados obtenidos, el lavado con disolución de fosfato (3.5 mmol/L a pH=6) fue elegido como óptimo para el desarrollo de los experimentos posteriores

El tratamiento de muestra propuesto, como se expondrá más adelante, proporciona una mayor estabilidad a la muestra, haciendo posible que el análisis pueda efectuarse después de una semana desde su recolección.

2.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO PARA SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS DE ORINA

2.4.1. Determinación de selenio total

El contenido de selenio total presente en las muestras de orina fue determinado por nebulización directa en el ICP-MS, se eligió la introducción de muestra por inyección en flujo con el fin de minimizar las posibles interferencias de matriz además de emplear un pequeño volumen de muestra en el análisis.

La cuantificación del selenio total en muestras no sometidas a mineralización, no es posible con el empleo de técnicas de detección que muestren diferencias en la eficiencia de la atomización y de la ionización según la especie estudiada, este es el caso de la absorción atómica con atomización electrotérmica, donde las especies orgánicas muestran menor eficiencia de atomización que las especies inorgánicas. En ICP-MS, la eficiencia en la atomización e ionización de las seis especies de selenio estudiadas es la misma ($TMSe^+$, $SeCys_2$, $SeMet$, $SeEt$, Se^{IV} y Se^{VI}). La Tabla 35 muestra las curvas de calibrado obtenidas a través del acoplamiento FI-ICP-MS, para cada una de las especies de selenio. Los resultados muestran la ausencia de diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, por lo que es posible la cuantificación del selenio total a través de la calibración con cualquiera de las especies de selenio, y en consecuencia se eligió la especie Se^{IV} .

Tabla 35. Ecuaciones de calibración para las distintas especies de selenio por FI-ICP-MS a relación m/z=82 (modelo PQ3).

Especie	Ecuación de calibración $y = (a \pm ts_a) + (b \pm ts_b)$	r^2
TMSe ⁺	$y = (-2 \pm 3) \times 10^2 + (687 \pm 8) \times 10^1 c$	0.9994
SeCys ₂	$y = (-2 \pm 4) \times 10^2 + (684 \pm 9) \times 10^1 c$	0.9992
SeMet	$y = (2 \pm 4) \times 10^2 + (692 \pm 8) \times 10^1 c$	0.9996
SeEt	$y = (3 \pm 4) \times 10^2 + (684 \pm 9) \times 10^1 c$	0.9992
Se ^{IV}	$y = (2 \pm 3) \times 10^2 + (690 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9996
Se ^{VI}	$y = (-2 \pm 3) \times 10^2 + (692 \pm 7) \times 10^1 c$	0.9996

"c" es la concentración de Se en µg/L e "y" corresponde al área de la señal transitoria. Condiciones de operación indicadas en la Tabla 11.

La cuantificación del selenio total presente en la muestra de orina se realizó a un nivel de dilución 1/10 a través de calibración convencional y por adiciones estándar. La Tabla 36 muestra las pendientes obtenidas en ambos métodos de calibración, deduciéndose que no existen diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, por lo que no existe efecto matriz al nivel de dilución empleado.

En la Tabla 37 se muestra la concentración de selenio total obtenida para las muestras de orina analizadas, procedentes de los tres individuos (A, B y C).

2.4.2. Determinación de especies de selenio

La cuantificación de las especies de selenio presentes en las muestras se llevó a cabo a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS, empleando el *método cromatográfico a pH=6.0*, y registrando la señal a relación m/z=82. Las muestras fueron previamente procesadas a través de los cartuchos de C₁₈ y diluidas con agua Milli-Q en la proporción 1/5.

Tabla 36. Pendientes de calibración obtenidas en la determinación de Se total por FI-ICP-MS y de especies de Se por HPLC-ICP-MS, a través de los métodos de calibración convencional y de adiciones estándar.

	Calibrado Convencional		Adiciones Estándar		Dilución
	$b \pm ts_b$	r^2	$b \pm ts_b$	r^2	
Se Total	$(690 \pm 7) \times 10^1$	0.9996	$(67 \pm 1) \times 10^2$	0.9992	1/10
TMSe⁺	$(67 \pm 1) \times 10^2$	0.9994	$(65 \pm 2) \times 10^2$	0.9986	1/5
SeCys₂	$(605 \pm 7) \times 10^1$	0.9996	$(64 \pm 1) \times 10^2$	0.9994	"
SeMet	$(618 \pm 6) \times 10^1$	0.9996	$(61 \pm 1) \times 10^2$	0.9990	"
SeEt	$(599 \pm 8) \times 10^1$	0.9996	$(61 \pm 2) \times 10^2$	0.9978	"
Se^{IV}	$(60 \pm 1) \times 10^2$	0.9992	$(59 \pm 2) \times 10^2$	0.9986	"
Se^{VI}	$(662 \pm 7) \times 10^1$	0.9996	$(63 \pm 1) \times 10^2$	0.9986	"

Con el fin de estudiar el posible efecto matriz sobre la cuantificación de especies de selenio en la orina, se procedió a la comparación estadística de las pendientes obtenidas a través del método de calibración convencional y del método de adiciones estándar, para las seis especies de selenio (Tabla 36). Los resultados mostraron la ausencia de diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, lo que permite demostrar que no existe efecto matriz para la determinación de especies en la orina, al nivel de dilución 1/5 empleado.

La estimación de la concentración de selenio de las especies desconocidas (D_1 y D_2) presentes en la orina, se llevó a cabo a través de la calibración convencional con otras especies de selenio, debido a la ausencia de efecto matriz. La especie SeMet se eligió para la cuantificación de D_1 y la especie Se^{IV} para la cuantificación de D_2 , debido a sus proximidades respectivas en la elución y por lo tanto posibles semejanzas en los mecanismos de retención.

La Tabla 37 muestra las concentraciones de selenio obtenidas para las distintas especies frente a su contenido en selenio total. Se observa que la suma de las

concentraciones de selenio de las especies representa entre el 88 y el 96% del selenio total, para las tres muestras de orina analizadas.

Tabla 37. Concentración de Se total y en forma de especies, en $\mu\text{g/L}$, para las muestras de orina analizadas procedentes de tres individuos (A, B y C) (media \pm s, n=3).

Muestra	TMSe ⁺	D ₁	D ₂	Se Total	%R
orina _A	17.8 \pm 0.6	7.7 \pm 0.3	17.5 \pm 0.6	45 \pm 1	96 \pm 1
orina _B	14.3 \pm 0.5	14.9 \pm 0.6	16.9 \pm 0.6	53 \pm 2	88 \pm 1
orina _C	19.8 \pm 0.7	8.5 \pm 0.3	6.1 \pm 0.2	38 \pm 1	96 \pm 1

2.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Durante los experimentos realizados con muestras de orina se observó que cuando las muestras eran almacenadas a 4°C durante un sólo día, se producía la aparición de un precipitado. El análisis del líquido sobrenadante mostraba pérdidas de las especies de selenio respecto a los resultados obtenidos el día anterior, llegando incluso en muchos casos a la ausencia total de picos en el cromatograma. Era evidente que las muestras sin tratar no eran estables, lo que obligaba al análisis inmediato.

El estudio de estabilidad se llevó a cabo a través del control de las especies presentes en la orina, no realizándose ningún enriquecimiento en otras especies, ausentes en la muestra original, ya que podrían causar interacciones químicas con las especies presentes.

Los contenedores empleados en el almacenamiento fueron viales de 10 mL de polietileno y vidrio pyrex. Estos contenedores fueron lavados previamente y sumergidos en un baño conteniendo HNO₃ al 10% (v/v) durante 24 horas, y finalmente fueron aclarados varias veces con agua Milli-Q y secados antes de su utilización.

El procesado a través de cartuchos de C_{18} de varias alícuotas de una muestra de orina, se llevó a cabo mediante el procedimiento indicado en la sección de tratamiento de muestra (apartado 2.3.). Todas las alícuotas fueron mezcladas y repartidas entre los viales de polietileno y de vidrio pyrex, y posteriormente fueron almacenadas en oscuridad a -18 y 4 °C. Los viales fueron sellados con papel de parafina.

Un total de diez viales fueron preparados para su almacenamiento bajo cada una de las condiciones experimentales indicadas. Para determinar la señal de referencia (S_{Ref}), fueron seleccionados de forma aleatoria dos viales de cada una de las series e inmediatamente analizados a través del *método cromatográfico a $pH=6.0$* . Las medidas para el estudio de estabilidad se realizaron después de 1, 7, 14 y 28 días.

La estabilidad (%R) fue evaluada a través de la relación entre la señal obtenida bajo las correspondientes condiciones de almacenamiento (S_x) y la señal de referencia (S_{Ref}) expresada como porcentaje, para cada una de las especies de selenio presentes en la muestra. Los resultados representados en la Figura 41, muestran serias pérdidas para la especie D_1 después de sólo una semana, salvo en el almacenamiento en viales de polietileno mantenidos a 4 °C. En estas condiciones, esta especie muestra pérdidas de forma gradual en el tiempo a partir de la segunda semana de almacenamiento. Por otro lado, las especies $TMSe^+$ y D_2 presentan una mayor estabilidad, permaneciendo prácticamente estables cuando el almacenamiento se realiza en viales de polietileno mantenidos a 4 °C durante el intervalo de tiempo estudiado.

Concluyendo, se observó una mayor estabilidad de las especies almacenadas en viales de polietileno frente a las muestras conservadas en vidrio pyrex, posiblemente debido a su mayor resistencia a la acción de agentes oxidantes y a la luz. El efecto de la temperatura fue similar en ambos materiales estudiados, mejorando generalmente el almacenamiento a 4 °C frente a -18 °C.

Las pérdidas observadas durante el estudio de estabilidad no pueden ser atribuidas a transformación de especies, debido a la ausencia de nuevos picos o de aumento de los ya existentes en los cromatogramas de las muestras. Tampoco se observó la aparición de

ningún precipitado que pudiera inducir a la adsorción de los analitos. Las posibles pérdidas por volatilización deberían ser mínimas debido a las temperaturas de almacenamiento empleadas. La causa más probable podría atribuirse a pérdidas por adsorción de las especies sobre la superficie de los materiales empleados para el almacenamiento.

En conclusión, a través de la utilización del tratamiento de muestra descrito anteriormente, es posible mantener las especies de selenio estables durante al menos una semana si éstas son almacenadas en polietileno a 4 °C, evitando así el análisis inmediato.

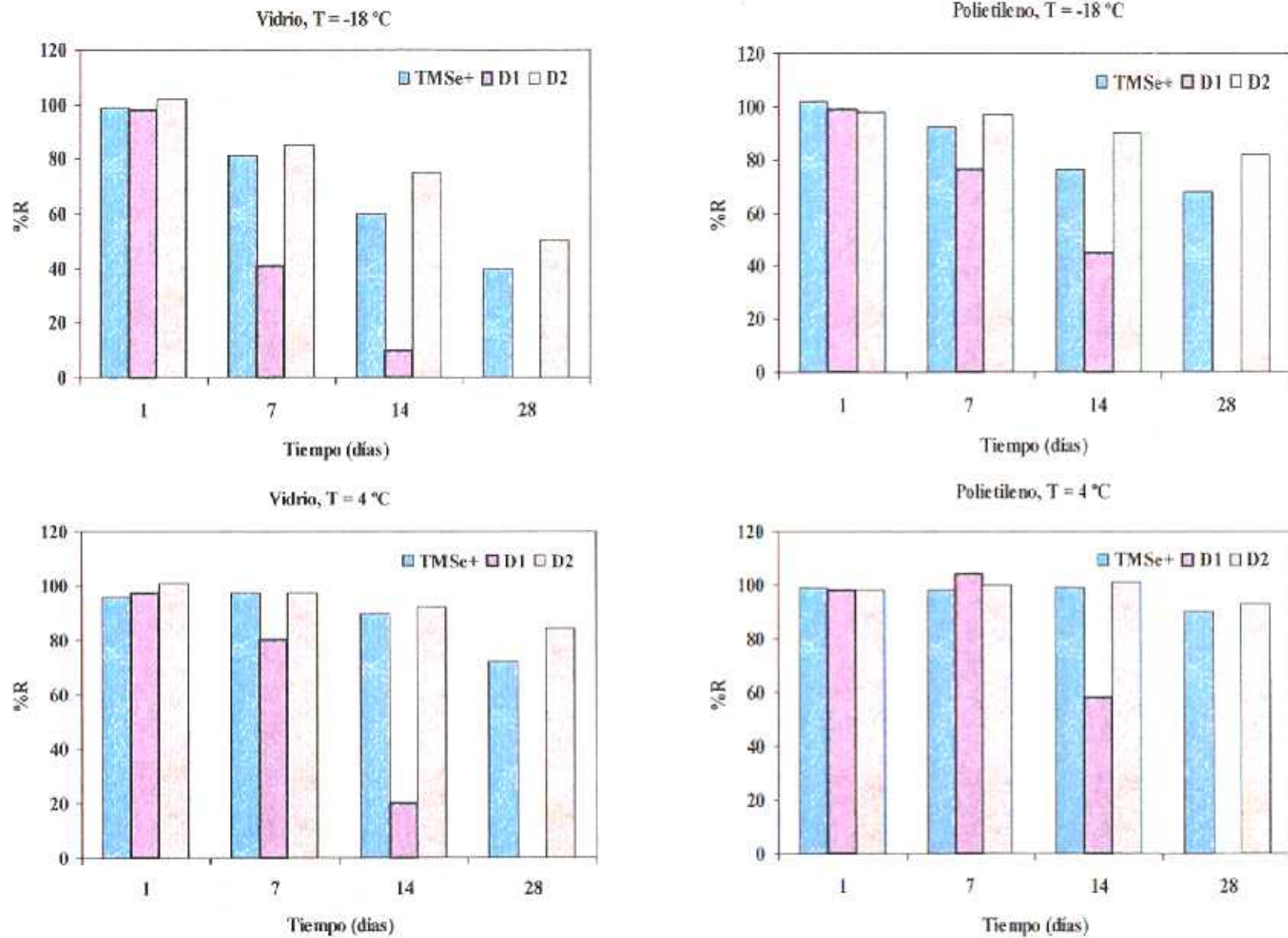


Figura 41. Estabilidad de especies de Se presentes en muestras de orina, en contenedores de polietileno y vidrio pyrex a -18 y 4 °C.

3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE PESCADOS Y MOLUSCOS

3.1. INTRODUCCIÓN

La principal fuente de selenio para el hombre se produce a través de la dieta ingerida. Los mayores aportes de este elemento proceden del consumo de vegetales, pescados y mariscos [Fishbein, 1991]. En un principio, debido al carácter tóxico del selenio, el control del nivel de concentración total presente en los alimentos fue considerado de gran interés. Sin embargo, tanto sus propiedades tóxicas como esenciales obligan al conocimiento de la forma química que presenta el selenio en estas muestras.

El análisis de especies de selenio en alimentos requiere de procesos de tratamiento de muestra que aseguren la conservación de la forma química original. En los últimos años, se ha producido un aumento en el número de trabajos publicados sobre la determinación de especies de selenio en muestras de levadura enriquecida, sin embargo, el análisis de selenio en pescados tan sólo ha sido enfocado a la determinación del contenido total (ver Revisión bibliográfica en el Capítulo II).

La mayor parte del selenio presente en las muestras de atún y de mejillón, se encuentra formando parte de las proteínas. La liberación de los aminoácidos, se realiza generalmente a través de procesos de hidrólisis ácida o enzimática [Belitz y col., 1997].

A continuación se exponen los estudios realizados cuyo objetivo es la identificación y cuantificación de las especies de selenio presentes en muestras de atún y mejillón.

3.2. DETERMINACIÓN DEL SELENIO TOTAL EN MUESTRAS DE ATÚN Y MEJILLÓN

Para la posterior evaluación de la eficiencia de los procesos de extracción de especies de selenio, se procedió en primer lugar a la determinación del contenido de selenio total presente en las muestras.

El procedimiento de digestión de las muestra se ha descrito en el Capítulo III (sección 3.3.1.2.a). El análisis de selenio se realizó en ICP-MS a las relaciones m/z 78 y 82, empleando 20 µg/L de indio como patrón interno, el resto de condiciones de operación se han reflejado en la Tabla 11.

Tabla 38. Concentración de selenio total encontrada en muestras de atún y mejillón liofilizadas, en el análisis por ICP-MS.

Muestra	Concentración de Se _{Total} (µg/g)
T22 Tuna (7)	4.57 ± 0.07
T22 Tuna (10)	4.3 ± 0.2
T30 Tuna	1.26 ± 0.05
No 0426 Tuna	1.71 ± 0.04
No 0724 Tuna	1.28 ± 0.03
T15 Mussel	1.55 ± 0.04
No 919 Mussel Tissue	1.80 ± 0.05
Mejillón (CRM 278) (1.66 ± 0.04 µg/g de Se)	1.70 ± 0.06

Los resultados obtenidos se han reflejado en la Tabla 38. La exactitud de los mismos fue evaluada a través del análisis de un material de referencia (mejillón CRM 278) certificado en selenio total. Sobre los resultados se observa que no existen diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre el valor obtenido y el certificado. La determinación está libre de interferencias de matriz, por lo que se puede emplear la calibración convencional.

Los resultados muestran un bajo nivel de concentración en selenio en este tipo de muestras. Las muestras de atún T22 (7) y (10) presentan los contenidos más elevados, por lo que los estudios de especiación se realizaron principalmente sobre estas muestras.

3.3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ATÚN Y MEJILLÓN

La determinación de especies de selenio en tejidos biológicos por HPLC-ICP-MS, implica la obtención de un extracto líquido a partir de la muestra sólida. La disolución obtenida debe contener las especies en su forma original, por lo que se ha de evaluar la estabilidad de las especies durante los procesos de hidrólisis. Por otro lado, se requiere la obtención de un extracto limpio previo a su inyección sobre la columna analítica, con el fin mantener las prestaciones y la estabilidad del método analítico.

La Tabla 39 refleja la composición general encontrada en la fracción comestible del mejillón y del atún [Belitz y col., 1997], junto con los resultados obtenidos por cálculo matemático para muestras liofilizadas. Como puede observarse, las muestras liofilizadas poseen un elevado contenido lipídico, el cual es considerablemente superior en el atún. Para evitar la interferencia que pudiera ofrecer la presencia de grasas, tanto en el proceso de hidrólisis como durante la filtración del extracto, se procedió a la extracción de las mismas en las muestras, de forma previa a la hidrólisis.

Tabla 39. Composición general para la fracción comestible en mejillón y atún frescos [Belitz y col., 1997] y liofilizados.

	Agua	Proteínas	Grasas	Sales Minerales
Mejillón fresco	83%	10%	1.3%	1.7%
Atún fresco	62%	22%	16%	1.1%
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
Mejillón liofilizado		59%	8%	10%
Atún liofilizado		58%	42%	3%

3.3.1. Extracción de grasas

La separación de la fracción lipídica puede realizarse por extracción con disolventes orgánicos como éter de petróleo, cloroformo, benceno y sulfuro de carbono entre otros [White y col., 1970]. Las grasas presentes en pescados y moluscos pertenecen al grupo de los fosfolípidos, de carácter polar, junto a triglicéridos con un elevado contenido en ácidos grasos insaturados (ácidos poliénicos ω -3 con 5 y 6 dobles enlaces) [Belitz y col., 1997], por lo que su extracción requiere del empleo de mezclas de disolventes con el fin de extraer las grasas más polares. La eliminación de las grasas, se llevó a cabo por extracción con la mezcla de disolventes cloroformo y metanol sobre la muestra sólida. El proceso se realizó como se indica en la sección de procedimientos del Capítulo III (3.3.1.2.b).

Con el fin de comprobar la ausencia de pérdidas de selenio durante el proceso de extracción de grasas, se llevó a cabo la mineralización del sólido resultante una vez eliminada la grasa, y se determinó su contenido en selenio total bajo las mismas condiciones que en el apartado anterior. La Tabla 40 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 40. Comparación entre los resultados obtenidos en la determinación de selenio total en muestras de atún y mejillón liofilizadas, antes y después del proceso de extracción de grasas.

Muestra	Se _{Total} ($\mu\text{g/g}$)	Se _{Total} ($\mu\text{g/g}$) tras la extracción de grasas
T22 Tuna (7)	4.57 ± 0.07	4.6 ± 0.1
T22 Tuna (10)	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.1
No 919 Mussel Tissue	1.80 ± 0.05	1.76 ± 0.08
Mejillón (CRM 278) ($1.66 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ de Se)	1.70 ± 0.06	1.68 ± 0.07

Los resultados muestran la ausencia de diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre las concentraciones de selenio encontradas en las muestras antes y después del proceso de extracción de grasas, comprobándose que no se producen pérdidas de selenio en esta etapa del tratamiento de muestra.

3.3.2. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de proteínas se realiza por calentamiento de la muestra, generalmente en medio HCl 6M a temperaturas en torno a los 100 °C. El método en sí mismo conlleva ciertas desventajas. Por un lado, la elevada acidez del extracto obtenido obliga a su neutralización como paso previo al análisis cromatográfico, produciéndose un aumento en la fuerza iónica de la disolución a analizar. Además, las condiciones del proceso coinciden con las necesarias para la reducción de la especie Se^{VI} a Se^{IV} , por lo que su presencia no podrá ser detectada en muestras sometidas a este tipo de hidrólisis.

En primer lugar, se procedió a evaluar la estabilidad de las especies SeCys_2 , SeMet , Se^{IV} y Se^{VI} en función de la temperatura de calentamiento y de la concentración clorhídrica del medio. Para ello se prepararon disoluciones de 10 mL conteniendo 50 $\mu\text{g/L}$ de Se de cada una de las especies, en diferentes medios: agua Milli-Q, HCl 3, 4 y 6N. Este primer estudio se realizó para cada una de las especies de forma separada. La mitad de estas disoluciones fue sometida a calentamiento a diferentes temperaturas (50, 70 y 100 °C) durante una hora y la otra mitad fue guardada para la obtención de la correspondiente señal de referencia (S_{Ref}). Tras el proceso, ambas fracciones fueron neutralizadas con NH_3 y enrasadas a 10 mL con agua Milli-Q. Las muestras fueron analizadas a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS, empleando el *método cromatográfico a pH=6.0*, bajo las condiciones de operación indicadas en la Tabla 11. Este modo de análisis permite no sólo evaluar el grado de estabilidad de estas especies a través de los procesos de hidrólisis ácida, sino también comprobar la posible transformación a otras especies de selenio.

La estabilidad se evaluó a través de la relación entre la señal obtenida para cada una de las condiciones de hidrólisis (S_x) y la señal de referencia correspondiente (S_{Ref}),

expresada en porcentaje. Los resultados se muestran en la Tabla 41. El análisis de las correspondientes disoluciones blanco mostró ausencia de señal de selenio, permitiendo confirmar que el análisis se encontraba exento de problemas de contaminación.

Tabla 41. Estabilidad de las especies SeCys₂, SeMet, Se^{IV} y Se^{VI} (25 µg/L de Se por especie) en función de la temperatura y de la concentración de ácido, para un tiempo de calentamiento de una hora (los resultados son la media de 3 ensayos).

Especie	Medio	Temperatura		
		50 °C	70 °C	100 °C
SeCys ₂	H ₂ O	103 ± 4	82 ± 4	0
	HCl 3N	102 ± 3	98 ± 3	5 ± 3
	HCl 4N	91 ± 4	100 ± 2	10 ± 3
	HCl 6N	94 ± 4	94 ± 4	22 ± 4
SeMet	H ₂ O	67 ± 3	65 ± 4	10 ± 4
	HCl 3N	96 ± 3	101 ± 2	23 ± 4
	HCl 4N	89 ± 5	98 ± 3	41 ± 4
	HCl 6N	93 ± 2	96 ± 4	60 ± 5
Se ^{IV}	H ₂ O	94 ± 3	96 ± 3	98 ± 3
	HCl 3N	96 ± 4	99 ± 2	97 ± 4
	HCl 4N	96 ± 5	101 ± 2	98 ± 2
	HCl 6N	98 ± 4	95 ± 3	102 ± 3
Se ^{VI}	H ₂ O	100 ± 3	99 ± 2	90 ± 4
	HCl 3N	95 ± 2	77 ± 5	47 ± 4
	HCl 4N	73 ± 4	58 ± 4	3 ± 2
	HCl 6N	45 ± 4	32 ± 3	0

Los resultados muestran un comportamiento similar para las especies SeCys₂ y SeMet, las cuales se mantienen estables a 50 y 70 °C, salvo en el caso en que el medio empleado sea agua. Las pérdidas de seleno-aminoácidos producidas cuando el

calentamiento se realiza a 100 °C muestran, a través del análisis cromatográfico, su oxidación parcial debido a la aparición de un pico al tiempo de retención de la especie Se^{IV} . El hecho de que el grado de transformación disminuya con el aumento de la concentración clorhídrica del medio, puede explicarse a través de las propiedades reductoras del HCl, que disminuye el nivel de oxidación de estos seleno-aminoácidos durante el proceso de calentamiento.

La Figura 42 presenta uno de los cromatogramas obtenidos para una disolución que originalmente contenía sólo la especie SeMet, y que tras ser calentada a 100 °C durante una hora, en medio HCl 3N, sufrió la oxidación parcial a Se^{IV} en un porcentaje próximo al 75%. También se ha representado el cromatograma correspondiente a la señal de referencia para la especie SeMet, con la adición de la especie Se^{IV} .

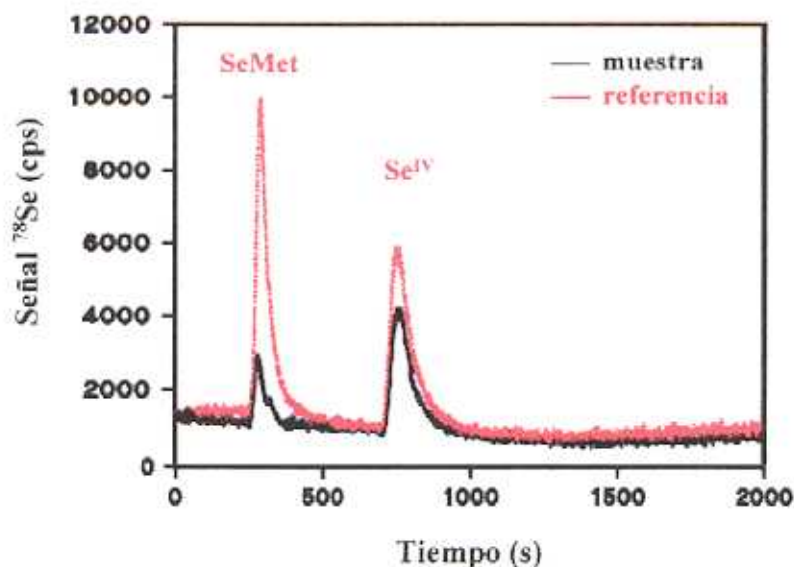


Figura 42. Comparación entre el cromatograma obtenido para una disolución patrón de SeMet tras el calentamiento a 100 °C durante una hora en medio HCl 3N (muestra) y la señal de referencia correspondiente, junto con la adición de la especie Se^{IV} (25 $\mu\text{g/L}$).

Empleando el *método cromatográfico a pH=6*.

La especie Se^{VI} muestra muy baja estabilidad a altas temperaturas y elevadas concentraciones de HCl, ya que como era de esperar, se produce su transformación a la especie Se^{IV} . La única especie que muestra una buena estabilidad durante los procesos

simulados de hidrólisis ácida, en el intervalo de temperaturas estudiado, fue la especie Se^{IV} .

El primer estudio de estabilidad había sido realizado sobre disoluciones patrón que contenían las especies de selenio de forma separada. En un segundo experimento, se evaluó la estabilidad de las especies cuando se presentaban de forma conjunta en la misma disolución. Para ello se prepararon disoluciones conteniendo 50 $\mu\text{g/L}$ de dos o más especies de selenio. La temperatura de calentamiento elegida para este estudio fue de 70 °C, ya que corresponde a la máxima temperatura a la cual los seleno-aminoácidos se habían mostrado estables en el estudio anterior. El proceso se realizó en medio HCl 3 y 6N. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Estabilidad de las especies de Se (25 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) cuando están presentes de forma conjunta en la disolución, calentadas a 70 °C durante una hora, en función de la concentración clorhídrica del medio. Los resultados se expresan como porcentajes de recuperación (media \pm s, para tres ensayos).

Especies en disolución	Especie analizada	Medio	
		HCl 3N	HCl 6N
SeCys ₂ y SeMet	SeCys ₂	98 \pm 4	97 \pm 4
	SeMet	101 \pm 3	92 \pm 4
Se ^{IV} y Se ^{VI}	Se ^{IV}	(15 \pm 1) $\times 10^1$	(17 \pm 1) $\times 10^1$
	Se ^{VI}	66 \pm 8	23 \pm 4
SeCys ₂ SeMet Se ^{IV} y Se ^{VI}	SeCys ₂	0	0
	SeMet	0	0
	Se ^{IV}	(30 \pm 2) $\times 10^1$	(35 \pm 2) $\times 10^1$
	Se ^{VI}	62 \pm 7	28 \pm 5

Los resultados obtenidos sobre disoluciones que contenían SeCys₂ y SeMet, mostraron una buena estabilidad para ambos seleno aminoácidos tras el proceso de hidrólisis, sin distinción de la concentración clorhídrica del medio. Tampoco se

encontraron diferencias significativas en la estabilidad de las especies Se^{IV} y Se^{VI} cuando se encuentran juntas en la misma disolución o de forma individual, produciéndose la parcial reducción de la especie seleniato a selenito, en función de la concentración clorhídrica del medio.

Por otro lado, los resultados mostraron un comportamiento muy diferente en cuanto a la estabilidad de los seleno-aminoácidos cuando se encuentran en presencia de especies inorgánicas de Se en la disolución. La ausencia de señal para las especies SeCys₂ y SeMet, junto con el aumento producido en la señal correspondiente a la especie Se^{IV} , indica la oxidación de los seleno-aminoácidos en estas condiciones. De los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de las especies inorgánicas de selenio interfiere en la estabilidad de los seleno-aminoácidos.

Finalmente, el procedimiento de hidrólisis ácida se aplicó a las muestras de atún T22 (7) y (10), seleccionadas por su mayor contenido en selenio (4.6 y 4.3 $\mu\text{g/g}$ respectivamente). Las condiciones de la hidrólisis fueron: temperatura de calentamiento de 70 °C y concentración de HCl 3N. Estas condiciones se eligieron debido a la mayor estabilidad que presentaban las especies, así como la menor fuerza iónica de la disolución resultante y con el fin de evitar la total reducción de la especie Se^{VI} , que se produciría si el calentamiento se realizara a 100 °C en HCl 6N. Puesto que la presencia de selenio inorgánico en la disolución afecta a la estabilidad de las especies SeCys₂ y SeMet, es necesario conocer el efecto que pueden ejercer los componentes de la matriz presentes en las muestras de pescado. Por este motivo, el procedimiento de hidrólisis descrito en el Capítulo III (sección 3.3.1.2.b), se llevó a cabo sobre las muestras de atún, con y sin la previa adición de 25 $\mu\text{g/L}$ de Se de cada una de las especies. La Tabla 43 muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de las especies por HPLC-ICP-MS empleando el *método cromatográfico a pH=6*. El resto de condiciones de operación están indicadas en la Tabla 11. El método de adiciones estándar fue empleado para evitar errores de cuantificación debido a la presencia de la matriz.

El análisis de los extractos obtenidos para las muestras de atún sometidas a hidrólisis ácida mostró la ausencia de especies de selenio. Probablemente el tiempo de

calentamiento empleado (una hora), no fuera suficiente para producir la hidrólisis de las muestras, sin embargo, la baja estabilidad de las especies durante el proceso no aconsejaba el aumento en la duración del mismo.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras adicionadas muestran resultados muy diferentes a los obtenidos en los estudios anteriores, realizados con disoluciones patrón de las especies, con la excepción de la especie Se^{VI} . La presencia de la matriz del pescado induce a pérdidas de los seleno-aminoácidos y en mayor grado de la especie Se^{IV} , la cual había permanecido estable bajo todas las condiciones de hidrólisis ensayadas sobre disoluciones patrón. Los resultados no mostraron evidencias de procesos de transformación entre las especies. Es posible, que la pérdida de las especies adicionadas se produzca debido a un proceso de adsorción sobre el residuo sólido de la muestra, el cual permanece tras la etapa de hidrólisis ácida.

Tabla 43. Resultados obtenidos en la hidrólisis ácida (70 °C, 1 hora, medio HCl 3N) de las muestras de atún T22 (7) y (10) y porcentaje de recuperación tras la adición de 25 µg/L de Se por especie, de forma previa al proceso de hidrólisis.

Muestra	SeCys ₂	% Recuperación		
		SeMet	Se ^{IV}	Se ^{VI}
T22 Tuna (7)	-	-	-	-
T22 Tuna (7) + 25 µg/L por especie	37 ± 5	76 ± 4	10 ± 4	57 ± 6
T22 Tuna (10)	-	-	-	-
T22 Tuna (10) + 25 µg/L por especie	42 ± 6	68 ± 5	15 ± 3	50 ± 5

De forma simultánea a nuestros estudios, Gilon y colaboradores en 1995 publicaron los resultados obtenidos en la hidrólisis ácida de una muestra de levadura, empleando HCl 6N y calentamiento en baño de agua durante 5 horas, obteniendo una eficiencia en la extracción de tan sólo el 8% del selenio total. Este hecho junto con la baja estabilidad y nula eficiencia de extracción encontrada en nuestros experimentos,

nos condujo a desechar la hidrólisis ácida como medio de extracción de especies de selenio en pescados.

3.3.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se ha mostrado más eficaz que la hidrólisis ácida, en los procesos de extracción de seleno-aminoácidos realizados sobre muestras de levadura (ver revisión bibliográfica del Capítulo II). El proceso se realiza generalmente por adición de enzimas y calentamiento a 37 °C durante 24 horas, en medio tamponado. En nuestro caso se eligió el empleo de la enzima "subtilisina" (proteasa no específica), en cuyas indicaciones comerciales se mostraba la máxima actividad a 37 °C y pH=7.5. En la elección del medio regulador del pH (7.5), se eligió el par ácido/base $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (la misma sal empleada como fase móvil) en concentración 0.1 M.

3.3.3.1. Aplicación del proceso de hidrólisis enzimática a muestras de atún y mejillón

Las muestras de atún y mejillón fueron sometidas al proceso de hidrólisis enzimática tras la extracción de las grasas. En un estudio previo, se había comprobado la estabilidad de disoluciones patrón de las especies SeCys_2 , SeMet , Se^{IV} y Se^{VI} (25 $\mu\text{g/L}$ de Se por especie) en medio fosfato 0.1M a pH=7.5, después del calentamiento a 37 °C durante 24 horas. Por lo tanto, el procedimiento se aplicó a 250 mg de muestra liofilizada, con la adición de 25 mg de subtilisina y de 5 mL de la disolución reguladora de fosfato. Tras el proceso se obtuvo un extracto líquido, junto con una fase sólida aunque en cantidad apreciablemente menor que la muestra original. Ambas fracciones se sometieron a mineralización siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo III (3.3.1.2.a), determinándose el contenido en selenio total.

La Tabla 44 muestra los resultados obtenidos, expresados en términos de porcentaje de recuperación (%R), calculado a partir de la relación entre la concentración de selenio total encontrada en cada una de las fases, líquida y sólida, y la concentración de selenio total correspondiente a cada una de las muestras.

El porcentaje de recuperación encontrado en la fase líquida corresponde a la eficiencia del proceso de hidrólisis, resultando ser del 45 al 67%. La suma de las recuperaciones obtenidas en ambas fases, %R (f.l. + f.s.), se calculó para evaluar las posibles pérdidas de selenio durante el proceso, los resultados muestran la ausencia de pérdidas significativas, para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 44. Porcentajes de recuperación de selenio total obtenidos por mineralización del extracto líquido y de la fase sólida resultantes de la hidrólisis enzimática de muestras de atún y mejillón (250 mg), con subtilisina (25 mg) y medio fosfato 0.1 M a pH=7.5.

Muestra	%R (f. líquida)	%R (f. sólida)	%R (f.l. + f.s.)
T22 Tuna (7)	63 ± 3	31 ± 1	94 ± 4
T22 Tuna (10)	56 ± 2	46 ± 2	102 ± 4
No 919 Mussel Tissue	45 ± 1	47 ± 2	92 ± 3
Mejillón (CRM 278) (1.66 ± 0.04 µg/g de Se)	67 ± 2	34 ± 1	101 ± 3

El primer paso a considerar, tras los resultados obtenidos, era la optimización del proceso de hidrólisis enzimática, con el objeto de extraer todo el selenio contenido en las muestras.

3.3.3.2. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática

Con el fin de mejorar la eficiencia de la extracción del selenio durante la etapa de hidrólisis enzimática, en primer lugar se procedió a variar la cantidad de enzima empleada en el proceso, manteniendo constantes el resto de condiciones empleadas en la hidrólisis: temperatura de 37 °C, tiempo de calentamiento de 24 h, así como la concentración (0.1 M) y pH (7.5) del medio fosfato.

La cantidad de enzima se ha expresado como porcentaje en peso respecto a la cantidad de muestra sometida al proceso de hidrólisis, variando este parámetro entre el 0 y el 60%. La Tabla 45 muestra los resultados obtenidos en los ensayos realizados sobre

el material certificado de mejillón (CRM 278) y la muestra de atún T22 (7). Los datos corresponden a los porcentajes de recuperación de selenio total, en la mineralización de las fracciones líquida y sólida procedentes de la hidrólisis enzimática, en función de la cantidad de enzima empleada en el proceso.

Tabla 45. Porcentajes de recuperación de selenio total, contenido en las fases sólida (f.s.) y líquida (f.l.) resultantes del proceso de hidrólisis enzimática, en función de la cantidad de enzima empleada.

% subtilisina (% $m_{enzima}/m_{muestra}$)	mejillón CRM 278		T22 Tuna (7)	
	%R (f.l.)	%R(f.s.)	%R (f.l.)	%R(f.s.)
0	-	101 ± 2	-	99 ± 2
5	33 ± 1	70 ± 2	40 ± 1	56 ± 2
10	63 ± 2	35 ± 1	56 ± 2	36 ± 2
20	61 ± 3	41 ± 2	59 ± 3	42 ± 2
40	55 ± 2	44 ± 2	57 ± 2	40 ± 2
60	57 ± 3	39 ± 2	60 ± 3	36 ± 1

La ausencia de señal de selenio en la fracción líquida resultante de la realización del proceso sin enzima, indica que ésta es la responsable de la extracción del mismo. El análisis de un blanco realizado en las mismas condiciones en que se lleva a cabo la hidrólisis y en presencia de subtilisina, no dio lugar a señal de Se, lo que implica ausencia de contaminación por este elemento en los reactivos.

En lo que respecta a la cantidad de enzima empleada durante el proceso de hidrólisis enzimática, los resultados muestran una menor eficiencia en la extracción de selenio con la menor cantidad de enzima ensayada (5% m/m), produciéndose una mejora a partir del empleo de un 10% (m/m) de subtilisina. Sin embargo, no se observó ningún efecto por empleo de cantidades de enzima superiores a este valor. Este hecho está de acuerdo con los estudios realizados por Abou-Shakra y colaboradores, en 1997, los cuales encontraron una eficiencia en la ruptura de enlaces peptídicos del 40% en

muestras de suero sanguíneo, hidrolizadas con otra enzima no específica (pronasa), sin mejora por aumento en la cantidad de ésta.

Las muestras sometidas al proceso de hidrólisis enzimática con cantidades de subtilisina entre el 40 y el 60%, mostraban la aparición de unas partículas sólidas de color blanco y aspecto cristalino sobre la fracción sólida remanente de la muestra, lo que parecía indicar, que el exceso de enzima adicionado permanecía sin reaccionar. A partir de estos resultados, se consideró la necesidad de aumentar el tiempo de duración del proceso, y se optó por realizar la hidrólisis enzimática de la muestra en dos etapas. Las condiciones para ambas etapas fueron las mismas: 10% de subtilisina (respecto a la cantidad de muestra inicial), calentamiento a 37 °C durante 24 horas y adición de 5 mL de disolución fosfato 0.1 M a pH=7.5. La segunda etapa de la hidrólisis se llevó a cabo retirando la fracción líquida resultante de la primera etapa y añadiendo sobre la fase sólida nuevamente, un 10% de subtilisina y 5 mL de disolución de fosfato 0.1M a pH=7.5. Con la realización de la segunda etapa de la hidrólisis, no se observó de forma apreciable la presencia de fase sólida, pasando toda la muestra a la disolución. Las dos fracciones líquidas procedentes de ambas hidrólisis se mezclaron y se sometieron a mineralización según el procedimiento indicado en el Capítulo III (sección 3.3.1.2.a), determinándose el selenio total a través de calibración convencional en ICP-MS. Los resultados procedentes de la realización de dos hidrólisis enzimáticas consecutivas sobre las muestras se muestran en la Tabla 46, y se han representado como el porcentaje de recuperación [%R (f.l.₁ + f.l.₂)], donde el término entre paréntesis indica la suma de las fases líquidas resultantes de ambos procesos.

Con el fin de reducir tanto la manipulación de la muestra como la adición de sales, se procedió también a realizar la segunda etapa de la hidrólisis enzimática sin retirar la fracción líquida resultante del primer proceso. De este modo sólo fue necesaria la adición de una nueva cantidad de enzima y no de un nuevo volumen de disolución de fosfato. En estas condiciones también se observó la ausencia de fase sólida y se procedió a la determinación del selenio total, por mineralización del extracto líquido, como en el caso anterior. La Tabla 46 incluye estos resultados, los cuales se han

representado por el porcentaje de recuperación [%R (f.l.₁₊₂)], donde el término entre paréntesis muestra una única fase líquida procedente de las dos hidrólisis consecutivas.

Tabla 46. Porcentajes de recuperación de selenio total, obtenidos por mineralización del extracto líquido resultante tras la hidrólisis enzimática de muestras de atún y mejillón en dos etapas consecutivas.

Muestra	%R (f.l. ₁ + f.l. ₂)*	%R (f.l. ₁₊₂)**
T22 Tuna (7)	95 ± 4	96 ± 4
T22 Tuna (10)	96 ± 5	102 ± 4
No 919 Mussel Tissue	92 ± 4	93 ± 3
Mejillón (CRM 278) (1.66 ± 0.04 µg/g de Se)	98 ± 5	101 ± 4

* La 2ª hidrólisis se lleva a cabo separando la fase líquida.

** Sin separación de la fase líquida.

Los resultados obtenidos muestran una notable mejora en la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática cuando esta se realiza en dos etapas. Las recuperaciones obtenidas, próximas al 100%, fueron independientes de realizar la segunda etapa retirando o no la fracción líquida resultante del primer proceso. El hecho de no retirar la fase líquida procedente de la primera hidrólisis reduce el grado de manipulación de la muestra y además evita la adición de iones fosfato en la segunda etapa, por lo que se eligió este modo de operación para posteriores experimentos.

Con el método propuesto se consigue extraer todo el selenio presente en la muestra sólida de atún o mejillón, por lo que el siguiente paso constituye la identificación y cuantificación de especies de selenio, a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS.

3.3.3.3. Identificación de especies de selenio en muestras de atún y mejillón

El proceso de hidrólisis enzimática en muestras proporciona a éstas un elevado contenido en materia orgánica, lo que implica la necesidad de realizar una etapa de "clean up" o limpieza de forma previa a su análisis por HPLC. Basándonos en los estudios de recuperación de las especies de selenio, durante el filtrado de muestras de orina a través de cartuchos de C₁₈, se eligió este tratamiento para eliminar parte de la matriz en los extractos líquidos de las muestras de atún y mejillón. El procedimiento se ha indicado en el Capítulo III (sección 3.3.1.2.b).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Spherisorb ODS/NH₂, empleando como fase móvil una disolución de fosfato 5 mmol/L a pH=2.7 (*método cromatográfico a pH=2.7*). La detección por ICP-MS se realizó a las relaciones m/z 78 y 82, bajo las condiciones de operación indicadas en la Tabla 11.

La Figura 43 muestra los cromatogramas obtenidos para las muestras de atún T22 (7) y (10) y el material certificado de mejillón (CRM 278), empleando el *método cromatográfico a pH=2.7*. Se ha elegido el isótopo ⁸²Se debido a su mejor relación señal/ruido, aunque los resultados fueron comparables a ambas relaciones m/z. En las muestras de atún se encontraron tres picos, con tiempos de retención de 165, 250 y 315 segundos, mientras que sólo se obtuvieron dos picos, con tiempos de retención de 170 y 255 segundos para el mejillón certificado.

La elevada fuerza iónica de las muestras induce al parcial solapamiento de las especies, sobre todo en el caso de las muestras de atún, no permitiendo la diferenciación en la adición de disoluciones patrón de las especies TMS⁺ y SeCys₂, por lo que para su identificación y posterior cuantificación es necesario proceder a la dilución de la muestra.

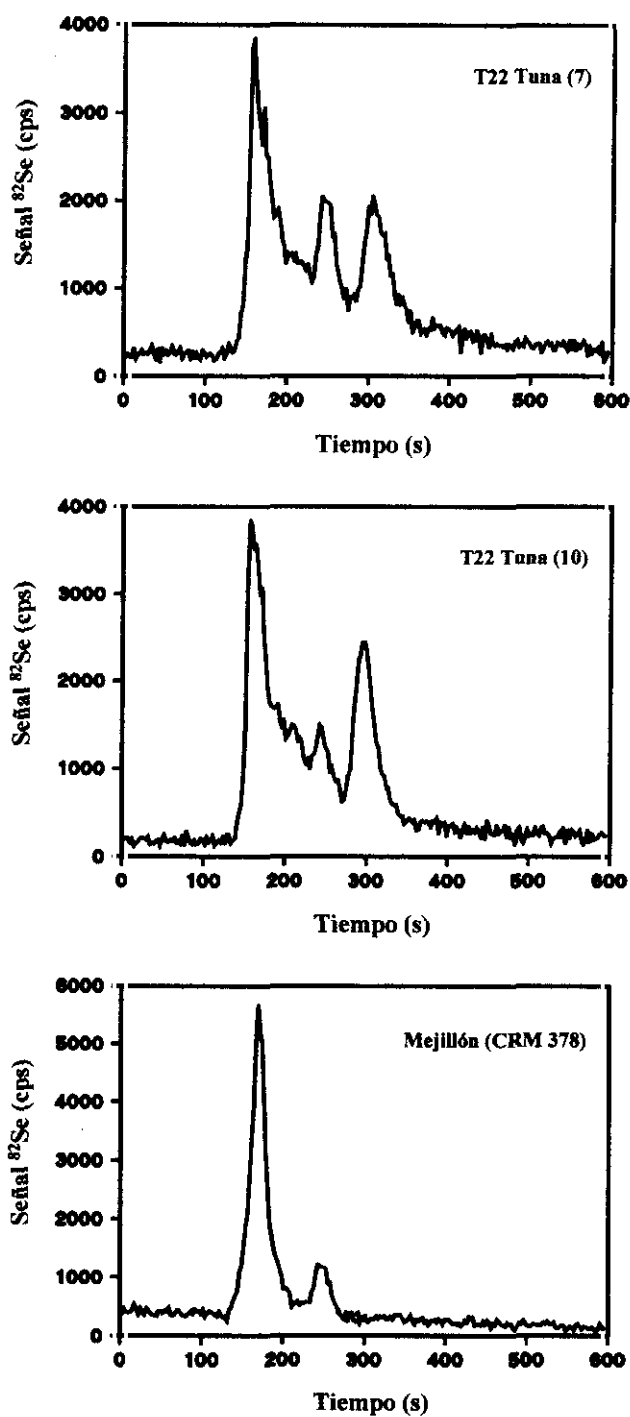


Figura 43. Cromatogramas obtenidos a través del *método cromatográfico a pH=2.7* para las muestra de atún T22 (7) y (10) y el material certificado de mejillón (CRM 278), sometidas a hidrólisis enzimática.

La Figura 44 muestra los cromatogramas obtenidos a partir de los extractos de las muestras de atún T22 (7) y el mejillón certificado (CRM 278), a un nivel de dilución 1/4 y 1/2 respectivamente. Ambas figuras muestran también, para su comparación, los cromatogramas procedentes a la adición de 2.5 µg/L de Se para cada una de las especies orgánicas (TMSe⁺, SeCys₂, SeMet y SeEt), sobre el correspondiente extracto de las muestras de atún y mejillón.

El primero de los picos presentes en ambos tipos de muestra, con un tiempo de retención de unos 165-170 segundos, podría ser identificado como la especie TMSe⁺, debido al aumento en su área tras la adición de la correspondiente disolución patrón. Sin embargo, ya que esta especie eluye en el volumen muerto y debido a las características del método de separación empleado, no se descarta el hecho de que se trate de otras especies catiónicas de selenio, como la selenoniocolina [(CH₃)₂Se⁺CH₂CH₂OH] y la seleniobetaina [(CH₃)₂Se⁺CH₂COOH]. La presencia de la especie SeCys₂ no puede ser descartada en el caso de las muestras de atún, debido a la extensa cola observada en la elución del primer pico cuando el extracto se analiza sin diluir (Figura 43). Al diluir la muestra, esta cola desaparece, por lo que si se encuentra presente, lo hace en una concentración inferior a la detectable con el método empleado.

El segundo pico, con un tiempo de retención alrededor de 250 segundos, corresponde con la especie SeMet en ambos tipos de muestras, el cromatograma presentado en la Figura 44 muestra claramente el aumento del área de este pico por adición de este seleno-aminoácido.

El tercer pico presente en las muestras de atún, eluye entre los aminoácidos SeMet y SeEt, con un tiempo de retención de 310 segundos. Por lo tanto, parece corresponder a la especie "*Desconocida₁* (D₁)" encontrada en las muestras de orina, y en consecuencia se le ha designado el mismo nombre. Como dijimos entonces, su orden de elución sugiere que se trate de otro seleno-aminoácido, probablemente una forma metilada de la SeMet.

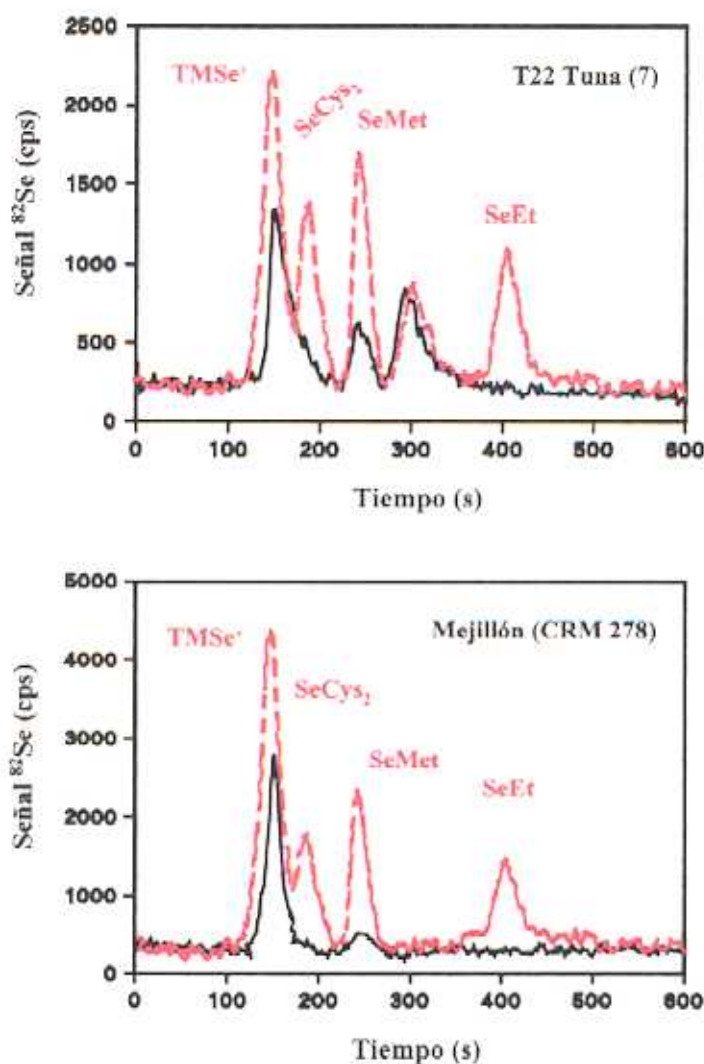


Figura 44. Cromatogramas obtenidos para los extractos procedentes de la hidrólisis enzimática de la muestra de atún T22 (7) y el mejillón certificado (CRM 278), a un nivel de dilución de 1/4 y 1/2 respectivamente. Comparación con la adición de 2.5 µg/L de Se para cada una de las especies orgánicas (—). Método cromatográfico a pH=2.7.

Una vez identificadas las especies orgánicas de selenio presentes en las muestras de atún y mejillón, se procedió a la determinación de las especies inorgánicas. Para ello se realizó el análisis cromatográfico, sobre una columna Spherisorb ODS/NH₂ y disolución fosfato a pH=6.0, con gradiente de concentración desde 3.5 a 7.0 mmol/L, como fase móvil (método cromatográfico a pH=6.0). La detección por ICP-MS se realizó a las relaciones m/z 78 y 82, bajo las condiciones de operación indicadas en la Tabla 11. La Figura 45 muestra los cromatogramas obtenidos para la muestras de atún y

de mejillón (T22 (7) y CRM 278 respectivamente), a un nivel de dilución del extracto 1/2. No se detectó la presencia de especies inorgánicas de selenio en ninguna de las muestras analizadas, debido a la ausencia de picos al tiempo de retención de estas especies, que fue comprobado a través de las adiciones correspondientes. El mismo perfil cromatográfico fue observado para los extractos sin diluir y a un nivel de dilución 1/4. Los picos que aparecen en los cromatogramas coinciden con los obtenidos con el *método cromatográfico a pH=2.7*.

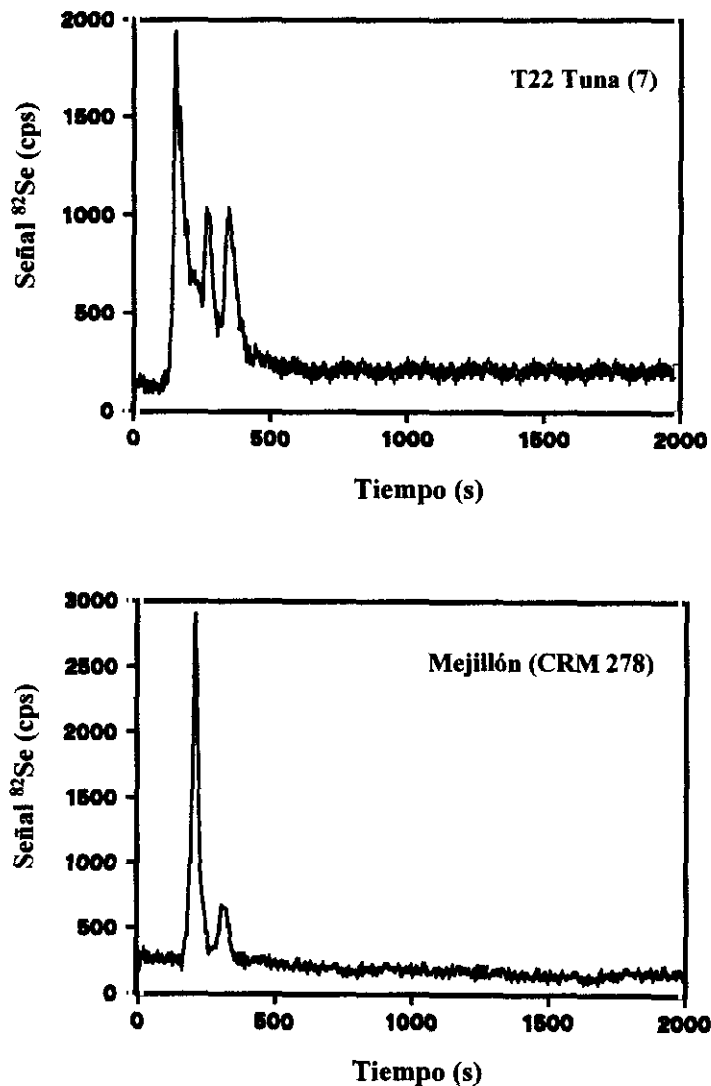


Figura 45. Cromatogramas obtenidos empleando el *método cromatográfico a pH=6*, para los extractos procedentes de la hidrólisis enzimática de la muestra de atún T22 (7) y el mejillón certificado (CRM 278), a un nivel de dilución del extracto 1/2.

3.3.3.4. Cuantificación de las especies de selenio presentes en las muestras de atún y mejillón

La cuantificación de las especies de selenio presentes en las muestras se llevó a cabo, registrando la señal del isótopo ^{82}Se a través del acoplamiento HPLC-ICP-MS, empleando el *método cromatográfico a pH=2.7* debido a la ausencia de especies inorgánicas. El procedimiento de tratamiento de muestra, desde la hidrólisis enzimática hasta el procesado a través de cartuchos de C_{18} se ha indicado en el Capítulo III (sección 3.3.1.2.b).

Con el fin de estudiar el posible efecto matriz sobre la cuantificación de especies de selenio en los extractos de las muestras de atún y de mejillón, se procedió a la comparación estadística de las pendientes obtenidas con el método de calibración convencional y el método de adiciones estándar, para las especies TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet y SeEt , los resultados se muestran en la Tabla 47. El procedimiento se llevó a cabo para un nivel de dilución 1/4 y 1/2 para los extractos de las muestras de atún y mejillón respectivamente, para evitar el solapamiento entre picos.

Tabla 47. Pendientes de calibración obtenidas en la determinación de especies de Se por HPLC-ICP-MS (*método cromatográfico a pH=2.7*), a través de los métodos de calibración convencional y de adiciones estándar a los extractos de atún y mejillón.

Especie	Calibrado Convencional		Adiciones Estándar		Muestra (dilución)
	$b \pm ts_b$	r^2	$b \pm ts_b$	r^2	
TMSe^+	$(654 \pm 9) \times 10^1$	0.9996	$(64 \pm 1) \times 10^2$	0.9992	Atún T22(7) (1/4)
			$(64 \pm 1) \times 10^2$	0.9989	Mejillón (CRM 278) (1/2)
SeCys_2	$(67 \pm 1) \times 10^2$	0.9990	$(66 \pm 1) \times 10^2$	0.9987	Atún T22(7) (1/4)
SeMet	$(667 \pm 7) \times 10^1$	0.9990	$(65 \pm 1) \times 10^2$	0.9988	Atún T22(7) (1/4)
			$(64 \pm 1) \times 10^2$	0.9990	Mejillón (CRM 278) (1/2)
SeEt	$(597 \pm 9) \times 10^1$	0.9994	$(61 \pm 1) \times 10^2$	0.9990	Atún T22(7) (1/4)

Los resultados indicados en la Tabla 47 muestran la ausencia de diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre ambos métodos de calibración, permitiendo confirmar la ausencia de efecto matriz en la determinación de las especies de selenio en este tipo de muestras, al nivel de dilución empleado.

La ausencia de efecto matriz observada durante el proceso de cuantificación, permite la estimación de la concentración de selenio de la especie desconocida (D_1) presente en los extractos de atún, a través de la calibración convencional con otra especie de selenio. Para ello se eligió la especie SeMet, debido a su proximidad en la elución y por lo tanto posible semejanza en el mecanismo de retención.

La Tabla 48 muestra de forma comparativa las concentraciones de selenio obtenidas para las distintas especies presentes en las muestras de atún T22 (7) y (10) y en el mejillón certificado (CRM 278), junto con el contenido en selenio total. La tabla incluye los porcentajes de recuperación (%R), calculados a través de la relación entre la suma de las concentraciones de selenio de las especies y la concentración de selenio total presente en las muestras.

Tabla 48. Concentración de Se total y de las especies encontradas en muestras de atún y mejillón ($\mu\text{g/g}$). Porcentaje de recuperación (%R), calculado como la relación entre la suma de las concentraciones de las especies y el total.

Muestra	*TMSe ⁺	*SeMet	*D ₁	Se Total	%R
T22 Tuna (7)	0.51 ± 0.07	0.28 ± 0.02	0.39 ± 0.05	4.57 ± 0.07	26 ± 3
T22 Tuna (10)	0.5 ± 0.1	0.15 ± 0.03	0.44 ± 0.06	4.3 ± 0.2	25 ± 4
Mejillón (CRM 278)	0.47 ± 0.04	0.07 ± 0.01	-	1.66 ± 0.04	33 ± 3

(*) Los resultados son la media ± s, para tres extractos de la misma muestra.

Los resultados muestran bajos valores de recuperación (del 25 al 33%) en la cuantificación de especies encontradas, sin embargo, los estudios anteriores habían mostrado la completa extracción del selenio presente en las muestras. El análisis del

selenio total, previa mineralización de los extractos líquidos de las muestras, filtradas a través de cartuchos de C₁₈, demostró la ausencia de pérdidas durante el proceso. Los bajos valores de recuperación encontrados pueden proceder de la etapa de hidrólisis enzimática, ya que la acción de las enzimas proteolíticas sobre proteínas produce una mezcla de aminoácidos libres junto con péptidos de tamaño variable [Belitz y col., 1997]. Posiblemente, el selenio que permanece en forma de péptidos en los extractos de las muestras, no pueda ser detectado con el método cromatográfico empleado.

Los estudios realizados, muestran un importante avance en lo referente a la determinación de especies de selenio en muestras sólidas tan complejas como pescados y moluscos, con la posible aplicación a todo tipo de tejidos biológicos. Sin embargo, para la obtención de resultados totalmente cuantitativos, se requiere de posteriores estudios que permitan recuperar el 100% del selenio presente en la muestra.

4. BIBLIOGRAFÍA

Alsing Pedersen, G.; Larsen, E.H. (1997)

Fresenius' J. Anal. Chem., 358, 591.

Ames, D. (1987)

Miles (ed.), *Urianálisis Moderno*, pp.12-15, Martin Lab., S.A.E. Barcelona.

Belitz, H-D; Grosch, W. (1997)

Acribia S.A. (2nd ed.), *Química de los Alimentos*, pp.674-675, Tipo Línea S.A. Zaragoza.

Blais, J-S.; Huyghues-Despointes, A.; Momplaisir, G.M.; Marshall, W.D. (1991)

J. Anal. At. Spectrom., 6, 225.

Blotcky, A.J.; Hansen, G.T.; Opelanio-Buencamino, L.R.; Rack, E.P. (1985)

Anal. Chem., 57, 1937.

Blotcky, A.J.; Hansen, G.T.; Borkar, N.; Ebrahim, A.; Rack, E.P. (1987)

Anal. Chem., 59, 2063.

Cobo, M.G.; Palacios, M.A.; Cámara, C.; Reis, F.; Quevauviller, Ph. (1994)

Anal. Chim. Acta, 286, 371.

Das, A.K.; Chakraborty, R.; Cervera, M.L., de la Guardia, M. (1996)

Mikrochim. Acta, 122, 209.

Emteborg, E.; Bordin, G.; Rodriguez, A.R. (1998)

Analyst, 123, 245.

Fishbein, L. (1991)

Merian E. (ed.), *Metals and their compounds in the Environment*, pp 1153-1179. UHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Fodor, P.; Barnes, R.M. (1983)

Spectrochim. Acta, 38B, 229.

Foster, S.J.; Ganther, H.E. (1984)

Anal. Biochem., 137, 205.

Foster, S.J.; Kraus, R.J.; Ganther, H.E. (1986)

Arch. Biochem. Biophys., 251, 77.

Gilon, N.; Astruc, A.; Astruc, M.; Potin-Gautier, M. (1995)

Appl. Organomet. Chem., 9, 623.

Gilon, N.; Potin-Gautier, M.; Astruc, M. (1996)

J. Chromatogr. A, 750, 327.

Glover, J.; Levander, O.; Parizek, J.; Vouk, V. (1979)

Fridberg, L.; Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. (eds.), *Handbook on Toxicology of Metals*, pp. 555-577. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.

Gómez, M.M.; Gasparic, T.; Palacios, M.A.; Cámara, C. (1998)

Anal. Chim. Acta, 374, 241.

González LaFuente, J.M.; Fernández Sánchez, M.L.; Sanz-Medel, A. (1996)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 1163.

Héninger, I.; Potin-Gautier, M.; de Gregori, I.; Pinochet, H. (1997)

Fresenius J. Anal. Chem., 357, 600.

Janghorbani, M.; Ting, B.T.G.; Lynch, N.E. (1989)

Mikrochim. Acta, 111, 315.

Kraus, R.J.; Foster, S.J.; Ganther, H.E. (1985)

Analytical Biochem., 147, 432.

Marchante-Gayón, J.M.; González, J.M.; Fernández, M.L.; Blanco, E.; Sanz-Medel, A. (1996)

Fresenius J. Anal. Chem., 355, 615.

Muñoz Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Gilon, N.; Potin-Gautier, M. (1996)

J. Anal. At. Spectrom., 11, 1171.

Muñoz Olivas, R.; Quevauviller, Ph.; Donard, O.F.X. (1998)

Fresenius J. Anal. Chem., 360, 512.

Nahapetian, A.T.; Young, V.R.; Janghorbani, M. (1984)

Anal. Biochem., 140, 56.

Palmer, I.S.; Fisher, D.D.; Halverson, A.W.; Olson, O.E. (1969)

Biochim. Biophys. Acta, 177, 336.

Palmer, I.S.; Gunsalus, R.P.; Halverson, A.W.; Olson, O.E. (1970)

Biochim. Biophys. Acta, 208, 260.

Potin-Gautier, M.; Boucharat, C.; Astruc, A.; Astruc, M. (1993)

Appl. Organomet. Chem., 7, 593.

Sanz Alaejos, M.; Díaz Romero, C. (1993)

Clin. Chem., 39/10, 2040.

Sanz Alaejos, M.; Díaz Romero, C. (1995)

Chem. Rev., 95, 227.

Shibata, Y.; Morita, M.; Fuwa, K. (1992)

Adv. Biophys., 28, 31.

Thomson, C.D. (1998)

Analyst, 123, 827.

White, A.; Handler, Ph.; Smith, E.L. (1970)

White Handler Smith (4^a ed.), *Principios de Bioquímica*, pp. 57-58. Castillo S.A., Madrid.

Yang, K-L.; Jiang, S-J. (1995)

Anal. Chim. Acta, 307, 109.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

1. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS NO ESPECTRALES SOBRE LA SEÑAL DE SELENIO POR PRESENCIA DE Na, K, Ca, Mg, Al, Cr y Ba EN LA MATRIZ, EN CONTINUO Y POR INYECCIÓN EN FLUJO

A través del estudio de interferencias no espectrales sobre la señal de selenio por ICP-MS se deducen los siguientes aspectos:

1.1. Todos los elementos estudiados producen un efecto depresor sobre la señal de selenio a partir de una concentración del orden de 250 $\mu\text{g/L}$, al introducir la muestra por nebulización continua.

1.2. La extensión del efecto interferente depende de la cantidad absoluta de elemento matriz presente en la muestra y no de la relación de concentraciones entre el elemento matriz y el analito, ya que no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos a las dos concentraciones de selenio evaluadas (50 y 100 $\mu\text{g/L}$).

1.3. No se encontraron diferencias significativas en el efecto producido sobre los tres isótopos de selenio evaluados (^{77}Se , ^{78}Se y ^{82}Se), lo que demuestra la ausencia de interferencias espectrales.

1.4. La introducción de muestra a través de la inyección en flujo reduce significativamente la interferencia de matriz originada por todos los elementos estudiados.

1.5. La reducción del efecto interferente mediante la introducción de muestra por inyección en flujo, está relacionada con la dispersión de la muestra en el sistema, debido a que los resultados son similares a los obtenidos en el análisis en continuo de la muestra convenientemente diluida.

1.6. La magnitud del efecto interferente se mostró dependiente de la masa del elemento concomitante e independiente de su potencial de ionización y del contenido en sólidos disueltos aportado por la matriz. El grado de la interferencia se ajustó al

siguiente orden: Ba>Cr>Ca≥K>Al>Mg≥Na. Este hecho está de acuerdo con la teoría del *efecto espacio-carga*, también llamado *efecto dependiente de la masa*, que propone la pérdida de iones en el haz iónico debido a repulsiones electrostáticas.

1.7. Los cambios en las condiciones experimentales, tales como caudal de gas de nebulización y potencia de radiofrecuencia aplicada, influyen considerablemente sobre el efecto y la magnitud de las interferencias de matriz. Sin embargo, no se encontraron condiciones experimentales recomendables para evitar las interferencias no espectrales, debido a que se observaron diferencias en función del elemento concomitante estudiado.

En conclusión, se recomienda realizar la determinación de selenio por ICP-MS bajo las condiciones óptimas de operación del elemento en ausencia de matriz, y el empleo de la inyección en flujo, como sistema de introducción de muestras, para reducir las interferencias no espectrales.

2. DETERMINACIÓN DE SELENIO MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE LA GENERACIÓN DE HIDRUIROS POR INYECCIÓN EN FLUJO AL ICP-MS

De los estudios realizados en la determinación de selenio a través del acoplamiento HG-FI-ICP-MS se puede concluir que:

2.1. La determinación de selenio por ICP-MS con introducción de la muestra por generación de hidruros mejora considerablemente las características analíticas del método, aumentando la sensibilidad de la determinación cerca de dos órdenes de magnitud con respecto a la obtenida al introducir la muestra como aerosol líquido.

2.2. Los límites de detección a través de la generación de hidruros fueron de 0.04 µg/L para el isótopo ⁷⁸Se (frente a 1.5 µg/L para la muestra nebulizada, con el modelo de ICP-MS *Eclipse*) y de 0.07 µg/L para los isótopos ⁷⁷Se y ⁸²Se (frente a 2.2 y 2.0 µg/L respectivamente).

2.3. La selectividad del método fue demostrada a través del estudio de interferencias procedentes de 31 elementos. La presencia de los aniones NO_3^- , PO_4^{3-} , Cl^- y SO_4^{2-} así como de los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} no da lugar a interferencias para una concentración 10000 veces mayor que la concentración de selenio ($5.0 \mu\text{g/L}$). La presencia de algunos elementos de transición produce serias interferencias negativas, que generalmente pueden ser eliminadas por aumento en la concentración clorhídrica. Sólo se observó interferencia positiva por presencia de telurio (+20% para una relación $\text{Te:Se}=1000$).

2.4. La exactitud del método se comprobó a través del análisis de selenio en una muestra de agua certificada en selenio total ($35.499 \pm 5.134 \mu\text{g/L}$) y en una muestra de agua con valores de concentración recomendados de Se^{IV} ($5.8 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$) y de Se^{VI} ($7.7 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$), no encontrándose diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%, entre los resultados obtenidos y los valores certificados.

2.5. La aplicación del método desarrollado a una muestra de agua de grifo mostró ausencia de selenio inorgánico. En el estudio de recuperación se observó la presencia de interferencias de la matriz, que fueron solventadas a través de la calibración por adiciones estándar o aumentando la concentración de ácido clorhídrico a 2.0 mol/L . Estas interferencias de matriz se atribuyeron a la presencia de metales de transición en el agua.

2.6. El análisis de selenio inorgánico en la muestra de suero sanguíneo liofilizado (reconstituido con 5 mL de agua Milli-Q) mostró la presencia de interferencias de matriz. Estas interferencias no pudieron eliminarse por aumento de la concentración clorhídrica del medio, haciendo necesaria la calibración a través del método de adiciones estándar. La ausencia de diferencias significativas entre las concentraciones de selenio inorgánico total y de Se^{IV} , permitió concluir que la especie Se^{VI} no está presente en la muestra de suero.

2.7. La determinación de selenio total en la muestra de suero, mediante mineralización y posterior reducción a Se^{IV} , permitió confirmar la presencia de otras especies orgánicas de selenio en la muestra.

2.8. Los estudios de recuperación sobre la muestra enriquecida con Se^{IV} mostraron un valor medio de $100 \pm 4\%$, lo que confirma la validez del método propuesto.

3. DETERMINACIÓN DE ESPECIES ORGÁNICAS E INORGÁNICAS DE SELENIO POR HPLC-ICP-MS

3.1. La separación de especies orgánicas (SeCys_2 y SeMet) puede realizarse por cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos, empleando una columna polimérica (Hamilton PRP-1) y pentanosulfonato sódico, como agente formador de pares iónicos, en concentración 1.0 mmol/L a $\text{pH}=4.0$ y con un 1% de acetonitrilo. El método no permite diferenciar entre las especies inorgánicas.

3.2. La separación de especies inorgánicas puede realizarse por cromatografía de cambio aniónico fuerte, con una columna Spherisorb SAX (ODS-NR_4^+) y empleando como fase móvil una disolución reguladora de fosfato 10 mmol/L a $\text{pH} 6.8$. El método no permite la diferenciación entre las especies orgánicas SeCys_2 y SeMet .

3.3. La separación simultánea de especies orgánicas e inorgánicas se consigue con una columna de cambio aniónico débil (Spherisorb ODS-NH_2), empleando un gradiente de concentración de tampón fosfato desde 3.5 a 7.0 mmol/L a $\text{pH}=6.0$. A través de este método se separan las siguientes especies: TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} , no siendo posible una separación a línea base entre las especies TMSe^+ y SeCys_2 .

3.4. La separación de las especies TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet y SeEt , se lleva a cabo sobre la columna anterior con una disolución fosfato 5 mmol/L a $\text{pH}=2.7$ como fase móvil, no eluyendo las especies inorgánicas en estas condiciones.

3.5. El aumento de la fuerza iónica de la muestra provoca un retraso en la elución de las especies inorgánicas y de la especie TMSe^+ , lo que produce un mayor grado de solapamiento entre esta última especie y el aminoácido SeCys_2 , para cualquier valor de pH de la fase móvil.

3.6. El aumento de la fuerza iónica del medio modifica únicamente la señal analítica de la especie Se^{VI} , que experimenta una reducción importante a partir de una fuerza iónica de 27 mmol/L.

3.7. El método de separación propuesto, en su acoplamiento al ICP-MS, proporciona para el isótopo ^{82}Se límites de detección entre 0.09 y 0.13 $\mu\text{g/L}$ en función de la especie considerada. La precisión fue mejor del 4% en todos los casos.

3.8. La exactitud del método se comprobó a través del análisis de dos muestras de agua, con valores recomendados para la concentración de selenito y seleniato (BCR CRM 602 y 603), no encontrándose diferencias significativas entre los valores encontrados y los recomendados a un nivel de probabilidad del 95%.

3.9. El estudio de recuperación de las especies orgánicas se llevó a cabo sobre las muestras CRM 602 y 603 previamente enriquecidas. Los resultados mostraron una recuperación para las diferentes especies entre el 96 y el 104%.

En conclusión, el método de separación propuesto empleando como detector ICP-MS, permite la separación de las especies TMSe^+ , SeCys_2 , SeMet , SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} con una fase móvil de fosfato a $\text{pH}=6$. Las muestras que contengan simultáneamente TMSe^+ y SeCys_2 requieren el empleo de disoluciones de fosfato a $\text{pH}=2.7$ como fase móvil, para conseguir la separación de dichas especies.

4. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ORINA HUMANA

De los estudios de especiación de selenio en muestras de orina humana se deducen los siguientes aspectos:

4.1. Todas las muestras analizadas mostraron el mismo perfil cromatográfico debido a la presencia de tres especies de selenio. La adición de disoluciones patrón de las especies conocidas, permitió identificar la presencia de la especie TMSe^+ , y la ausencia de

SeCys₂, SeMet, SeEt, Se^{IV} y Se^{VI}. No fue posible la identificación de las otras dos especies de selenio presentes en las muestras de orina, a las cuales nos hemos referido como "*Desconocida*₁" (D₁) y "*Desconocida*₂" (D₂), en función de su orden de elución.

4.2. Basándonos en el tiempo de retención al que eluye la especie desconocida "D₁", entre las especies SeMet y SeEt, se ha pensado que puede tratarse de otro selenoaminoácido, posiblemente una forma metilada de la especie SeMet. La especie desconocida "D₂", sufre una fuerte retención a pHs de fase móvil muy ácidos (al igual que ocurre con las especies inorgánicas) y no experimenta ninguna modificación al aumentar la concentración de fosfato de la fase móvil (a diferencia de las especies de selenio inorgánicas). Todo ello sugiere un mecanismo de retención-elución mixto entre fase inversa e intercambio iónico, lo que hace suponer que se trata de una molécula orgánica de fuerte carácter aniónico.

4.3. El procesado de las muestras de orina a través de cartuchos de C₁₈ proporciona un método sencillo y eficaz para separar las especies de selenio del resto de compuestos orgánicos presentes en la matriz. El tratamiento propuesto proporciona una mayor estabilidad a la muestra, evitando de este modo la necesidad de realizar el análisis dentro de las primeras 8 horas después de su recolección.

4.4. La determinación del selenio total en las muestras de orina por FI-ICP-MS, procesadas a través de los cartuchos de C₁₈ (dilución final 1/10), está libre de interferencias de matriz. Todas las muestras analizadas presentaron concentraciones de selenio entre 38 y 53 µg/L.

4.5. La cuantificación por HPLC-ICP-MS de las especies de selenio presentes en las muestras de orina, dio lugar a un porcentaje de recuperación entre el 88 y el 96% respecto al contenido en selenio total. La determinación está libre de interferencias de matriz.

4.6. De los estudios de estabilidad realizados sobre las especies presentes en las muestras de orina y procesadas a través de los cartuchos de C₁₈, se observaron los mejores

resultados cuando las muestras eran almacenadas en viales de polietileno a 4 °C. En estas condiciones, las especies TMSe^+ y D_2 permanecieron prácticamente estables, aunque la especie D_1 presenta pérdidas graduales en el tiempo, a partir de la segunda semana de almacenamiento, quizás debido a un proceso de adsorción sobre la superficie del material empleado en el almacenamiento.

En conclusión, a través de la utilización del tratamiento de muestra descrito anteriormente, es posible mantener las especies de selenio estables durante al menos una semana, si éstas son almacenadas en polietileno a 4 °C, evitando así el análisis inmediato.

5. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO EN MUESTRAS DE ATÚN Y MEJILLÓN

De los estudios de especiación en muestras de atún y mejillón podemos concluir:

5.1. La extracción de la grasa sobre la muestra sólida, a través de mezclas de los disolventes orgánicos: cloroformo y metanol, muestra la ausencia de pérdidas de selenio durante el proceso. Este hecho fue comprobado mediante el análisis de un material de referencia certificado en selenio total (mejillón CRM 278).

5.2. La aplicación de procesos de hidrólisis ácida, para la extracción de especies de selenio en las muestras de atún y mejillón, resultó inadecuada debido a la inestabilidad de las especies durante el proceso, además de su nula eficiencia en la extracción de selenio, bajo las condiciones de operación seleccionadas.

5.3. El estudio de estabilidad de especies de selenio sometidas a las condiciones de trabajo empleadas durante la hidrólisis enzimática, calentamiento a 37 °C durante 24 horas en un medio fosfato 0.1 M a $\text{pH}=7.5$, no mostró pérdidas o transformaciones entre las especies.

5.4. La aplicación del procedimiento de hidrólisis enzimática a las muestras de atún y mejillón en presencia de la proteasa subtilisina, proporcionó una eficiencia de

extracción del selenio del $97\pm 5\%$. El proceso de hidrólisis enzimática se realizó en dos etapas consecutivas (la segunda por adición de nueva cantidad de enzima y calentamiento a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante otras 24 horas).

5.5. El procesado de los extractos obtenidos por hidrólisis enzimática, a través de los cartuchos de C_{18} , indicó la ausencia de pérdidas significativas de las especies de selenio estudiadas.

5.6. El análisis cromatográfico mostró la presencia de tres y dos especies de selenio en las muestras de atún y mejillón respectivamente. En ambos tipos de muestra se encontró TMSe^+ y SeMet , no detectándose SeEt , Se^{IV} y Se^{VI} . La especie SeCys_2 no está presente en las muestras de mejillón, sin embargo no es posible asegurar su ausencia en las muestras de atún, debido a la ancha cola que presenta la elución de la especie TMSe^+ . Las muestras de atún presentaban además la presencia de una especie desconocida, diferente a las estudiadas. Esta especie posee las mismas características de elución que la especie "D₁" encontrada en las muestras de orina, y como hemos comentado anteriormente, posiblemente se trate de una especie metilada de la SeMet .

5.7. La cuantificación de especies de selenio presentes en las muestras de atún y mejillón no se vio afectada por la matriz. Los resultados mostraron bajas recuperaciones si se compara la suma de las concentraciones de las especies presentes y la concentración de selenio total. Este hecho probablemente se deba a la hidrólisis incompleta de las proteínas.

En conclusión, se ha propuesto un método para la determinación de especies de selenio en muestras de atún y mejillón, que puede ser aplicado a todo tipo de muestras biológicas complejas.

ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículo 1: "Optimization of Flow Injection Hydride Generation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Determination of Selenium in Water and Serum Samples".

J. Anal. At. Spectrom., 10, 871, 1995.

Artículo 2: "Determination of Selenocystine, Selenomethionine, Selenite and Selenate by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry".

J. Anal. At. Spectrom., 11, 407, 1996.

Artículo 3: "Evaluation of non-spectroscopic matrix interferent effect on selenium signal in inductively coupled plasma mass spectrometry by continuous nebulization and flow injection".

Química Analítica, 16, 281, 1997.

Artículo 4: "Determination of Selenium Species in Human Urine by High Performance Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry".

Talanta, (en prensa).

Artículo 1

Optimization of Flow Injection Hydride Generation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Determination of Selenium in Water and Serum Samples

M. ANGELES QUIJANO, ANA MARIA GUTIÉRREZ, M. CONCEPCION PÉREZ CONDE AND CARMEN CÁMARA

Departamento de Química Analítica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Flow injection hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry (FI-HG-ICP-MS) was used to determine selenium in waters and serum samples. Flow injection parameters such as sample volume, purge gas flow rate, forward power, and acid and reductant concentration and flow rate were investigated and optimized. The possible interference of 31 elements in the selenium determination by this technique was evaluated. The selenium detection limit using a volatile hydride (35 ng l^{-1}) is about two orders of magnitude lower than that obtained by aqueous sample introduction using pneumatic nebulization ($3 \mu\text{g l}^{-1}$). The calibration graph is linear over 3 orders of magnitude and relative standard deviations are generally better than 5%. The method was successfully applied to the determination of selenium in certified water samples and in water and serum spiked samples ($1.0\text{--}5.0 \mu\text{g l}^{-1}$) with a recovery in the 92–104% range.

Keywords: Inductively coupled plasma mass spectrometry; flow injection; hydride generation; selenium; interferences; water; serum

Selenium is an essential element in many species, including humans, acting as the active centre of glutathione peroxidase, an enzyme that is principally involved in the removal of peroxides from cells to prevent oxidative damage.^{1,2} Selenium deficiency results in a variety of diseases, while an excess produces chronic selenosis leading to severe toxic symptoms and death.

Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) provides very low detection limits for trace elements, but it suffers from such problems as pre-atomization losses and spectral interferences when Se is determined in biological materials.

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is a very powerful technique for determining trace elements in many types of samples.^{3,4} Predominantly singly charged positive ions are generated in an argon plasma source and then transferred into a mass analyser. The degree of ionization of most elements in an Ar plasma exceeds 90%. However, selenium has a high ionization potential (9.752 eV) close to the Ar ionization potential (15.759 eV) and consequently, the proportion of ions produced in the plasma source drops to about 30%.^{5,6} Furthermore, the peaks of most selenium isotopes are overlapped by those of polyatomic ions derived from argon. The severe interference suffered by the most abundant Se isotope with $m/z = 80$ (isotopic abundance = 49.82%) from the dimer of argon ($^{80}\text{Ar}_2^+$), makes it necessary use a less abundant isotope of $m/z = 78$ (isotopic abundance = 23.52%) for this determination. This isotope is interfered by another dimer of argon ($^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$) but the isotopic abundance of ^{38}Ar is about 0.06%, which gives rise to a slight increase in background, but the signal-to-noise ratio is better than for the

most used isotope of $m/z = 82$ (isotopic abundance = 9.19%). These two characteristics result in relatively poor sensitivity and detection limit for Se.

In contrast to pneumatic nebulization, the hydride generation (HG) method enjoys higher sample transport efficiency (near 100%) and better sensitivity.⁹ Additionally, the gaseous hydride can be separated from the sample solution matrix to eliminate nearly all spectral and/or chemical interferences in the sample matrices.¹⁰ Continuous hydride generation for ICP-MS has already been described in the literature,^{8–12} but only Stroh and Völlkopf⁵ have used sample introduction by flow injection (FI) vapour generation with a sample loop of 500 μl for the determination of As, Sb and Hg in water reference materials; they also report some precision and detection limit data for Se, Te and Bi.

The purpose of the present work was to assess the performance of FI-HG-ICP-MS for the determination of selenium in waters and biological fluids.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

The flow injection system is shown in Fig. 1. The sample is injected into the continuous flow of HCl through a six-way valve (Omnifit). The acid and reductant solutions are pumped with a Gilson HP-4 peristaltic pump. The sample and acid are mixed in a first coil (R_1), and then enter the reactor coil (R_2), where the selenium is reduced with NaBH_4 . The hydride formed is carried by Ar through the U-tube gas-liquid water-cooled separator (home design) to the Fassel plasma torch in the ICP-MS, while the liquid phase goes to drain (Fig. 2).

The ICP-MS instrument used was an Eclipse (Fisons Instrument). The Eclipse was first fully optimized in its normal configuration (pneumatic nebulization) for ion lens voltages, nebulizer gas flow rate, quadrupole resolution and pole bias using a standard solution containing elements across the mass range from beryllium to uranium at concentrations of $25 \mu\text{g l}^{-1}$. The nebulizer gas line was then connected to the gas-liquid phase separator. The selenium hydride generated was connected directly to the plasma torch interchannel. The optimization was again checked using a $5 \mu\text{g l}^{-1}$ selenium

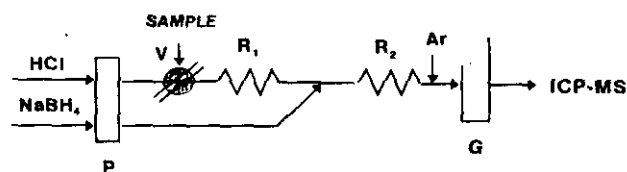


Fig. 1 FI system: P, peristaltic pump; V, injection valve; R_1 , first coil; R_2 , reaction coil; G, gas-liquid separator (U tube)

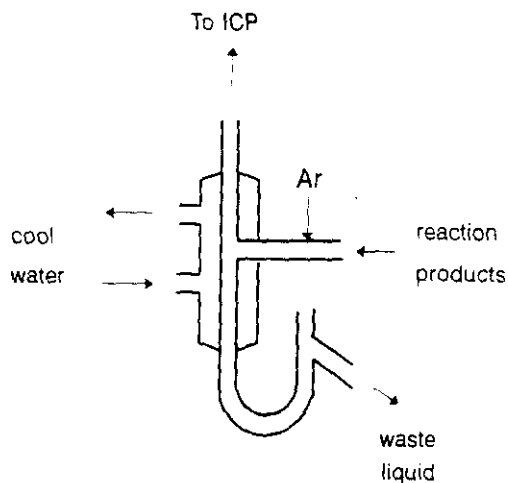


Fig. 2 U tube gas-liquid water-cooled separator

standard. Forward power was raised to 1350 W and the nebulizer gas flow was reduced from 1.25 to 1.00 l min⁻¹. No further adjustment of the quadrupole or lens settings was required for optimum signal response. The conditions used are summarized in Table 1.

Reagents and Standards

Stock standard selenium (IV) solution (1000 mg l⁻¹) was purchased from Fisher. Working standard solutions were prepared daily. Sodium tetrahydroborate (NaBH₄) solution 0.5% m/v was prepared by dissolving NaBH₄ powder (Aldrich) of 98% purity, in de-ionized Milli-Q water (Millipore) and stabilizing with 0.1% m/v sodium hydroxide (Merck). Solutions were filtered before use to eliminate turbidity and then stored in a refrigerator. Hydrochloric acid (HCl) solution (0.6 mol dm⁻³) was prepared by dilution of concentrated HCl (Carlo Erba). Sodium selenate and sodium selenite powder (Aldrich) of 98% and 99% purity, respectively, were used to prepare synthetic water and to spike tap water and serum samples. Certified water was purchased from Setpoint Laboratory Standards (A.P.G.) and synthetic water was prepared by dissolving sodium selenite and sodium selenate (8.0 and 6.0 µg l⁻¹, respectively) in distilled water to which large amounts of NaCl were added up to 20.0 g l⁻¹.

Sample Pretreatment

Water samples (certified, synthetic and tap water) were acidified with concentrated hydrochloric acid (3 ml of HCl per 5 ml of sample) and boiled to 100 °C for 10 min to convert Se^{VI} to Se^{IV}. Different tap water aliquots, without and with previous

sodium selenate additions, were treated following the same procedure (the selenium-spiked solutions were of 2.5 and 5.0 µg l⁻¹). After cooling, the samples were transferred into a 10 ml calibrated flask and diluted to volume with deionized water.

A 1 ml aliquot of serum sample was diluted to 50 ml with de-ionized water. Different aliquots of 5 ml were treated as for the water samples after previous sodium selenate additions of 1.0, 2.5 and 5.0 µg l⁻¹. Then samples were transferred into 10 ml calibrated flasks and diluted with de-ionized water. Two drops of silicon, as anti-foaming agent, had to be added to prevent formation of foam that blocks the hydride generator system.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Sodium Tetrahydroborate (III) Concentration

Different NaBH₄ concentrations in the 0.1–2% m/v range were tested to determine the optimum. Fig. 3 shows that maximum sensitivity is obtained at 0.5% m/v NaBH₄, and this concentration was adopted for further experiments. At concentrations above 1.5% m/v, the plasma became unstable and easily extinguished.

Effect of Hydrochloric Acid Concentration

Hydrochloric acid concentrations in the 0.1–6 mol l⁻¹ range were tested. The results are illustrated in Fig. 4. The response for selenium increased with acid concentration to reach a plateau ranging from 0.6 to 4.0 mol l⁻¹. A concentration of 0.6 mol l⁻¹ HCl was chosen for further work.

Influence of Flow Rates

To determine the optimum flow rates for HCl and NaBH₄ solutions, the range 1.0–4.5 ml min⁻¹ was tested. This study

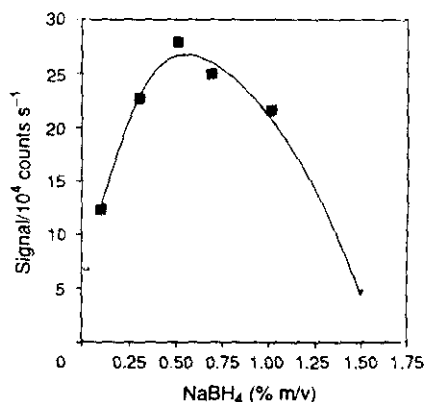


Fig. 3 Effect of NaBH₄ concentration on the signal from 2.0 µg l⁻¹ Se^{IV}

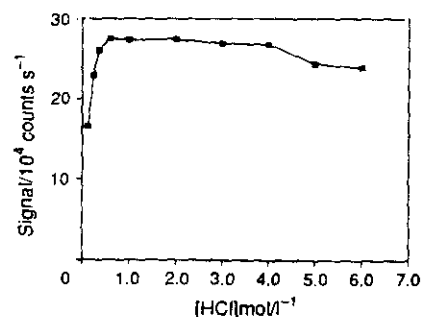


Fig. 4 Effect of HCl concentration on the signal from 2.0 µg l⁻¹ Se^{IV}

Table 1 Optimal operating conditions

ICP-MS	
Forward power/w	1350
Reflected power/w	<0.5
Coolant gas flow/l min ⁻¹	14
Auxiliary gas flow/l min ⁻¹	0.7
Carrier gas flow/l min ⁻¹	1.0
Data collection mode	Single monitoring
Integration time/s	0.7
Hydride generation	
NaBH ₄ concentration (% m/v)	0.5
NaBH ₄ flow-rate/l min ⁻¹	1.7
HCl concentration/mol l ⁻¹	0.6
HCl flow-rate/ml min ⁻¹	3.5
sample injection volume/µl	100
R ₁ and R ₂ coil length (0.5 mm id)/cm	30

has been carried out for three HCl:NaBH₄ flow rate ratios (1:1, 1:0.5 and 1:0.33). Fig. 5 shows a rise in the signal from selenium when both flow rates are increased. It can be seen that there are no significant differences when flow rate ratios of 1:1 and 1:0.5 are used, while a loss of sensitivity was detected with the 1:0.33 flow rate ratio.

On the other hand, flow rates up to 3.5 ml min⁻¹ cause plasma disturbance. To prevent this, an HCl solution flow rate of 3.5 ml min⁻¹ and a NaBH₄ solution flow rate of 1.7 ml min⁻¹ were chosen.

Optimization of Sample Volume Injected into the FI System and Coil Length

To determine the optimum sample volume to be injected, loop volumes in the 25–500 µl range were tested. Maximum peak height signals were obtained with a sample injection volume of 100 µl. Further increase of the sample loop volume resulted in double peaks. This problem disappeared when the lengths of coils (R₁ and R₂) were increased. Nevertheless no increase in signal intensity was observed either when the length was varied within the 30–500 cm range or injection volume was increased over 100 µl. Therefore, a sample injection volume of 100 µl and a 30 cm length for both coils were chosen for further experiments.

Carrier Gas Flow Rate and Forward Power

Carrier gas flow rate and plasma forward power were optimized simultaneously for Se determination using the FI system. The effects of these parameters on the sensitivity of ⁷⁸Se determination are shown in Fig. 6. Maximum sensitivity was achieved at an Ar flow rate of 1.0 l min⁻¹, but was independent of rf

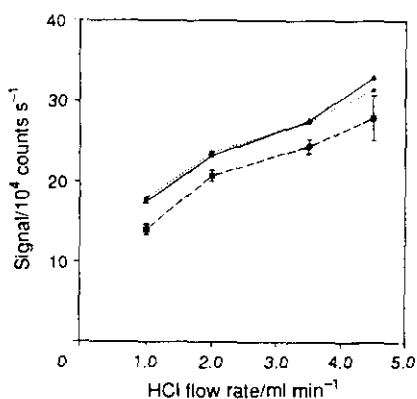


Fig. 5 Effect of HCl and NaBH₄ flow rates on the sensitivity from 2.0 µg l⁻¹ Se^{IV}: HCl:NaBH₄ flow rates = ▲, 1:1; ★, 1:0.5; and ■, 1:0.33

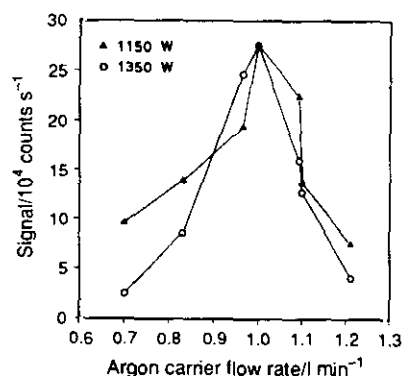


Fig. 6 Variation in signal for 2.0 µg l⁻¹ Se^{IV} with carrier gas flow rate and forward power

power. This flow rate was therefore used for all further measurements.

A carrier gas flow rate of <1.0 l min⁻¹ overheated the injector tube, causing premature decomposition of the hydrides in the tube, while higher flow rates also decreased the signal because of the effect of Ar dilution.¹³

One drawback inherent in HG is that the gaseous by-products of the hydride reaction (H₂, H₂O vapour and CO₂), which cause plasma instability and poor precision, might extinguish the ICP source. This problem can be overcome by increasing the rf power. A medium forward power of 1350 W was chosen for further measurements. Higher power gave high background due to photon noise^{11,14} and decreased the signal to noise ratio.

Water vapour was eliminated by water cooling to produce condensation in the U-tube gas-liquid separator.

Interferences

The interference of 31 elements in selenium hydride generation in FI-HG-ICP-MS was evaluated; the results are shown in Table 2. The anions NO₃⁻, PO₄³⁻, Cl⁻ and SO₄²⁻ and the cations Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ do not interfere, even at concentrations 10000 times that of Se. Some transition elements produce serious negative interference; only Te increases the signal (+20% for Te:Se=1000).

Some authors found that interference from Cu²⁺ and Ni²⁺ in SeH₂ generation could be eliminated by the formation of their stable chlorocomplexes in 7.5 mol dm⁻³ HCl.¹² We evaluated this approach by varying the HCl concentration from 0.6 to 8 mol l⁻¹ in the presence of Cu or Ni at concentrations 1000 times that of the Se. In 2 mol l⁻¹ HCl, Ni did not interfere at concentrations 1000 times that of the Se, but removal of Cu interference (until a ratio of Cu:Se=100 was reached) in 8 mol l⁻¹ HCl was necessary.

Analytical Characteristics

The analytical characteristics were evaluated by the continuous flow and the FI methods. The precision of the HG process was evaluated using two standard solutions containing 5 and 1 µg l⁻¹ Se^{IV}. The RSDs were calculated for each solution from five replicate measurements under the conditions listed in Table 1.

The precision of the FI method was lower than that of the continuous flow method. The precision of both methods varied with rf forward power and improved when 1350 W was used, as indicated in Table 3. The RSDs for the FI method are generally better than 5%.

The detection limit (DL) is defined as three times the standard deviation obtained from ten replicate blank determi-

Table 2 Study of interferences on selenium signal (from 5 µg l⁻¹ of Se^{IV}); relative signal is the ratio between the Se signal in the absence and presence of interferences expressed as a percentage

Ion	Ion:Se ^{IV}	Relative signal (%)
NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻	10000*	102 ± 3
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	10000*	98 ± 4
As ^{III} , As ^V , Sb ^{III} , Sb ^V	1000*	101 ± 2
Al ^{III} , Cr ^{III} , Mn ^{II} , Zn ^{II}		
Co ^{II} , Tl ^{III} , V ^V , Fe ^{III} , F ^I		
Hg ^{II} , Cd ^{II} , Ge ^{II} , Ni ^{II} †		
Ni ^{II} , Pb ^{II} , Te ^{IV} , Bi ^{III}	100	97 ± 3
Sn ^{II} , Pt ^{II} , Cu ^{II} ‡		
Cu ^{II} , Pd ^{II} , Ag ^I	1	98 ± 3
Cu ^{II} , Pd ^{II} , Ag ^I	10	70 ± 5

* Maximum amount tested.

† With 2.0 mol l⁻¹ HCl.

‡ With 8.0 mol l⁻¹ HCl.

Table 3 Effect of rf forward power on precision (RSDs from five replicates) of measurement for sample introduction by FI and continuous flow

Se ^{IV} /μg l ⁻¹	Method	Forward power/W	
		1150	1350
5.0	FI	5.0%	3.5%
	Continuous	3.7%	2.3%
1.0	FI	7.0%	5.0%
	Continuous	6.1%	4.2%

Table 4 Selenium recovery study (μg l⁻¹); n = 3

Sample	Certified value/μg l ⁻¹	Added/μg l ⁻¹	Found/μg l ⁻¹	Recovery (%)
Certified water	35.50 ± 5.13	—	33.6 ± 1.4	—
Synthetic water	—	14.0	12.9 ± 0.1	92.1 ± 0.7
Tap water	—	—	<DL	—
	—	2.50	2.47 ± 0.04	98.8 ± 1.6
	—	5.00	4.67 ± 0.07	93.4 ± 1.4
Serum (diluted 1:100)	—	—	0.35 ± 0.03	—
	—	1.00	0.97 ± 0.03	97.0 ± 3.0
	—	2.50	2.46 ± 0.05	98.4 ± 2.0
	—	5.00	5.21 ± 0.10	104 ± 1.5

nations. The detection limit found was 35 ng l⁻¹ of selenium for both systems (continuous flow and FI), which was 100 times better than that of the classical nebulization system.

The equation of the calibration graph is $y = -7346 + 141.846x$, where y is the analytical signal in counts s⁻¹, and x is the selenium concentration in μg l⁻¹. The correlation coefficient (r) was better than 0.999.

The linear dynamic range was limited to protect the detector from ion count rates exceeding 5.0×10^6 counts s⁻¹, which limited the maximum Se concentration to 30 μg l⁻¹.

Sample Analysis

The proposed method was applied to certified water, synthetic and tap water, and serum samples. The results obtained are shown in Table 4. No selenium was found in the unspiked tap water. The recoveries in Se-spiked samples were from 92 to 104%.

The selenium content in the unspiked serum sample was found to be 0.35 ± 0.03 μg l⁻¹ (equivalent to 35 ± 3 μg l⁻¹ in the original serum sample). There is no significant difference at the 95% confidence level between the measured and certified values.

Conclusion

Hydride generation in conjunction with ICP-MS is a very powerful technique that considerably enhances the analytical capabilities of ICP-MS for determining selenium at ultratrace levels in environmental and biological samples with very good precision.

The advantage of the proposed FI system over the continuous flow method is that sample volume is minimized without loss of sensitivity.

The authors are grateful for financial support from CICYT under project PB 92-0218 and the Measurements and Testing Programme (EC) under project MAT1-CT930006 and to Max Gormann for revising the manuscript.

REFERENCES

- Merian, E., Clarkson, T. W., and Fishbein, L., *Metals and their Compounds in the Environment*, UHC Verlagsgesellschaft, Germany, 1991, pp. 1153–1158.
- Muñoz Olivas, R., Donard, O. F. X., Cámara, C., and Quevauviller, P., *Anal. Chim. Acta*, 1994, **286**, 357.
- Gray, A. L., Jarvis, K. E., and Houk, R. S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Chapman and Hall, New York, 1991, pp. 225–309.
- Vanhoe, H., Dams, R., and Versieck, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, **9**, 23.
- Stroh, A., and Völlkopf, U., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 35.
- Tao, H., Lam, J. W. H., and McLaren, J. W., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 1067.
- Pretty, J. R., Blubaugh, E. A., and Caruso, J. A., *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 3396.
- Heitkemper, D. T., and Caruso, J. A., *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**, 228.
- Janghorbani, M., and Ting, B. T. G., *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 701.
- Haraldsson, C., Pollak, M., and Öhman, P., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 1183.
- Powell, M. J., Boomer, D. W., and McVicars, R. J., *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2864.
- Buckley, W. T., Budac, J. J., Godfrey, D. V., and Koenig, K. M., *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 724.
- Thompson, M., Pahlavanpour, B., Walton, S. J., and Kirkbright, G. F., *Analyst*, 1978, **103**, 568.
- Hwang, J. D., Huxley, H. P., Diomiguardi, J. P., and Vaughn, W. J., *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**, 491.

Paper 5/00785B

Received February 9, 1995

Accepted April 25, 1995

Artículo 2



Determination of Selenocystine, Selenomethionine, Selenite and Selenate by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

M. ANGELES QUIJANO, ANA MARIA GUTIÉRREZ, M. CONCEPCIÓN PÉREZ-CONDE AND CARMEN CÁMARA

Departamento de Química Analítica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

An analytical method has been developed for the determination of selenocystine, selenomethionine, selenite and selenate. Separation of the four Se species was achieved by HPLC on a Spherisorb 5 ODS-AMINO column using a concentration gradient from 3.5 to 7.0 mmol l⁻¹ phosphate buffer of pH 6.0 as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. Detection was carried out using an on-line inductively coupled plasma mass spectrometer. The chromatographic parameters and the chemical factors affecting the separation of the Se species were optimized. The detection limits, using a 100 µl sample loop volume and expressed as Se, were found to be 2.0, 1.0, 1.6 and 1.2 µg l⁻¹ for selenocystine, selenomethionine, selenite and selenate, respectively. The precision was better than 5% in all instances. The method was successfully applied to the determination of the four Se species in water samples certified for selenite and selenate, to which selenocystine and selenomethionine had been added.

Keywords: Inductively coupled plasma mass spectrometry; high-performance liquid chromatography; selenium speciation; water

Since the first reports in 1957 that Se was an essential element, continued progress has been made in identifying the natural seleno compounds in biological media and in elucidating their function.¹

Selenium has been identified as an essential element in many species, including humans, in which it is a component of glutathione peroxidase, which is necessary for the removal of hydrogen peroxide and lipid peroxidases from cells. Selenium is also known to prevent the appearance of toxic effects normally caused by elements such as As and Hg.² There is a narrow range of Se intake that is consistent with health; outside this range, deficiency diseases and toxicity occur. At higher doses, Se is toxic: diets containing more than 5 mg kg⁻¹ of Se are considered to be poisonous to man and animals.¹

In the aqueous environment, selenite and selenate are the most common Se compounds, and in biological samples both inorganic and organic Se species can be present.³

Several chromatographic methods for the separation of seleno compounds, with non-specific and specific detectors, have been reviewed.³⁻⁵ Volatile Se compounds (dimethyl selenide, dimethyl diselenide, diethyl selenide, methanoselenol) have been separated by gas chromatography.⁶ For the speciation of non-volatile Se compounds, both liquid and gas chromatography are used. The latter requires a prior derivatization step to convert the Se species into volatile forms. Various reagents are available such as trimethylsilylacetamide, cyanogen bromide and *o*-phenylenediamine.^{3,7}

Liquid chromatography is preferred for the separation of non-volatile species without prior derivatization. In most publi-

cations, selenite and selenate are separated using an ion-exchange chromatography column. Separation is based on a strong anion exchange, with elution using different buffers.⁸⁻¹⁰ Some researchers who include the elution of trimethylselenonium (TMSe⁺) in the dead volume, using either hydride generation,¹⁰ or electrothermal⁸ atomic absorption spectrometry as the method of detection, give detection limits of about 1.27, 0.76 and 1.67 ng of Se for selenite, selenate and TMSe⁺, respectively.

Selenocystine (SeCys) and selenomethionine (SeMet) have been separated using either ion-exchange¹¹ or ion-pair¹² chromatographic methods.

Potin-Gautier *et al.*¹² have carried out the separation of SeCys and SeMet by ion-pair chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometric detection, with detection limits of 1.0 and 0.8 ng of Se, respectively. Using this method, selenite and selenate were not well resolved, interfering in the separation of seleno-amino acids.

The use of Se specific detectors is preferred to reduce the interferences and improve the detection limits. Hydride generation (HG) coupled to any type of atomic detector requires the prior conversion of seleno species into Se^{IV},¹⁰ while electrothermal atomic absorption spectrometry requires fraction collection⁸ after elution or a sophisticated design,¹² in order to connect the chromatographic column and graphite furnace.

The aim of the present work was to design a simple procedure for the simultaneous separation of the four Se species mentioned above, all of which may be present in real samples. It was decided to use ICP-MS detection with the aim of facilitating very low detection limits, and allowing easy interfacing, through a direct connection between the HPLC column and the nebulizer.

The coupling of HPLC to ICP-MS has previously been used in the analysis of metal-containing species for As, Pb, Sn and Hg.^{13,14}

The use of ICP-MS detection requires certain modifications to the chromatographic method compared with those previously used with other types of detector. Buffer concentrations must be decreased to prevent salt deposition and clogging of the sampling orifice, while the concentrations of organic solvents must be controlled to avoid plasma instability.¹⁵

EXPERIMENTAL

Instrumentation

The chromatographic system used consisted of a Milton Roy CM4000 HPLC pump with a Milton Roy six-port sample injection valve fitted with a 100 µl loop (Milton Roy LDC Division, Riviera Beach, FL, USA). Separations were performed on a 5 µm Spherisorb ODS (octadecyl silica)-AMINO

column (250 × 4.6 mm id) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). In this mixed column, the stationary phase consists of an equimolar mixture of octadecyl and amino groups on a silica support, operating as a reversed-phase, weak anion-exchange or ion-pairs chromatographic column.

Separation was achieved with a phosphate buffer of pH 6.0 as the mobile phase, using a concentration gradient from 3.5 to 7.0 mmol l⁻¹.

Detection was performed using an Eclipse ICP-MS instrument (Fisons Instrument, Uxbridge, Middlesex, UK). The Eclipse instrument was first optimized, independently of the chromatographic system, for nebulizer gas flow rate, ion lens voltages, quadrupole, resolution and pole bias, using a standard solution containing elements across the mass range, from Be to U at concentrations of 10 µg l⁻¹. The optimization was also checked using a 25 µg l⁻¹ Se standard solution, in order to improve optimization further.

The chromatographic system was then coupled to the ICP-MS instrument with 20 cm of poly(tetrafluoroethylene) capillary tubing (0.5 mm id) from the column outlet to the inlet of the standard Meinhard nebulizer.

During the HPLC-ICP-MS runs, only the ion at *m/z* = 78 was monitored, since it presents a better signal-to-noise ratio than the other Se isotopes.¹⁶ The chromatographic peaks were evaluated by their areas. The conditions used are summarized in Table 1.

Reagents and Standards

Selenium stock standard solutions (1000 mg l⁻¹ as Se) were prepared from sodium selenate (Se^{VI}), sodium selenite (Se^{IV}), SeCys and SeMet, which were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The use of 3% v/v HCl was necessary to solubilize SeCys. Stock solutions were stored in the dark at 4 °C. Working standards were obtained daily by dilution of the stock solutions with de-ionized Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA).

The eluents used for the separations were phosphate buffers of pH 6.0 at concentrations of 3.5 and 7.0 mmol l⁻¹. Solutions were prepared by mixing independent solutions of Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ (Panreac, Barcelona, Spain) until the desired pH was reached.

Artificial serum, to test the ionic strength effect, was prepared by dissolving 3.5 g of NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 1.5 g of KCl (Merck), 2.5 g of NaHCO₃ (Merck) and 20 g of glucose (Merck) in 0.5 l of de-ionized water.

Water (BCR CRM 603) certified for Se^{IV} and Se^{VI} (35.33 and 44.82 µg l⁻¹, respectively) was used for validation of the method.

Table 1 Optimum ICP-MS and chromatographic operating conditions

<i>ICP-MS</i> —	
Forward power	1150 W
Reflected power	<0.5 W
Coolant gas flow rate	14 l min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.7 l min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.8 l min ⁻¹
Data collection mode	Single monitoring
Integration time	1.0 s
<i>Chromatography</i> —	
Analytical column	Spherisorb 5 ODS-AMINO
Mobile phase	Phosphate buffer
Phosphate buffer pH	6.0
Gradient concentration	3.5–7.0 mmol l ⁻¹
Gradient time	1.0 min
Flow rate	1.0 ml min ⁻¹
Sample injection volume	100 µl

All solutions were filtered through a 0.45 µm membrane filter and de-gassed before use.

Procedure

The chromatographic separation of SeCys, SeMet, selenite and selenate standards was performed by injecting solutions containing the four compounds onto the column and initially eluting with 3.5 mmol l⁻¹ phosphate buffer of pH 6, at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. After 5 min, the eluent was changed to 7 mmol l⁻¹ phosphate buffer of pH 6, using a linear concentration gradient over a 1 min period. Detection of each eluted Se species was carried out by ICP-MS using the operating conditions given in Table 1. The analytical peaks obtained were evaluated by peak area measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

Column Selection

A previous paper¹² has described the separation of SeCys and SeMet using ion-pair chromatography. In the present work, this method was developed for the separation of the four Se species using cationic ion-pairing reagents. Studies were performed on a 5 µm Hamilton PRP-1 styrene-divinylbenzene column (150 × 4.1 mm id), eluting the Se compounds with an aqueous mobile phase containing the ion-pairing reagent and a low percentage of acetonitrile (1–5% v/v).

Two reagents were tested: tetraethylammonium bromide at various concentrations (10⁻⁴–10⁻² mol l⁻¹) and tetradecyltrimethylammonium bromide at concentrations below its critical micellization concentration (about 4 × 10⁻⁴ mol l⁻¹), but with poor resolution in both instances. Selenite and selenate were not well separated from each other and eluted between SeCys (first peak) and SeMet (last peak), interfering with both.

With the use of anionic ion-pairing reagents, only cationic species can be retained. At the recommended pH for the stability of the columns utilized, SeCys and SeMet exist as zwitterions, whereas selenite and selenate are in the anionic form, and, therefore, elute in the dead volume.

Other workers^{9,10} have used a strong anion-exchange column for the separation of selenite and selenate, employing a variety of buffers as the mobile phase. The use of a Hamilton PRP-X100 column was attempted in this work; however, SeCys and SeMet eluted in the dead volume.

Finally, a mixed column was tested, *viz.*, Spherisorb ODS-AMINO, on which amino groups can be protonated by the use of an appropriate buffer in the mobile phase. The separation of the four Se species was achieved with this column using a concentration gradient of phosphate buffer as described in detail later. The elution order was SeCys, followed by SeMet, selenite and selenate.

According to the acidity constants for selenous acid (pK₂ = 2.46 and pK₁ = 7.31) and selenic acid (pK₁ = 1.92), in the pH range recommended for the stability of the column (2.0–8.0), selenite and selenate are predominantly present as HSeO₃⁻ and SeO₄²⁻, respectively; hence, the observed elution order suggests an anion-exchange chromatographic mechanism.

In the pH range 2.0–8.0, SeCys and SeMet exist as zwitterions; the former molecule contains terminal polar and ionized functions, with two negative charges. Although this should lead to longer retention, SeCys elutes first followed by SeMet. This could be due to a reversed-phase mechanism for the retention of seleno-amino acids, in which SeMet would be retained longer since its alkyl chain is more accessible than that of SeCys.

The dead volume of the system was determined by passing a 20 µg l⁻¹ LiCl solution through the column at various flow rates. The Li⁺ ion, which should not be retained by the

column, was monitored by ICP-MS at $m/z=7$. The dead volume of the system was calculated to be 2.04 ± 0.01 ml.

Effect of pH

In order to evaluate the influence of pH on the retention times of the analytes, different 5.0 mmol l^{-1} phosphate buffer solutions in the pH range 2.5–7.0 were used as mobile phases.

The retention ability of the column is related to the capacity factor (k'). This parameter is independent of the flow rate and the dimensions of the column.

The results obtained are presented in Fig. 1, in which it can be seen that the inorganic Se species do not elute at pH values below 6. Within the pH range studied, selenite and selenate are present as HSeO_3^- and SeO_4^{2-} , as mentioned above, and the predominant phosphate species are H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} . Above pH 6, the predominant phosphate species is HPO_4^{2-} , which is able to compete with the Se species retained, which are then eluted. Below pH 6, the predominant anion, H_2PO_4^- , is not able to remove the inorganic Se species from the column. This suggests that the retention–elution of selenite and selenate on the column is due to an anion-exchange mechanism, which is governed by the protonation of Se and phosphate anions. These anions compete for the NH_3^+ groups of the stationary phase where the HPO_4^{2-} species is responsible for the elution.

Furthermore, the significant decrease in k' , on increasing the pH from 6 to 7, for both inorganic Se species, is in good agreement with the proposed mechanism.

Since good resolution was not achieved for SeMet and Se^{IV} at pH 6, the separation of the four Se species was attempted using a 5 mmol l^{-1} phosphate buffer over a pH gradient from 2.7 to 6.0. The main problem encountered with the type of column used here was the long equilibration period required to reach the desired pH (about 1 h). Considering these results, it was decided to work with isocratic pH elution, at pH 6. Resolution of the chromatogram was improved by varying the buffer concentration as described in the following section.

Concentration Gradient of Phosphate Buffer and Flow Rate

In order to evaluate the optimum concentration of the mobile phase, different phosphate buffer concentrations within the range 2.5–7.0 mmol l^{-1} were tested. The use of high buffer concentrations was limited to prevent salt deposition, and clogging of the sampling and skimmer orifices.

It was not necessary to modify the adjusting parameters in the ICP-MS instrument when the effect of the different phosphate buffer solutions used was evaluated.

Fig. 2 shows the influence of the concentration of phosphate buffer on the k' values of the four Se species, at a constant pH of 6.0. The k' values for SeCys and SeMet are independent of

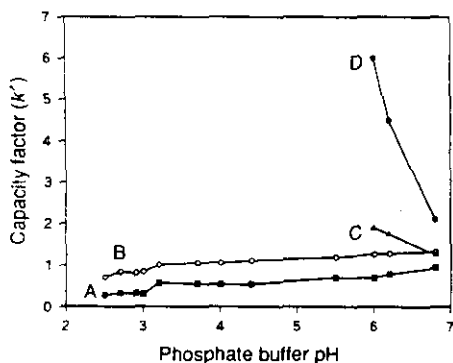


Fig. 1 Effect of pH of phosphate buffer (5.0 mmol l^{-1}) on the capacity factor (k'). A, Selenocystine; B, selenomethionine; C, selenite; and D, selenate ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ Se each)

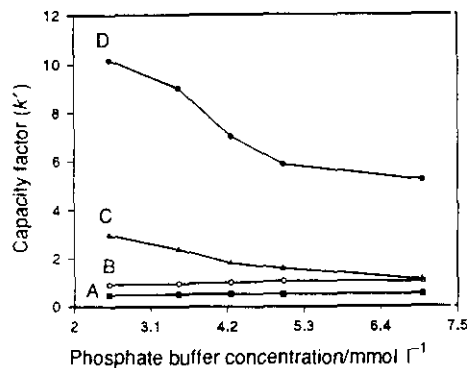


Fig. 2 Effect of phosphate buffer concentration, at pH 6.0, on the capacity factor (k'). A, SeCys; B, SeMet; C, Se^{IV} ; and D, Se^{VI} ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ Se each)

this parameter because of their separation mechanism. The k' values for selenite and selenate decrease when the mobile phase concentration is increased, particularly from 2.5 to 4.2 mmol l^{-1} .

From the results shown in Fig. 2 it can be concluded that a low phosphate buffer concentration is necessary for the optimum separation of SeMet and Se^{IV} . Although the use of a low phosphate buffer concentration for the elution of selenate is possible, it produces long analysis times, whereas an increase in the phosphate buffer concentration reduces the retention time for Se^{VI} and therefore the analysis time. For this reason, it was decided to use a concentration gradient of phosphate buffer from 3.5 to 7.0 mmol l^{-1} at pH 6. All these results agree with the mechanism proposed above. The resulting chromatogram is shown in Fig. 3. Gradient elution was used for all subsequent experiments.

In order to determine the optimum flow rate, values in the range $0.6\text{--}1.2 \text{ ml min}^{-1}$ were tested. This flow rate range was compatible with ICP nebulization flow rates. The best resolution was obtained with a flow rate of 1.0 ml min^{-1} .

Effect of Ionic Strength

Sodium chloride and artificial serum were chosen to evaluate the effect of ionic strength, the first because it is a common electrolyte in environmental samples, and the second because it contains some common electrolytes and organic material.

Different NaCl and artificial serum concentrations were added to the Se working standards for the evaluation of the

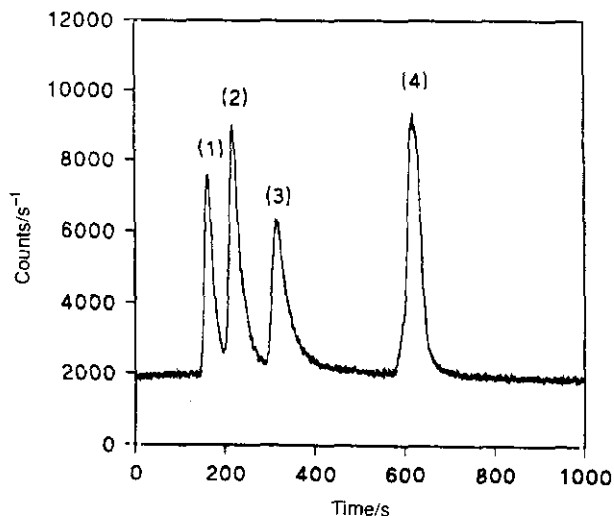


Fig. 3 HPLC-ICP-MS trace of a standard mixture of (1) SeCys, (2) SeMet, (3) Se^{IV} and (4) Se^{VI} ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ Se each)

effect of the ionic strength (1.6–850 mmol l⁻¹) on the separation of the seleno compounds. No significant differences between addition of either NaCl or artificial serum were found.

Table 2 shows the relative signals for the Se species at different ionic strengths with respect to those obtained without electrolyte. Above an ionic strength of 27 mmol l⁻¹, the relative signal of selenate begins to decrease, whereas the signals of the other three Se species are not affected in the range studied.

On the other hand, Fig. 4 shows the effect of the ionic strength on the *k'* values of the four Se species. An increase in the ionic strength does not affect the elution of SeCys or

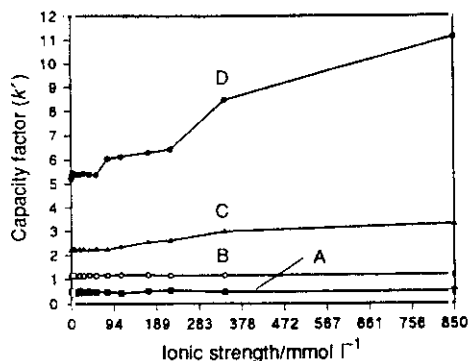


Fig. 4 Effect of the ionic strength on *k'*: A, selenocystine; B, selenomethionine; C, selenite; and D, selenate (20 µg l⁻¹ Se each)

Table 2 Effect of ionic strength on the signal of Se (20 µg l⁻¹) for the four species. Relative signal is the ratio between the Se signal in the absence and presence of NaCl or artificial serum expressed as a percentage

Ionic strength/mmoll ⁻¹	Relative signal (%)			
	SeCys	SeMet	Se ^{IV}	Se ^{VI}
1.6	99 ± 2	98 ± 3	102 ± 3	92 ± 4
4.0	93 ± 3	102 ± 4	99 ± 2	99 ± 3
8.0	99 ± 3	94 ± 4	103 ± 4	97 ± 2
16.0	91 ± 5	99 ± 3	101 ± 3	96 ± 3
18.0	92 ± 3	103 ± 4	100 ± 3	91 ± 4
27.0	93 ± 3	94 ± 3	102 ± 4	88 ± 3
40.0	95 ± 4	101 ± 3	98 ± 3	80 ± 4
55.0	94 ± 3	102 ± 4	101 ± 3	70 ± 5
80.0	89 ± 4	96 ± 3	98 ± 4	65 ± 4
110.0	96 ± 4	97 ± 4	102 ± 3	54 ± 4
170.0	101 ± 3	98 ± 3	100 ± 5	50 ± 4
220.0	95 ± 4	102 ± 4	103 ± 3	45 ± 3
340.0*	105 ± 4	98 ± 3	101 ± 4	42 ± 4
850.0*	104 ± 3	103 ± 4	102 ± 3	38 ± 3

* Ionic strength obtained only with NaCl.

Table 3 Analytical characteristics

	SeCys	SeMet	Se ^{IV}	Se ^{VI}
Retention time/s	181	253	378	732
Detection limit/ng	0.20	0.10	0.16	0.12
S _r * (%) (50 µg l ⁻¹)	3.6	4.3	3.8	2.0
(20 µg l ⁻¹)	3.9	4.7	4.0	3.4

* Relative standard deviation.

Table 4 Selenium recovery study (µg l⁻¹); n = 3

Compound	Certified value/µg l ⁻¹	Added/µg l ⁻¹	Found/µg l ⁻¹	Recovery (%)
Se ^{IV}	35.33 ± 0.40	—	36.3 ± 1.3	—
Se ^{VI}	44.82 ± 0.70	—	41.9 ± 1.2	—
SeCys	—	20.0	20.3 ± 0.5	101 ± 2.5
SeCys	—	40.0	41.4 ± 1.2	103 ± 3.0
SeMet	—	20.0	19.6 ± 0.8	98.0 ± 4.0
SeMet	—	40.0	38.5 ± 1.4	96.2 ± 3.5

SeMet, but produces an increase in the retention times of selenite and selenate at values higher than 88 mmol l⁻¹.

The retention times of the seleno-amino acids are independent of this parameter because of their partition mechanism, whereas the inorganic species are more affected by their ionic mechanism.

Analytical Characteristics

The analytical characteristics were evaluated for the four Se compounds. The precision of the method was tested using two standard solutions containing 20 and 50 µg l⁻¹ of each species. The relative standard deviations were calculated from five replicate measurements under the conditions listed in Table 1, and were better than 5% in all instances.

The detection limit is defined as three times the standard deviation obtained from ten replicate blank determinations. In this work, the signal from the blank was negligible; therefore, the detection limits were calculated using a 5 µg l⁻¹ Se standard solution. Detection limits using a 100 µl injection volume, were 0.20, 0.10, 0.16 and 0.12 ng of Se for SeCys, SeMet, selenite and selenate, respectively.

Table 3 shows the analytical characteristics for the four Se species.

Sample Analysis

The proposed method was successfully applied to the analysis of BCR CRM 603, containing 20.0 g l⁻¹ of NaCl; this CRM contains concentration levels of 35.33 and 44.82 µg l⁻¹ of selenite and selenate, respectively.

Method validation for SeMet and SeCys was achieved by adding known amounts of these compounds to the certified water.

Calibration was carried out by the method of standard additions, owing to the effect of the ionic strength on the selenate signal.

The results obtained are shown in Table 4. The recoveries of SeCys and SeMet from spiked samples were 96–103%.

Further investigations with regard to species extraction in more complex samples are in progress.

CONCLUSION

The acidity constants and the order of elution suggest a reversed-phase mechanism for the retention of seleno-amino acids and an anion-exchange chromatographic mechanism for the retention of selenite and selenate in the column used in this work.

The separation of the four Se species studied using a pH gradient is not feasible owing to the long equilibration period with respect to this variable, whereas a concentration gradient allows the separation to be carried out in less than 13 min.

Retention times of inorganic Se species are considerably affected by a change in the ionic strength.

The proposed method allows the on-line separation and detection of SeCys, SeMet, selenite and selenate, and provides high sensitivity and selectivity using a single chromatographic run.

The authors are grateful for financial support from CICYT under project PB 92-0218 and the Measurements and Testing Programme (EC) under project MATI-CT930006. We also thank M^a Jose Mancheño and Mark Austin for revision of the manuscript.

REFERENCES

- 1 Merian, E., Clarkson, T. W., and Fishbein, L., *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1991, pp. 1153-1190.
- 2 Shibata, Y., Morita, M., and Fuwa, K., *Adv. Biophys.*, 1992, **28**, 31.
- 3 Muñoz Olivas, R., Donard, O. F. X., Cámara, C., and Quevauviller, P., *Anal. Chim. Acta.* 1994, **286**, 357.
- 4 Kölbl, G., Kalcher, K., Irgolic, K. J., and Magee, R. J., *Appl. Organomet. Chem.*, 1993, **7**, 443.
- 5 Dauchy, X., Potin-Gautier, M., Astruc, A., and Astruc, M., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **348**, 792.
- 6 Gui-bin, J., Zhe-ming, N., Li, Z., Ang, L., Heng-bin, H., and Xiao-quan, S., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 447.
- 7 Johansson, K., Örnemark, U., and Olin, A., *Anal. Chim. Acta.* 1993, **274**, 129.
- 8 Laborda, F., Chakraborti, D., Mir, J. M., and Castillo, J. R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 643.
- 9 Kölbl, G., Kalcher, K., and Irgolic, K. J., *Anal. Chim. Acta.* 1993, **284**, 301.
- 10 Cobo-Fernández, M. G., Palacios, M. A., Chakraborti, D., Quevauviller, P., and Cámara, C., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1995, **351**, 438.
- 11 Martin, J. L., and Gerlach, M. L., *Anal. Biochem.*, 1969, **29**, 257.
- 12 Potin-Gautier, M., Boucharat, C., Astruc, A., and Astruc, M., *Appl. Organomet. Chem.*, 1993, **7**, 593.
- 13 Larsen, E. H., Pritzl, G., and Hansen, S. H., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 557.
- 14 Vela, N. P., and Caruso, J. A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 787.
- 15 Hill, S. J., Bloxham, M. J., and Worsfold, P. J., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 499.
- 16 Quijano, A., Gutiérrez, A. M., Pérez-Conde, C., and Cámara, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, **10**, 871.

Paper 5/04796J

Received July 21, 1995

Accepted February 16, 1996

Artículo 3

Evaluation of non-spectroscopic matrix interferent effect on selenium signal in inductively coupled plasma mass spectrometry by continuous nebulization and flow injection

M. Angeles Quijano, M. Concepción Pérez-Conde, Ana María Gutiérrez* and Carmen Cámara

Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universidad Complutense. 28040 Madrid, España.

Received July, 23th, 1997 / Accepted September, 1th, 1997

Summary. The interferent effect of easily (Na, K and Ba) and less easily (Ca, Al, Cr and Mg) ionizable elements on the selenium signal in an inductively coupled plasma mass spectrometer using continuous sample introduction (CN) and flow injection (FI) methods is evaluated. Sample introduction by flow injection shows promise as way of overcoming or reducing matrix induced interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry, and the dispersion of the FI system is an important parameter to study. The effect of varying experimental conditions, such as nebuliser gas flow rate and rf forward power, was studied and found to result in both suppression and enhancement effects, depending on the matrix element studied. The magnitude strength of the interference is dependent on mass in the order Ba>Cr>Ca≥K>Al>Mg≥Na for both the CN and the FI method.

Keywords: Inductively coupled plasma mass spectrometry, non-spectroscopic interferences, continuous nebulization, flow injection selenium.

Introduction

Interference by molecular ions originated in the plasma from atmospheric gases, water, acids, and analyte oxide species was documented in early studies; later, an extensive listing of common oxide, hydroxide, and doubly charged analyte species was published [1]. The presence of nonspectral interferent effects resulting from the introduction of concomitant elements is also discussed. The literature is contradictory, although signal enhancement, suppression and no effects have been observed, with suppression effects being by far the most common [2,3]. Gray and Date [4] found that the continuous sampler tolerated up to 1000 mg L⁻¹ sodium concentrations with only a 10% decrease in the signal from 10 mg L⁻¹ bismuth and cobalt solutions. Douglas et al. [5] also found no interference from phosphate or aluminium concentrations up to 1000 mg L⁻¹ in 2 mg L⁻¹ calcium solutions. Tan and Horlick [6] studied the effects of the matrix elements Na, Zn, Cs, K, Rh, In, Cd, Sn and Sb on the analytical signals for a range of analytes with different masses and first ionization potentials. They observed suppression of analyte signal at low nebuliser gas flow rates, but enhancements were noted at higher flow rates. In similar studies Gregoire

* Author to whom correspondence is to be sent

[7] observed only suppression while Beauchemin et al. [3] observed enhancements on the analytical signals for several analytes by Na, K, Cs, Mg and Ca, suppression by B, Al and V, and no effect for Li.

The influence of the matrix on sample transport and ionization has been well characterized for inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES); however, suppression or enhancement effects caused by highly concentrated matrices tended to be more severe in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), probably owing to the predominant influence of ion extraction and focusing on the mass spectrometer. Differences between instrumental configurations and operating conditions might be the cause of the different trends observed by workers [8,9]. It has been observed in ICP-AES studies that interference effects tend to decrease with increasing power and also with decreasing observation height and carrier gas flow. Gregoire [8] studied the effect of experimental conditions on nonspectroscopic interferences in ICP-MS, and showed opposing trends for power and sampling depth and element-specific trends for nebuliser pressure. He concluded that there are significant differences in the mechanism that causes ion suppression in ICP-MS and ICP-AES. Also, different mechanisms can dominate in different regions of the plasma, and thus different matrix effects (enhancements or suppressions) can be observed for the same solution nebulized under slightly different plasma conditions. This may explain the rather conflicting data on nonspectroscopic interferences that have appeared in the literature. He suggested that the two key operating parameters were the nebuliser pressure and the rf forward power.

Several important points have been identified from the conflicting information [2]: (a) heavy matrix elements with low ionization potentials cause the most severe effect, (b) light analyte elements with high ionization potentials are most severely affected, (c) plasma operating conditions have a great influence on the magnitude of these effects, and (d) the matrix effect is dependent on the absolute amount of matrix element in the plasma.

Flow injection is a powerful approach for introducing samples with a high dissolved salt content into the ICP-MS. Continuous aspiration of such a sample would of course result in highly unstable and rapidly deteriorating performance of the instrument. By FI sample introduction, the instrument is exposed to a low amount of sample solution, which is able to guarantee stable ICP-MS performance and low detection limits. The use of FI-ICP-MS as a means of direct sample introduction for

solutions of high total dissolved solid (TDS) content has been reported in several papers [9-12].

Selenium is an essential element in many species, but there is a narrow range of Se intake that is consistent with health, and doses outside this range result in deficiency diseases and toxicity. Selenium has a high ionization potential (9.752 eV) close to the Ar ionization potential (15.759 eV), and consequently its degree of ionization is about 30% [13,14], while that of most elements exceeds 90%. The use of high salt and acid concentrations in chromatographic methodologies for which ICP-MS may serve as detector, prompted us to investigate the effect of high salt loading on the observed analytical signal.

The aim of the present work is to evaluate the effect of certain matrix elements on the selenium signal, to determine the importance of the plasma operating conditions and to evaluate the possible corrector effect of the flow injection technique. On the basis of the experimental results, we show the correlation between the data obtained and the theoretic mechanisms existent.

Experimental

Instrumentation

The ICP-MS instrument used was an Eclipse (Fisons Instruments, Uxbridge, Middlesex, UK). The Eclipse was first optimized for nebuliser gas flow rate, ion lens voltages, quadrupole resolution and pole bias, using a standard solution containing elements across the mass range from beryllium to uranium at concentrations of $10 \mu\text{g L}^{-1}$. The optimization was also checked using a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ selenium standard solution, in order to improve further optimization.

In the flow injection system used, the sample was injected into the continuous flow of the carrier solution through a six-way valve (Omnifit), fitted with a $100 \mu\text{L}$ loop. The carrier solution was pumped with a Gilson HP-4 peristaltic pump.

The dispersion (D), for the FI system, was calculated as the ratio between the steady-state selenium signal obtained by CN and the maximum peak height of the FI signal [10]. With the FI system used in this study, a dispersion of 2 was obtained for 50 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Se solutions containing no matrix interferent. This value was obtained with a 40 cm length of tubing (0.5 mm i.d.) between the injection valve and the nebuliser. Different dispersions of the FI system were obtained by changing the length of tubing (0.5 mm i.d.) from 40 cm to 100 and 250 cm, resulting in dispersions of 16.4 and 28, respectively.

The operating conditions used are summarized in Table 1.

Reagents and Standard

- Selenium stock standard solution (1000 mg L^{-1}) was prepared from sodium selenite (Se^{IV}) purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

Table 1. Instrumental operating parameters.

Forward power	1350 W
Reflected power	5.8 W
Coolant flow rate	14.0 L min ⁻¹
Auxiliary flow rate	0.9 L min ⁻¹
Nebuliser pressure	30.1 Psi
Torch position relative to the load coil	4 mm
Sampler cone orifice	1 mm
Skimmer cone orifice	0.7 mm
Nebuliser type	Meinhard concentric glass
Nebuliser liquid uptake	1.0 mL min ⁻¹
Spray chamber temperature	8 °C
Flow rate FI system	1.0 mL min ⁻¹
Injected volume	100 µL

- Working selenium standards (50 and 100 µg L⁻¹) were obtained by dilution of the stock solution with de-ionized Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Solutions containing the matrix element were prepared by dissolving salts of ions (nitrates or ammonium salts) (Merck) at concentrations of 1x10⁴ mg L⁻¹ except barium nitrate solution, which was prepared at a concentration of 2x10⁴ mg L⁻¹.
- Solutions of appropriate working concentrations of the salts were prepared by diluting the stock solutions and then spiking with selenium stock standard so as to contain a final Se concentration of 50 µg L⁻¹ or 100 µg L⁻¹. The selenium standard in distilled water was prepared at the same concentrations.

Procedure

The interferent effects on the selenium signal were compared for two sample introduction methods: continuous nebulization and flow injection.

The selenium ion signal in each sample solution was determined by monitoring of ⁷⁷Se, ⁷⁸Se and ⁸²Se. For each individual m/z ion monitoring, in the time mode, for the two sample introduction methods, a dwell time of 600 ms and 999 points per peak was used. The reported values are the average of five measurements for each isotope.

To confirm that the matrix effect is dependent on the absolute amount of matrix element in the plasma, the study was carried out for two selenium concentrations (50 and 100 µg L⁻¹).

The matrix effect, expressed as "Relative Signal (%)", was calculated as the ratio of the selenium signal in the presence of the matrix to that in the absence of matrix, and expressed as a percentage.

Continuous Nebulization (CN) procedure

Solutions containing each concomitant element and analyte were nebulized for at least 10 minutes until attaining a stable signal in time. These analytical signals were continuously compared with that of the analyte alone, in order to account for instrumental drift. In addition, a blank solution of HNO₃ 2%(v/v) was introduced to ensure that there was no memory effects.

The maximum concomitant element concentration evaluated in CN was chosen to ensure that the TDS content was lower than 2% (w/v).

Flow Injection (FI) procedure

The solutions were injected in the FI system, with continual measurement of analyte signal in the presence and absence of concomitant elements. These injections were spaced at least 60 seconds to give the signal time to return to the baseline. The transient signals were measured in terms of peak area.

The experimental procedure adopted effectively eliminated any bias in the results due to nebuliser and cone blockage.

Results and Discussion

Preliminary study of selenium isotopes

It is well established that selenium determination by ICP-MS is impaired by two factors: the low degree of ionization, about 30% [13,14], and the peaks of the most relevant selenium isotopes overlap those of polyatomic ions derived from argon. The most abundant Se isotope with m/z = 80 (isotopic abundance = 49.82%) suffers severe interference from the dimer of argon (⁸⁰Ar₂⁺) [15,16], making it necessary to use a less abundant isotope. The next isotope in abundance, with m/z = 78 (isotopic abundance = 23.52%), is rejected by most of researchers because of the interference from another dimer of argon (⁴⁰Ar³⁸Ar), and the most widely used isotope is ⁸²Se (isotopic abundance = 9.19%), with the consequent loss of sensitivity.

In previous works [17,18] we used the ⁷⁸Se isotope, but in this study we have used the three Se isotopes. We evaluated the signal-to-noise ratio for the three most commonly used selenium isotopes as a function of nebuliser pressure at a forward power of 1350 W. Figure 1 shows that the best signal-to-noise ratio is obtained at an aerosol flow-rate of 0.98 L min⁻¹ (30.1 Psi) for the three selenium isotopes, which was used in

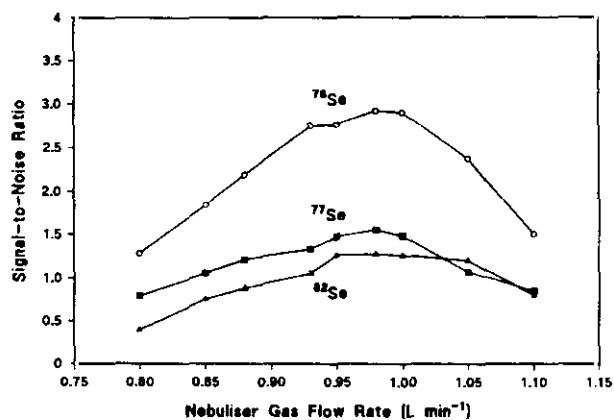


Figure 1. Variation in signal-to-noise ratio for 50 µg L⁻¹ selenium with nebulization pressure.

further experiments. The ^{78}Se isotope shows the best ratio values in all cases, due to the low isotopic abundance of ^{38}Ar (about 0.06%), which gives rise to a very slight increase in background.

Election of concomitants

In this interferent study on selenium, we monitored the three isotopes mentioned above, and there were no significant differences at the 95% confidence level between

their Relative Signals (%). This shows that the concomitant elements studied do not produce spectral interferences. The average results represented for the three isotopes in all interference studies are included.

We previously evaluated the effect of nitrate on the selenium signal, by addition of ammonium nitrate salt to the standard aqueous sample. As chloride produces spectral interference with ^{77}Se , we never used any salt containing this anion for the interference study. As shown in Table 2, the presence of NO_3^- or NH_4^+ had no

Table 2.- Interferent effect of several ions on selenium signal ($50 \mu\text{g L}^{-1} \text{Se}$). Results expressed in Relative Signal (%).

ION	(SALT)	1er I.P(eV)	%TDS(w/v)	mg L ⁻¹	C.N. (% R.S.)	FI (% R.S.)
NH_4^+	(NH_4NO_3)		0.38	2500	98 ± 2	100 ± 3
			0.76	5000	—	97 ± 3
NO_3^-	(NH_4NO_3)		0.71	2500	101 ± 3	100 ± 2
			1.43	5000	—	98 ± 3
SO_4^{2-}	$((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$		0.34	2500	100 ± 1	100 ± 2
			0.69	5000	—	99 ± 2
PO_4^{3-}	$((\text{NH}_4)_3\text{PO}_4)$		0.36	2500	99 ± 2	102 ± 3
			0.72	5000	—	100 ± 4
Na^+	(NaNO_3)	5.16	0.09	250	101 ± 1	99 ± 3
			0.18	500	82 ± 5	98 ± 3
			0.37	1000	63 ± 3	70 ± 4
			0.92	2500	41 ± 5	58 ± 6
			1.85	5000	—	37 ± 5
Mg^{2+}	$(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2)$	7.63	0.15	250	100 ± 2	98 ± 3
			0.30	500	87 ± 3	98 ± 2
			0.61	1000	70 ± 5	77 ± 2
			1.52	2500	47 ± 4	58 ± 3
			3.05	5000	—	35 ± 4
K^+	(KNO_3)	4.33	0.06	250	98 ± 3	97 ± 3
			0.13	500	77 ± 4	98 ± 3
			0.26	1000	67 ± 3	75 ± 4
			0.56	2500	38 ± 4	59 ± 5
			1.30	5000	—	33 ± 4
Ca^{2+}	$(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$	6.11	0.10	250	102 ± 3	97 ± 3
			0.20	500	75 ± 4	99 ± 2
			0.41	1000	60 ± 3	78 ± 3
			1.02	2500	29 ± 4	50 ± 4
			2.05	5000	—	27 ± 5
Al^{3+}	$(\text{Al}(\text{NO}_3)_3)$	5.98	0.19	250	99 ± 3	98 ± 3
			0.39	500	72 ± 3	100 ± 2
			0.79	1000	59 ± 4	75 ± 4
			1.97	2500	32 ± 3	58 ± 4
			3.95	5000	—	33 ± 4
Cr^{3+}	$(\text{Cr}(\text{NO}_3)_3)$	6.76	0.11	250	99 ± 3	98 ± 2
			0.22	500	89 ± 2	100 ± 2
			0.45	1000	57 ± 4	73 ± 3
			0.91	2000	36 ± 4	47 ± 3
			1.83	4000	17 ± 3	27 ± 4
Ba^{2+}	$(\text{Ba}(\text{NO}_3)_2)$	5.20	3.66	8000	—	14 ± 4
			0.02	50	99 ± 2	100 ± 3
			0.04	250	61 ± 3	98 ± 2
			0.09	500	27 ± 3	79 ± 3
			0.19	1000	5 ± 3	55 ± 4
			0.47	2500	—	49 ± 3
			0.95	5000	—	37 ± 4
1.90	10000	—	31 ± 3			
			2.85	15000	—	26 ± 3

effect on the relative signal for Se until the maximum concentration level tested (2500 mg L⁻¹ in CN and 5000 mg L⁻¹ in FI). Thus, we chose nitrate salts or ammonium salts for further evaluation of cation and anion interferences.

Easily ionizable elements such as Na, K and Ba (first ionization potential < 5.2 eV) and elements with greater ionization potential such as Al, Cr, Ca and Mg (5.2 < 1st I.P. < 7.8 eV) were chosen for this interference study. These analytes cover a wide mass range from m/z = 20 to 140 to evaluate the possible "mass dependent effect", as it was labelled by several investigators of non-spectral interferences [8-10]. The effect of concomitants was evaluated by using both CN and FI modes.

Interference effect using continuous nebulization mode (CN)

Although the effect of easily ionizable elements on the ability of the plasma to efficiently ionize elements has been studied previously [19], there is no agreement about their influence. In the present work we observed only a depression of the Se analytical signal when the cations mentioned above were added under optimum instrumental conditions.

In continuous nebulization mode, the depressor effect on the selenium signal appears at a concentration of 500 mg L⁻¹ for Na, K, Ca, Mg, Al and Cr, while 250 mg L⁻¹ of Ba suffices to produce an equivalent attenuation of the signal.

Figure 2 shows the effect of the elements with the lowest ionization potentials (I.P. < 5.2 eV) on the selenium signal and Figure 3 presents the effect of elements with I.P. from 5.2 to 7.8 eV. In these figures the lines "I" and "II" are referred to the CN sample introduction mode for selenium concentrations of 50 and 100 µg L⁻¹ respectively. It can be seen from these figures that the behaviour at the two Se concentration levels is fairly similar, which is in good agreement with the results obtained by other researchers [2] who reported that the strength of the matrix effect depends on the absolute amount of matrix element present, and not on the relative amount of matrix element to analyte.

From the results plotted in Figures 2 and 3, it can be observed that Ba (Fig. 2) causes the greatest depressor effect on the analyte signal, while Mg (Figure 3) and Na (Figure 2) have the weakest interferent effects. Table 2 shows the strength of the interferent effect on the Se signal at each concomitant element concentration.

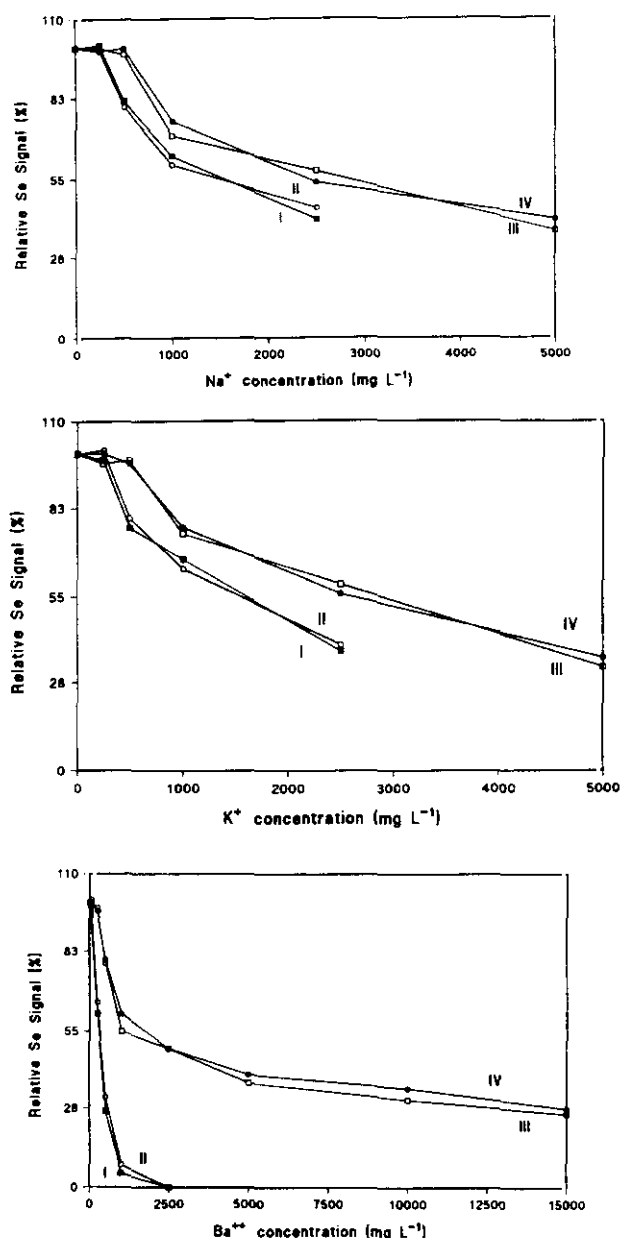


Figure 2. Matrix effect on Se signal produced by elements with I.P. < 5.2 eV. (Na; K; Ba), using the CN (I: 50 and II: 100 µg L⁻¹ Se) and FI (III: 50 µg L⁻¹ and IV: 100 µg L⁻¹ Se) sample introduction methods.

In order to clarify the influence of the matrix element's mass on the selenium signal, we plotted the results obtained against the molar concentration of the interferent elements added (Figure 4a) for the CN method. The resulting relative signals are the average of the results obtained for the three selenium isotopes at the two selenium concentrations mentioned above. In agreement with several workers reports [8-10], Figure 4a shows that the strength of the interference depends on the interferent's mass, in the following order: Ba>Cr>Ca>K>Al>Mg>Na.

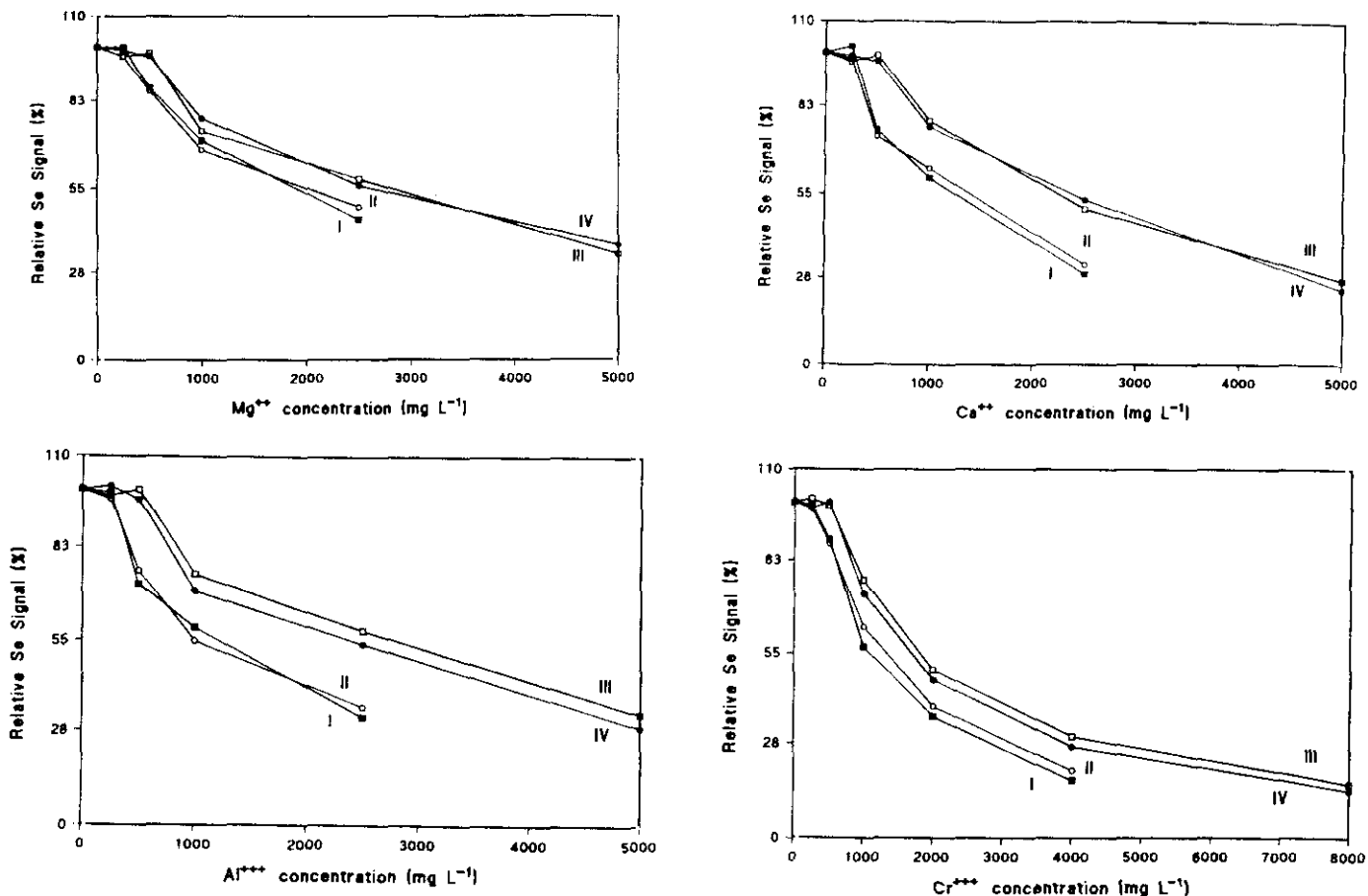


Figure 3. Matrix effect on Se signal of elements with $5.2 < P < 7.8$ eV. (Mg; Ca; Al; Cr). using the CN (I: $50 \mu\text{g L}^{-1}$ and II: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Se) and FI (III: $50 \mu\text{g L}^{-1}$ and IV: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Se) sample introduction methods.

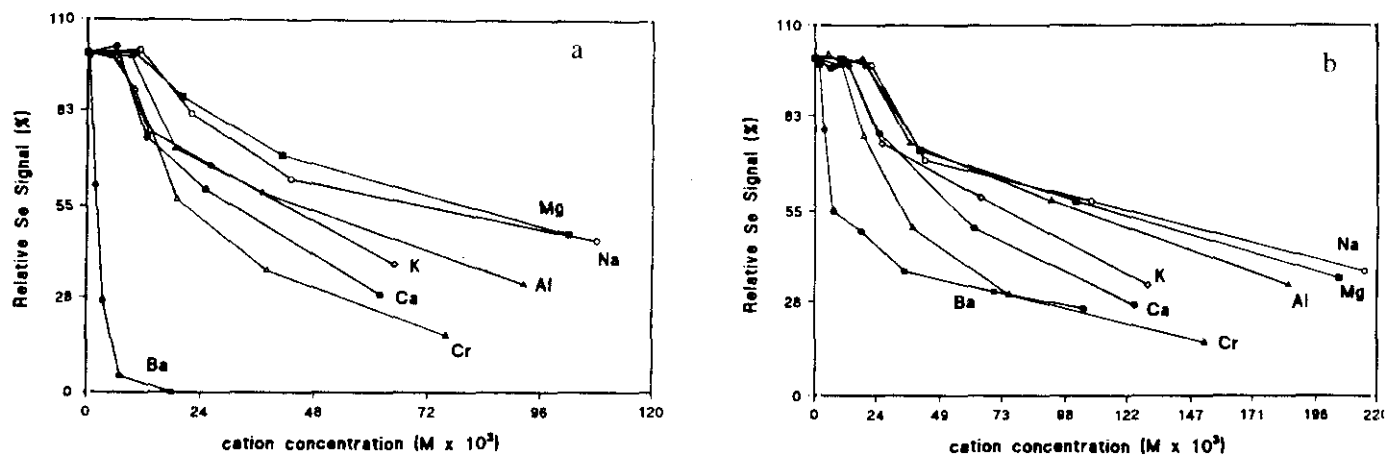


Figure 4. Relative signal for $50 \mu\text{g L}^{-1}$ selenium with molar concentration of interferent cations using a: CN and b: FI sample introduction method.

The results given in Table 2 show that the strength of interference does not depend on ionization potential, and furthermore that matrix elements with different ionization potentials but similar masses cause similar interferent effects.

We also evaluated the effect of anions other than NO_3^- , and observed that the presence of SO_4^{2-} or PO_4^{3-} at the highest concentration level tested (2500 mg L^{-1} for CN and 5000 mg L^{-1} for FI) does not produce any interference (see Table 2).

Interference effect using the flow injection mode (FI)

Several methods have been proposed to reduce non-spectroscopic interferences in ICP-MS [2,20]. Included among them is FI, which is a versatile sampling tool able to reduce matrix-induced interferences and has the added advantage that much less sample than in continuous nebulization is introduced in the system, so the sampling orifice is less likely to clog. For this reason we extended the range of interferent concentrations with respect to that used in the CN method.

Lines "III" and "IV" in Figures 2 and 3 show the effect of the elements evaluated for the FI sample introduction method at the 50 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ selenium concentrations, respectively.

In the flow injection mode, the depressor effect on the selenium signal appears at a concentration of 1000 mg L^{-1} for Na, K, Ca, Mg, Al and Cr and at a concentration of 500 mg L^{-1} for Ba. Barium (Figure 2) and Magnesium (Figure 3) cause the greatest and the weakest depressor effect on the selenium signal respectively, as in the CN method, with a reduction in the interference level.

As in the CN studies, there were no significant differences between the effects of the two Se concentrations tested.

Figure 4b plots the selenium relative signals against the molar concentration of the interferent elements added for the FI method. The results are similar to those obtained in the CN method with the consequent reduction in the interferences, thus demonstrating the same mass dependence.

The FI curves clearly show a significant reduction in interference level for all elements tested. Some authors [2,10] proposed a correlation between dispersion of the sample in the FI system and sample dilution. The effect of FI system dispersion on the 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ selenium signal was studied in the presence of 2500 mg L^{-1} of Mg, Ca and Cr and the results are shown in Table 3. When the dispersion is increased, the effect of each interferent element gradually diminishes. This fact presents a correlation with the measurement in the CN method when the samples were diluted by factors of 16 and 28.

Table 3.- Study of the effect of FI system dispersion on selenium signal (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se) in the presence of 2500 mg L^{-1} Mg, Ca and Cr. Results expressed in Relative Signal (%).

ION	D=1.5	D=16.4	D=28.0
Mg ²⁺	57 ± 3	80 ± 4	109 ± 3
Ca ²⁺	52 ± 3	104 ± 3	110 ± 4
Cr ³⁺	45 ± 3	85 ± 4	107 ± 4

However, in spite of this correlation between the increase of the dispersion of the FI system and the dilution of the sample, it is important to emphasize the advantages of the flow injection. First, because less manipulation of the sample is required, and second because in the FI method less amount of sample against the continuous nebulization is introduced, which guarantees stable performance of the instrument for a long time.

The results reported show that it is possible to eliminate or correct the matrix interferent effects by increasing the FI system dispersion, with the consequent sacrifice of sensitivity.

Influence of Instrumental Parameters on Matrix Interferences

Some workers have shown the extent to which the plasma operating parameters affect the analyte signals [8,9]. Nebuliser gas flow rate and the rf forward are the two most important parameters. The elements chosen for these studies were Mg, Ba and Cr (1000 mg L^{-1}), which have different ionization potentials and mass. The other parameters were held constant in each study.

Nebuliser gas flow-rate

Figure 5 shows the influence of nebuliser gas flow rate on selenium counts in the absence and presence of interferent elements. Varying this parameter produces different effects ranging from suppression to enhancement of the analytical signal, the changes being dependent on the element evaluated.

Magnesium causes a 30-40% reduction at flow rates of 0.87 to 0.98 L min^{-1} . However, a substantial enhancement of the selenium signal is achieved at

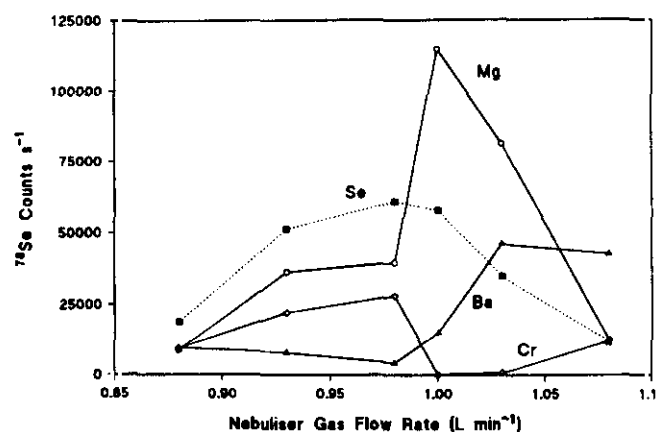


Figure 5. Effect of nebuliser gas flow rate on 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ selenium signal in the absence and presence of 1000 mg L^{-1} Mg, Ba or Cr.

higher flow rates, being maximum at 1.03 L min^{-1} . Although at 1.08 L min^{-1} the interferent effect seems to be eliminated, unfortunately at this flow rate there is a substantial loss of sensitivity. Barium has the greatest depressor effect on the selenium signal at flow rates below 1.00 L min^{-1} . The depressor effect gives way to enhancement at high flow rates. In the case of Cr, the flow rate influence is practically the opposite to the effect produced by Ba; furthermore, enhancement effects were not noted at any flow rate tested.

rf forward power

The influence of rf power on the selenium counts exhibits a similar pattern when the analyte is measured in the presence of Mg or Cr, while in presence of Ba the behavior is significantly different (Figure 6). Magnesium or Chromium originates a depressor effect on the Se signal in the rf power range tested. The maximum analyte signal was noted at 1350 W rf power, but in the presence of Ba the analyte signal was practically suppressed at this rf power value, with enhancement occurring at rf powers below 1150 W.

The interferent effects varied depending on the experimental conditions used. In some cases there was a change from suppression to enhancement of the signal. This could explain the conflicting data that appears in the literature. There are no experimental conditions that can be recommended to avoid the matrix interferences, because the changes varied depending on the concomitants studied. Thus, it is necessary to work at optimum analyte operating conditions. It is probable that there are several different mechanisms, each of which dominates under different experimental condi-

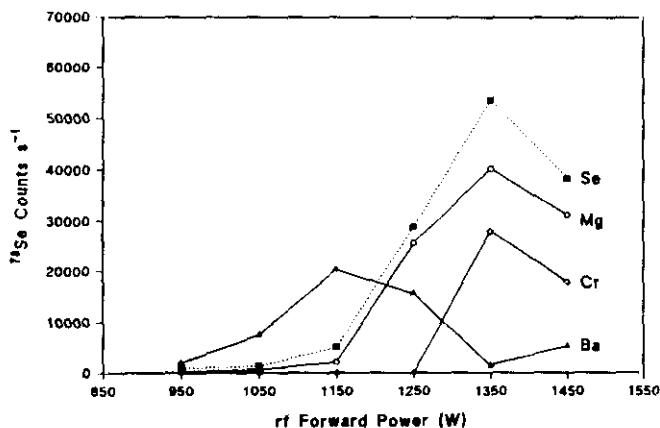


Figure 6. Effect of rf forward power on $25 \mu\text{g L}^{-1}$ selenium signal in the absence and presence of 1000 mg L^{-1} Mg, Ba or Cr.

tions, so any study must be carried out under carefully controlled operating conditions.

Agreement with the proposed mechanisms

Several theories have been proposed to explain the influence of matrix elements on the analytical signal in ICP-MS [2]. The most common theories include: the total contribution to the electron densities in the plasma by ionization of the elements from the salt [19,21]; changing aerosol transport efficiency at high total dissolved solid content [1,19], and space charge effects within the skimmer [22].

From the results in Table 2, it can be seen that there is no agreement between the interferent effect and the ionization potentials of the concomitants studied. The elements Na and Mg, which have very different ionization potential values, produce similar interferent effects. Therefore, we conclude that the ionization of these elements does not contribute to the electron density in the plasma. This agrees with the theoretical calculations reported by Gillson et al. [22], which suggest that the proportion of ions and electrons contributed by even a large amount of matrix is small compared with the vast excess contributed by Ar and nebulized water molecules in the plasma.

On the other hand, 1000 mg L^{-1} Ba causes the greatest interferent effect with a low total dissolved solid content (0.19%), while Al with a higher TDS content (1.97%) causes a lower interferent effect. For this reason, changes in the aerosol transport efficiency at high TDS content have no discernible influence.

In the present work, we noted a mass dependence effect (Figure 4) which agrees with the theory of space charge effects in the ion beam.

Conclusions

Our study found no significant differences between the interference effect at the two Se concentrations tested. The extent of the matrix effect depends on the absolute amount of matrix element present, not on the relative amount of matrix element to analyte.

In the continuous nebulization method, the depressor effect on the selenium signal appears at a concentration of 500 mg L^{-1} for Na, K, Ca, Mg, Al and Cr, while 250 mg L^{-1} of Ba suffices to produce signal attenuation.

The FI curves clearly show a significant reduction in the interference by all the elements studied. In the flow

injection method, the depressor effect on the selenium signal appears at a concentration of 1000 mg L⁻¹ for Na, K, Ca, Mg, Al and Cr and at a concentration of 500 mg L⁻¹ for Ba. When the FI system dispersion was increased, the effect of each interferent element gradually diminished. It was possible to correct the matrix interferent effects by increasing the FI system dispersion, but with the respective sacrifice in sensitivity.

The strength of the interferent effect depends on the mass of the interferent, the order being Ba>Cr>Ca≥K>Al>Mg≥Na for both the CN and FI methods.

The interferent effect depended on the concomitant's mass and no agreement was found with the its ionization energy or with the TDS content. Space charge effects on the ion beam may derive from this mass dependence of interference.

Changes in the experimental conditions, such as nebuliser gas flow rate and rf forward power, affect the interference and are highly dependent on the elements tested. We did not find experimental conditions that could be recommended to avoid the matrix interferences, it being preferable to work at optimum analyte operating conditions. Flow Injection proved to be a powerful technique to overcome matrix induced signal suppression in ICP-MS.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from CICYT under project PB 92-0218 and Max Gormann for revising the manuscript.

References

- [1]. Gray A. L., Jarvis K. E. and Houk R. S., Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Chapman and Hall, New York, pp. 124-149, **1991**.
- [2]. Evans E. H. and Giglio J.J., J. Anal. At. Spectrom., 8, 1, **1993**.
- [3]. Beauchemin D., McLaren J. W. and Berman S.S., Spectrochim. Acta, 42B, 467, **1987**.
- [4]. Gray A. L. and Date A. R., Analyst, 108, 1033, **1983**.
- [5]. Douglas D. J., Quan E. S. K., Smith R. G., Spectrochim. Acta, 38B, 39, **1983**.
- [6]. Tan S. H. and Horlick G., J. Anal. At. Spectrom., 2, 745, **1987**.
- [7]. Gregoire D. C., Spectrochim. Acta, 42B, 895, **1987**.
- [8]. Gregoire D. C., Appl. Spectrosc., 41, No 5, 897, **1987**.
- [9]. Wang J., Shen W-L., Sheppard B. S., Evans E. H. and Caruso J.A., J. Anal. At. Spectrom., 5, 445, **1990**.
- [10]. Vickers G. H., Ross B. S. and Hieftje G. M., Appl. Spectrosc., 43, No 8, 1330, **1989**.
- [11]. Klinkenberg H., Beeren T. and Vam Borm W., Spectrochim. Acta, 49B, 171, **1994**.
- [12]. Smichowski P., Madrid Y. and Cámara C., Quím. Anal., 14, 210, **1995**.
- [13]. Stroh A. and Völlkopf U., J. Anal. At. Spectrom., 8, 35, **1993**.
- [14]. Tao H., Lam J. W. H. and McLaren J. W., J. Anal. At. Spectrom., 8, 1067, **1993**.
- [15]. Pretty J. R., Blubaugh E. A. and Caruso J. A., Anal. Chem., 65, 3396, **1993**.
- [16]. Heitkemper D. T. and Caruso J. A., Appl. Spectrosc., 44, 228, **1990**.
- [17]. Quijano M. A., Gutiérrez A. M., Pérez-Conde M. C. and Cámara C., J. Anal. At. Spectrom., 10, 871, **1995**.
- [18]. Quijano M. A., Gutiérrez A. M., Pérez-Conde M. C. and Cámara C., J. Anal. At. Spectrom., 11, 407, **1996**.
- [19]. Holclajtner-Antunovic I. D. and Tripkovic M. R., J. Anal. At. Spectrom., 8, 359, **1993**.
- [20]. Dams R. F. J., Goossens J. and Moens L., Mikrochim. Acta, 119, 277, **1995**.
- [21]. Olivares J. A. and Houk R. S., Anal. Chem., 58, 20, **1986**.
- [22]. Gillson G. R., Douglas D. J., Fulford J. E., Halligan K. W. and Tanner S. D., Anal. Chem., 60, 1472, **1988**.

Artículo 4

**DETERMINATION OF SELENIUM SPECIES IN HUMAN URINE BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND INDUCTIVELY
COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY.**

**M. Angeles Quijano⁽¹⁾, Ana Maria Gutiérrez*, M. Concepción Pérez-Conde and
Carmen Cámara.**

Departamento de Química Analítica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense
de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

⁽¹⁾ Departamento de Ciencias Básicas, E.U.I.T. de Obras Públicas, Universidad
Politécnica de Madrid, 28014 Madrid, Spain.

Keywords: Inductively coupled plasma mass spectrometry; high performance liquid chromatography; selenium speciation; human urine.

Abstract

A method developed to determine organic and inorganic selenium species in human urine samples is presented in detail. After a simple sample treatment based on elimination of non-charged organic compounds, selenium species were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) on a Spherisorb 5 ODS/AMINO column using two different chromatographic conditions: phosphate buffers at pH 2.8 and pH 6.0. Detection was carried out using an on-line inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). Trimethylselenonium ion and two unknown selenium species in urine samples were found. Selenium species were shown to have stability problems, with the maximum allowed storage time of one week.

* Corresponding author. Phone 913944222, fax 913944329, e-mail carreras@eucmax.sim.ucm.es

1. Introduction

Selenium has been recognised as an essential trace element, based on its presence as a structural component of the enzyme glutathione peroxidase [1]. This element has a complex impact on man and animals depending on the concentration and the chemical form in which it is present [2]. However, the difference between the necessary daily intake and the toxic dose is narrow.

Selenium exists in many different chemical forms in the environment and in biota. The inorganic species selenite and selenate are very important in the biochemical cycle of selenium. Seleno-amino acids take part in the biological selenium cycle and are incorporated into proteins [1,2]: selenomethionine (SeMet) is used as selenium supplements for man and animals and has been found in plants, selenocysteine is part of the active site of the enzyme glutathione peroxidase. The trimethylselenonium ion (TMSe^+) is known to be a detoxified form of other more toxic selenium compounds [3,5]. The relationship between TMSe^+ and other selenium compounds, such as selenocysteine, is not yet clear, though excess amounts of selenomethionine and several other amino acid derivatives administered to rats were shown to be metabolised to trimethylselenonium [4].

Detailed information concerning analytical methods for speciation of selenium will be found in some reviews [5-8]. Unfortunately, applications of selenium speciation techniques to real samples is scarce.

Urinary selenium concentration is used as an indicator of selenium status. Some articles have been published reporting clinical studies of the total selenium concentrations in biological fluids [5,9]. In human urine, amounts between 20-200 $\mu\text{g}/\text{day}$ are considered as normal excretion, but knowledge of the total concentration

gives only poor information.

A few studies of analytical methods for determining selenium species in urine samples have been reported, most of them were performed on spiked urine samples [10-12]. A knowledge of the chemical form and concentration of selenium in urine is of interest; however, reports on the identification of Se species in urine are contradictory. TMSe^+ has been identified as an important selenium metabolite in urine, ranging from 10 to 70% of total selenium [2,16], while other studies detected a major inorganic contribution [13-15].

Blotcky et al. found that TMSe^+ made up about 30% of total selenium in urine for a normal diet, and that the excretion level increased when the diet was supplemented by selenium-containing vitamins [16]. TMSe^+ was determined using a polystyrene column packed with cation exchange resin and neutron activation detection.

Yang et al. determined TMSe^+ , selenite and selenate in urine samples by ion-pairing chromatography coupled to ICP-MS with ultrasonic nebulization [14]. They found a major selenite contribution (between 100 and 400 $\mu\text{g L}^{-1}$), while TMSe^+ was detected in a few samples at a level of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fodor and Barnes differentiated selenate and selenite in urine samples using different pH-values for complexation with a poly(dithiocarbamate) resin. Analysis of the urine of eleven healthy persons showed that the average selenite content (8.6 $\mu\text{g L}^{-1}$) was about three times higher than the selenate concentration (3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) [15].

Other peaks present in chromatograms of urine samples were considered to be possible seleno-amino acids. Muñoz Olivas et al differentiated selenocystine (SeCys), selenomethionine and trimethylselenonium ion by ion-pairing chromatography and ICP-MS detection [17]. They found a principal peak attributed to SeCys, without any presence of TMSe^+ . No quantification was possible due to the overlapping of peaks.

Sample complexity makes it necessary to deal with sample storage and stability problems. Some studies have been carried out on the stability of selenium species in aqueous solution [18,19]. The best storage conditions for organic selenium species in aqueous solution, were found to be Pyrex containers at 4 °C and 20 °C in the dark [19]. The authors observed excellent stability of TMSe^+ , SeCys and SeMet for three months under all conditions studied. Inorganic species in aqueous solution are stable for twelve months in polyethylene and PTFE containers at -20 °C, and in these conditions it is not necessary to acidify the samples [18]. In biological fluids, the sampling and storage conditions may differ due to the presence of the matrix. In contrast to most elements, selenium sampling and storage are essentially free from contamination problems, but selenium species stability is a problem to be considered. At ambient temperature, bacterial growth transforms urea into ammonia, causing an alkaline urine. pH changes can affect urine composition [20]. Alaejos et al. reported no losses of Se when urine samples are stored at 4 °C in polyethylene bottles for 12 hours [5], but the study determined total selenium without monitoring transformation of species.

The aim of this work is to present a sensitive method for determination of selenium species in human urine samples and to describe a sample treatment that obviates immediate analysis. The analytical developments presented complete the method proposed by us for the simultaneous separation of SeCys, SeMet, selenite and selenate by HPLC with ICP-MS detection [21]. For the application of this method to human urine samples, we included two more selenium species: TMSe^+ and selenoethionine (SeEt).

2. Experimental

2.1. Apparatus

The chromatographic system used consisted of a Milton Roy CM4000 HPLC pump with a Milton Roy six-port sample injection valve fitted with a 100 μL loop (Milton Roy LDC Division, Riviera Beach, Florida, U.S.A.). Separations were performed on a Spherisorb ODS (octadecyl silica)/AMINO 5- μm , 250 x 4.6 mm i.d. column (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.).

Detection was performed using an ICP-MS instrument, VG Instrument PQ3 (Thermo Instruments, Uxbridge, Middlesex, UK). The PQ3 was first optimised separately from the chromatographic system, for nebulizer gas flow rate, ion lens voltages, quadrupole resolution and pole bias, using a standard solution containing elements spanning the mass range from beryllium to uranium at concentrations of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. The optimisation was also performed using a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ standard selenium solution.

The chromatographic system was then coupled to the ICP-MS instrument by 20 cm of poly(tetrafluoroethylene) capillary tubing (0.5 mm i.d.) from the column outlet to the inlet of the standard Meinhard nebulizer.

During the HPLC-ICP-MS runs only $m/z=82$ was monitored. The conditions used are summarised in Table 1. Total selenium concentration was performed by flow injection, using the same system without an analytical column and employing 2% HNO_3 as carrier solution.

Bond Elut C_{18} cartridges (3.0 mL and 500 mg) from Varian (CA, USA) were used to remove the organic matrix from urine samples and Millipore 0.45- μm nylon filters (Bedford, MA, USA) to filter all HPLC solutions.

2.2. Reagents and Standards

Selenium stock standard solutions (10 mg L⁻¹ of Se) were prepared by dissolving the appropriate amount in ultra-pure Milli-Q water (Millipore). Inorganic selenium solutions were obtained by dissolving sodium selenate and sodium selenite (Merck, Darmstadt, Germany), selenocystine (SeCys), selenomethionine (SeMet) and selenoethionine (SeEt) purchased from Sigma Chemical, (St. Louis, MO, USA). Trimethylselenonium chloride was synthesised in our laboratory following the procedure of Palmer et al. [22]. Stock solutions were stored in the dark at 4 °C. Working standards were obtained daily.

The eluents used for separations were 3.5 and 7.0 mmol dm⁻³ phosphate buffer at pH=6.0 (both concentrations) and 5.0 mmol dm⁻³ phosphate buffer at pH=2.8. Solutions were prepared by mixing separately prepared solutions of Na₂HPO₄ and H₃PO₄ (Panreac, Barcelona, Spain) until the desired pH was reached.

Methanol, HPLC grade, was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

All solutions used were filtered through a 0.45-µm nylon filter and de-gassed before use.

2.3. Procedure

Separation and determination of selenium species in urine samples

Selenium species were separated by HPLC using two different sets of chromatographic conditions:

Chromatographic separation of organic selenium standard solutions (TMSe⁺, SeCys, SeMet and SeEt) was performed by injecting solutions containing the four compounds

onto the column and eluting with 5.0 mmol dm⁻³ phosphate buffer at pH=2.8, at flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

Chromatographic separation of organic and inorganic selenium standards solutions (TMSe⁺, SeCys, SeMet, SeEt, selenite and selenate) was carried out by elution with 3.5 mmol dm⁻³ phosphate buffer at pH=6.0. After 7 minutes, the eluent concentration was changed to 7.0 mmol dm⁻³ at pH=6.0, by applying a linear concentration gradient over a 1 minute period. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹.

Human urine samples (4 mL) were processed in a vacuum manifold system by passage through Bond-Elut C₁₈ cartridges previously conditioned with 5 mL of methanol followed by 5 mL of Milli-Q water. The cartridge was washed with 5 mL of 3.5 mmol dm⁻³ phosphate buffer at pH 6.0. The eluate was diluted to 10 mL with Milli-Q water, resulting in a 2/5 dilution of the sample.

Detection of the eluted selenium species was carried out by the ICP-MS using the operating conditions given in Table 1. The analytical peaks obtained were evaluated by peak area measurements.

Design of the stability study

The storage containers used for the stability test were 10 mL vials of polyethylene and Pyrex. Vials were previously washed and immersed in a 10% HNO₃ bath for 24 hours and rinsed with Milli-Q water several times before use.

Different aliquots of an urine sample were processed as it is above indicated. All of them were mixed and split into vials and maintained in the dark at -18 and 4 °C. Storage flasks were sealed with paraffin paper.

A total of ten vials was prepared for storage under each experimental condition. In order to determine the reference signal values (S_{Ref}), two different vials taken randomly from

each series were analysed immediately after sample preparation. Measurements for the stability study were made after 1, 7, 14 and 28 days.

3. Results and Discussion

3.1. Analytical Performance

In previous work, we evaluated chromatographic parameters such as mobile phase pH and concentration for SeCys, SeMet, selenite and selenate separation, and found that the best working conditions were achieved using a phosphate concentration gradient from 3.5 to 7.0 mmol dm⁻³ at pH 6.0 [21]. High resolution was obtained in organic selenium species separation at pH=2.8, but inorganic selenium species did not elute below pH 6. Selenium species separation over a pH gradient from 2.8 to 6.0 was not feasible, due to the long time required for the column equilibrium.

As there is considerable controversy over the selenium species present in urine samples, this study included two more selenium species in addition to the four above mentioned: SeEt and TMSe⁺. The latter necessarily had to be included because most authors agree that it is present in this kind of samples [2, 14, 16].

Table 2 lists the chromatographic parameters for the six selenium species mentioned above. The mobile phase pH exerts little influence on SeEt retention, as occurs with other amino acids (SeCys and SeMet). TMSe⁺ elutes in the dead volume at low pH, but its retention time increases when pH is increased, possibly due to interaction with deprotonated silanol groups (Si-O⁻) in the stationary phase. The capacity factor (k') for the two selenium species studied was independent of buffer concentration, and only inorganic selenium species were affected by this parameter [21].

The chromatogram of standard solutions at pH 2.8 is shown in Figure 1a. There is a good separation between organic selenium species. The chromatogram at pH 6.0 (Fig. 1b) shows that SeEt elutes between SeMet and selenite with a good resolution, but that TMSe^+ elutes close to SeCys. In conclusion, at pH=6.0 it is possible to obtain separation of selenium species, but in the presence of TMSe^+ it is necessary to carry out the separation of organic selenium species at pH=2.8. These results suggest that both chromatographic conditions (pH 6.0 and pH 2.8) will have to be used in the speciation of urine samples.

3.2. Urine Sample Analysis

3.2.1. Qualitative analysis

Urine samples can be analysed by simple dilution, generally 1/5, in distilled water and direct injection into the chromatographic column [14]. The proposed method was applied to urine samples collected from three healthy subjects, all having a normal diet. In all cases the chromatographic profiles were the same.

Urine chromatograms showed two peaks at pH=2.8 (Fig. 2a) and three peaks at pH=6.0 (Fig. 2b).

At pH=6.0, the first peak elutes at 2.9 minutes; at this pH TMSe^+ cannot be differentiated from SeCys. This peak was identified as TMSe^+ at pH=2.8 because of the increase in its area when standard TMSe^+ solutions were added, though it could be other cationic selenium species that also eluted in the dead volume. The absence of SeCys under this chromatographic condition was confirmed.

The second peak found in urine analysis eluted around 5.2 minutes at pH=2.8 and

around 5.7 minutes at pH 6.0, between SeMet and SeEt under both chromatographic pH conditions. This peak cannot be attributed to any selenium species studied, because as was proved by adding the other known selenium species. The retention time suggests that this selenium species could be a different seleno amino acid or a methylated form of selenomethionine. We will refer to this selenium species as U₁.

The third peak found in all urine samples only eluted at pH=6.0 as an inorganic selenium species, and the retention time of 10.5 minutes was similar to that of selenite elution; however, when selenite was added, it yielded a different retention time. We will refer to this selenium species as U₂. A better resolution between these two selenium species was achieved using a 3.5 mmol dm⁻³ mobile phase, without a concentration gradient, because selenite is retarded at this lower buffer concentration. U₂ eluted close to selenite, which could create confusion in its identification. The fact that this unknown selenium species only elutes at pH=6.0 suggests a strong negative charge on the molecule.

As there was no evidence of the presence of SeCys, which overlapped with TMSe⁺ at pH=6.0, and the unknown peaks (U₁ and U₂) did not overlap, the selenium species in these urine samples can be analysed in a single chromatographic run.

3.2.2. Sample treatment

Because of instability, the urine samples had to be stabilised to avoid the need for immediate analysis. Some authors have added compounds such as toluene, formaldehyde, hydrochloric acid, nitric acid and others to prevent bacterial growth and minimise selenium adsorption losses [5]. However, these additives can induce species transformation and create interferences in the instrumental detector used. Other authors

describe complex methods of sample treatment based on protein precipitation and selenium species preconcentration by evaporation to dryness and redissolution of the residue in a reduced volume [12].

To improve stability of urine samples, we attempted to remove the organic matrix using a simple treatment consisting of phase solid extraction with C_{18} cartridges.

In the working pH range (2.8-6.0), all the selenium species studied are charged. Inorganic selenium species are present as $HSeO_3^-$ and SeO_4^{2-} , trimethylselenonium is a cation and seleno amino acids (selenocystine, selenomethionine and selenoethionine) are present as zwitterions. As non-charged species are retained in C_{18} cartridges, selenium species will be eluted and separated from the retained organic matrix. However, it is possible that in the presence of urine matrix, some selenium species could form ion-pairs with a resulting change in their behaviour.

Recovery from the C_{18} cartridges was studied by addition of known amounts of selenium standards to the urine sample. Aliquots of human urine (8 mL) were spiked with 0.1 μg of each selenium standard, and half of each aliquot was diluted directly to 10 ml with Milli-Q water and the other half was processed through C_{18} cartridges. The study was extended to the unknown selenium species present in the sample (U_1 and U_2), by comparing the results obtained after clean-up step with those obtained after simple dilution.

Recoveries were evaluated as the ratio of the selenium signal for processed samples to that for unprocessed samples. C_{18} cartridges were washed with Milli-Q water (method 1) and with 3.5 mmol dm^{-3} mobile phase at $\text{pH}=6$ (method 2). Table 3 shows losses of about 30% for SeCys and SeEt using method 1, while method 2 provides good recoveries for all selenium species. Losses of seleno amino acids and unknown selenium species could be attributed to a partial retention on C_{18} stationary phase. An

increase of the eluent ionic strength produces an improvement of recoveries. Thus, we chose the method 2 for further experiments.

3.2.3. Stability study

Selenium species stability in urine was evaluated by measuring the analytical peaks of TMSe^+ , U_1 and U_2 . The addition of other selenium species, absent in the original sample, was avoided because it could cause chemical interaction with the selenium species present in urine.

Stability was calculated as the ratio between the mean signal obtained under the different storage conditions (S_x) and the mean value taken as reference (S_{Ref}), expressed as a percentage (%R). Results are shown in Figure 3.

Severe losses of U_1 species appears after only a week of storage in all cases, except in polyethylene vials maintained at 4 °C in which losses were detected after two weeks of storage. This species tends to be lost with time in all the storage conditions tested. TMSe^+ and U_2 seem to be more stable, but samples kept frozen at -18 °C in two storage materials underwent a gradual loss.

Losses observed upon samples storage cannot be attributed to species conversion, because there are no new peaks in the sample chromatograms. We did not observe the appearance of any precipitate in samples that could adsorb these compounds. Slightly better results were obtained in polyethylene than in Pyrex containers, possibly due to their better resistance to light and oxidising agents. The effect of temperature was similar for the two materials tested. Losses of TMSe^+ and U_2 species were more notable at -18 °C and, contrary to expectations, better results were obtained at 4 °C. The possible loss of selenium through volatilisation into DMSe is not ruled out, however, it would be

minimal at the storage temperatures used.

The results show that the best storage condition was in polyethylene vials at 4 °C. If held in these storage conditions and subjected to the sample treatment indicated, the selenium species present in urine samples remain stable for a week, avoiding the need for immediate analysis.

3.2.4. *Quantitative analysis*

Total selenium content in urine samples was determined by flow injection ICP-MS, using standard selenite solution. Previously we verified that there were no differences in the selenium signal produced by the six selenium species studied. No appreciable matrix effect was found at a sample dilution of 1/10, as evidenced by the similar slopes of the aqueous and standard addition flow injection calibrations (Table 4). The total selenium concentrations found in the three human urines analysed are shown in Table 5.

Table 4 shows the slopes obtained for the six selenium species in aqueous and standard addition HPLC calibrations. No significant differences were found at the 95% confidence level and, therefore, it was concluded that there is no matrix effect in species quantification at the 1/5 sample dilution used.

The concentrations of the two unknown selenium species (U_1 and U_2) were estimated as selenium analyte, by calibration against the nearest neighbouring peak of a known substance, which was SeMet for U_1 and selenite for U_2 . The concentrations of different species in three human urines are shown in Table 5.

There was an excellent recovery calculated by comparison of the sum of selenium species concentration and the total selenium found in urine. The recoveries were 95.0, 87.6 and 90.5% for urine A, B and C, respectively.

The analytical characteristics in urine matrix were evaluated for the six selenium compounds. The precision of the method was found to be better than 5%, and detection limits in urine matrix was 0.05 ng using a 100 μ L injection volume, slightly worse than for the aqueous standard (0.04 ng).

4. Conclusion

Three different human urines were analysed. Qualitative urine analysis showed the presence of TMSe^+ and two unknown selenium peaks denoted U_1 and U_2 , which were present in all urines. Based on its retention times and acidic nature, U_1 could be a seleno amino acid or a methylated form of selenium. U_2 does not elute at $\text{pH}=2.8$, possibly due to a strong negative charge. Research is now in progress to elucidate the structure of these two unknown species. No appreciable presence of selenite and selenate was found in any of the all urines analysed.

Simple sample treatment with Bond-Elut C_{18} cartridges removes organic matrix without loss of selenium species, there by improving storage characteristics.

The stability study focused on finding a storage method in order to avoid the immediate need for analysis. The possible seleno amino acid U_1 was more unstable than the others species present, and limited the storage time. The selenium species present in the urines studied were stable for one week in polyethylene vials maintained at 4 $^{\circ}\text{C}$.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from CICYT under project PB 95-0366-C01-C02 and the Measurements and Testing Programme (EC) and to Max Gormann for revising the manuscript.

References

- [1] Merian, E. (Ed.), Fishbein, L., *Metals and their Compounds in the Environment*. UHC Verlagsgesellschaft, Germany, 1991, pp.1153-1190.
- [2] Shibata, Y., Morita, M., and Fuwa, K., *Adv. Biophys.*, 28 (1992) 31.
- [3] Sanz Alaejos, M. and Díaz Romero, C., *Clin. Chem.*, 39/10 (1993) 2040.
- [4] Kraus, R. J., Foster, S. J. and Ganther, H. E., *Analytical Biochem.*, 147 (1985) 432.
- [5] Sanz Alaejos, M. and Díaz Romero, C., *Chem. Rev.*, 95 (1995) 227.
- [6] Muñoz Olivas, R., Donard, O. F. X., Cámara, C. and Quevauviller, P., *Anal. Chim. Acta*, 286 (1994) 357.
- [7] Kölbl, G., Kalcher, K., Irgolic, K. J., and Magee, R., J., *Appl. Organomet. Chem.*, 7 (1993) 443.
- [8] Dauchy, X., Potin-Gautier, M., Astruc, A., and Astruc, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 792.
- [9] Caroli, S., Alimonti, A., Coni, E., Petrucci, F., Senofonte, O. and Violante, N., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24(5 & 6) (1994) 363.
- [10] González LaFuente, J. M., Fernández Sánchez, M. L. and Sanz-Medel, A., *J. Anal. At. Spectrom.*, 11 (1996) 1163.
- [11] Marchante-Gayón, J. M., González, J. M., Fernández, M. L., Blanco, E. and Sanz-Medel, A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 355 (1996) 615.
- [12] Blais, J-S. Huyghues-Despointes, A., Momplaisir, G. M. and Marshall, W. D., *J. Anal. At. Spectrom.*, 6 (1991) 225.
- [13] Das, A. K., Chakraborty, R., Cervera, M. L. and de la Guardia, M., *Mikrochim. Acta*, 122 (1996) 209.
- [14] Yang, K-L. and Jiang, S-J., *Anal. Chim. Acta*, 307 (1995) 109.

- [15] Fodor, P. and Barnes, R.M., *Spectrochim. Acta*, 38B (1983) 229.
- [16] Blotcky, A. J., Hansen, G. T., Opelano-Buencamino, L. R. and Rack, E. P., *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1937.
- [17] Muñoz Olivas, R., Donard, O. F. X., Gilon, N. and Potin-Gautier, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 11 (1996) 1171.
- [18] Cobo, M.G., Palacios, M.A., Cámara, C., Reis, F. and Quevauviller, Ph., *Anal. Chim. Acta*, 286 (1994) 371.
- [19] Muñoz Olivas, R., Quevauviller, Ph. and Donard, O.F.X., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 512.
- [20] Miles (Ed.), Ames, D., *Urianálisis Moderno*. Martin Lab., S.A.E. Barcelona, Spain, 1987, pp. 12-15.
- [21] Quijano, A., Gutiérrez, A. M., Pérez-Conde, C. and Cámara, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, 11 (1996) 407.
- [22] Palmer, I.S., Fisher, D.D., Halverson, A.W. and Olson, O.E., *Biochem. Biophys. Acta*, 117 (1969) 336.

Fig. 1. HPLC-ICP-MS chromatogram of a standard mixture of (1) TMSe^+ ; (2) SeCys; (3) SeMet; (4) SeEt; (5) Se(IV) and (6) Se(VI). ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ of selenium each). Mobile phase: **a)** Phosphate buffer 5.0 mmol dm^{-3} at $\text{pH}=2.8$ **b)** phosphate buffers 3.5 and 7.0 mmol dm^{-3} at $\text{pH}=6.0$.

Fig. 2. HPLC-ICP-MS chromatogram of urine_A (1) TMSe^+ ; (2) U_1 ; (3) U_2 . Mobile phase: **a)** Phosphate buffer 5.0 mmol dm^{-3} at $\text{pH}=2.8$ **b)** phosphate buffers 3.5 and 7.0 mmol dm^{-3} at $\text{pH}=6.0$.

Fig. 3. Stability of seleno compounds present in urines stored in two kinds of container at two different temperatures. **a)** Pyrex at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, **b)** Pyrex at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, **c)** Polyethylene at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, and **d)** Polyethylene at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Table 1

Operating conditions of the chromatographic and ICP-MS system.

<i>Chromatographic system:</i>	
HPLC column	Spherisorb ODS/AMINO (250 x 4.6 mm i.d.), 5 μm
Mobile phases	Phosphate buffers: 5 mmol dm^{-3} at pH=2.8 3.5 and 7.0 mmol dm^{-3} at pH=6.0
Flow rate	1.0 mL min^{-1}
Sample injection volume	100 μL
(*) Dead volume	2.02 \pm 0.01 mL
<i>ICP-MS:</i>	
Forward power	1350 W
Reflected power	0.5 W
Coolant gas flow rate	14 L min^{-1}
Auxiliary gas flow rate	0.8 L min^{-1}
Nebulizer gas flow rate	0.9 L min^{-1}
Data collection mode	Single ion monitoring
Integration time	2.0 s

(*) Measured with 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Lithium (LiNO_3) at $m/z=7$

Table 2

Chromatographic parameters for aqueous selenium species. k' is the capacity factor.

	TMSe ⁺	SeCys	SeMet	SeEt	Se(IV)	Se(VI)
k' at pH=2.8	0.14	0.58	1.16	2.35	-	-
Resolution	1.02	1.19	2.30			
k' at pH=6.0	0.27	0.89	1.47	3.17	5.64	14.8
Resolution	0.70	0.76	1.65	1.68	5.66	

Table 3.

Recovery study on spiked urine samples processed by passage through C₁₈ cartridges. Cartridges were washed with Milli-Q water (method 1) and 3.5 mmol dm⁻³ mobile phase at pH=6.0 (method 2). Results are the mean of three separate experiments.

Species	Method 1	Method 2
TMSe ⁺	97 ± 4%	101 ± 3 %
SeCys	73 ± 8%	94 ± 4 %
SeMet	89 ± 7%	98 ± 3 %
SeEt	71 ± 5%	95 ± 5 %
Selenite	102 ± 4%	99 ± 4 %
Selenate	96 ± 5%	98 ± 3 %
U ₁	85 ± 5%	97 ± 6 %
U ₂	90 ± 4%	102 ± 5 %

Table 4.

Calibration slopes ($\pm S_{y/x}$) for total selenium (1/10 dilution) and selenium species (1/5 dilution) in aqueous and standard additions calibration.

	Aqueous calibration	Standard additions calibration
Total Se	6898 \pm 507 (r=0.9998)	6743 \pm 1281 (r=0.9992)
TMSe ⁺	6734 \pm 715 (r=0.9997)	6509 \pm 1033 (r=0.9993)
SeCys	6505 \pm 481 (r=0.9998)	6366 \pm 670 (r=0.9997)
SeMet	6179 \pm 461 (r=0.9998)	6102 \pm 854 (r=0.9995)
SeEt	5987 \pm 612 (r=0.9997)	6058 \pm 1303 (r=0.9987)
Se(IV)	6035 \pm 839 (r=0.9996)	5940 \pm 1243 (r=0.9988)
Se(VI)	6615 \pm 496 (r=0.9998)	6302 \pm 998 (r=0.9993)

r is the correlation coefficient of regression.

Table 5.

Quantitative results for selenium species in human urine expressed as $\mu\text{g L}^{-1}$ of selenium (mean \pm s, n=3).

	TMSe ⁺	U ₁	U ₂	Total Se
Urine _A	17.8 \pm 0.6	7.7 \pm 0.3	17.5 \pm 0.6	45 \pm 1
Urine _B	14.3 \pm 0.5	14.9 \pm 0.6	16.9 \pm 0.6	53 \pm 2
Urine _C	19.8 \pm 0.7	8.5 \pm 0.3	6.1 \pm 0.2	38 \pm 1

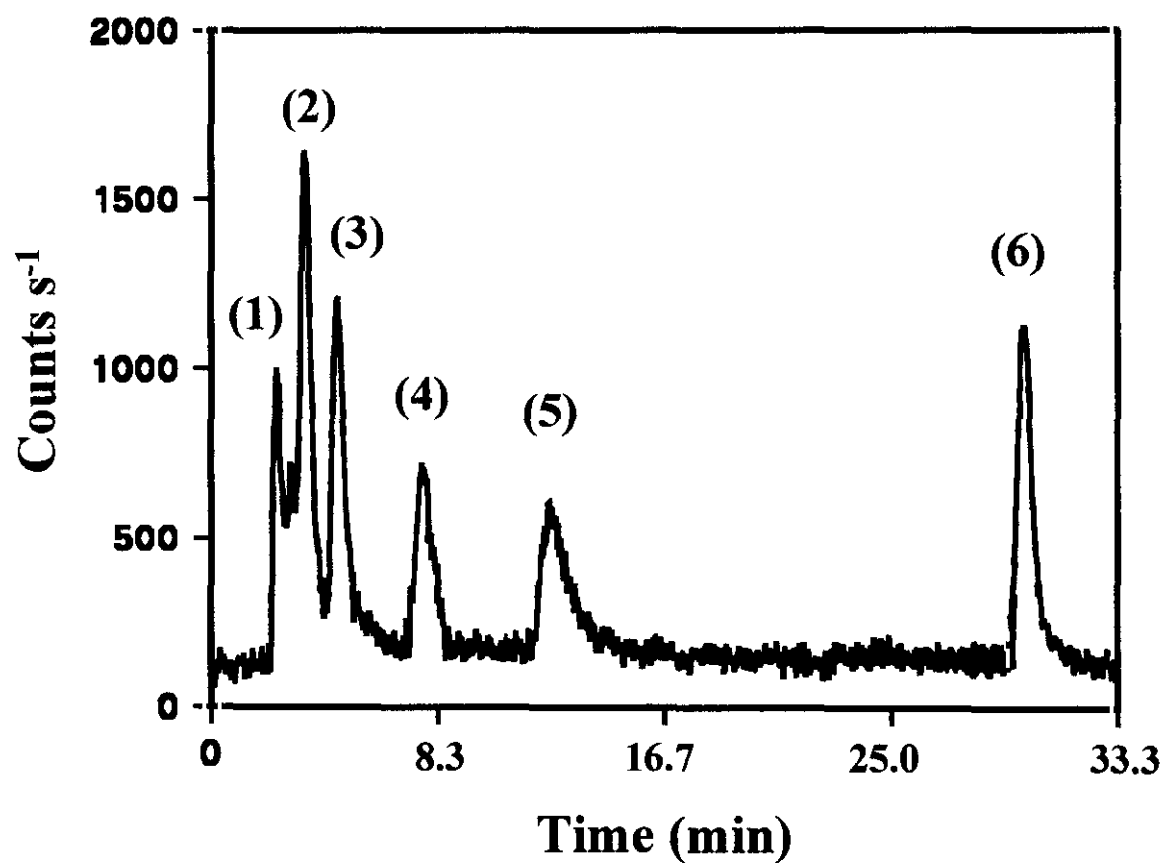
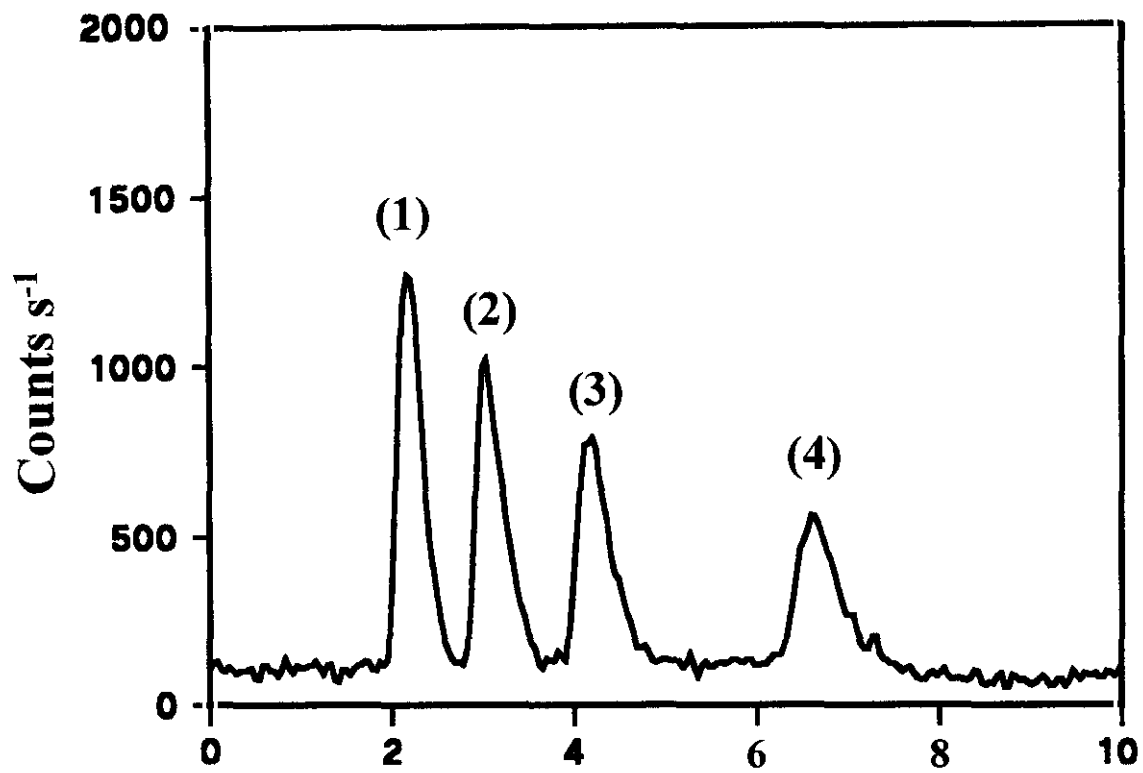


Fig.1 (a) upper graph and (b) lower graph

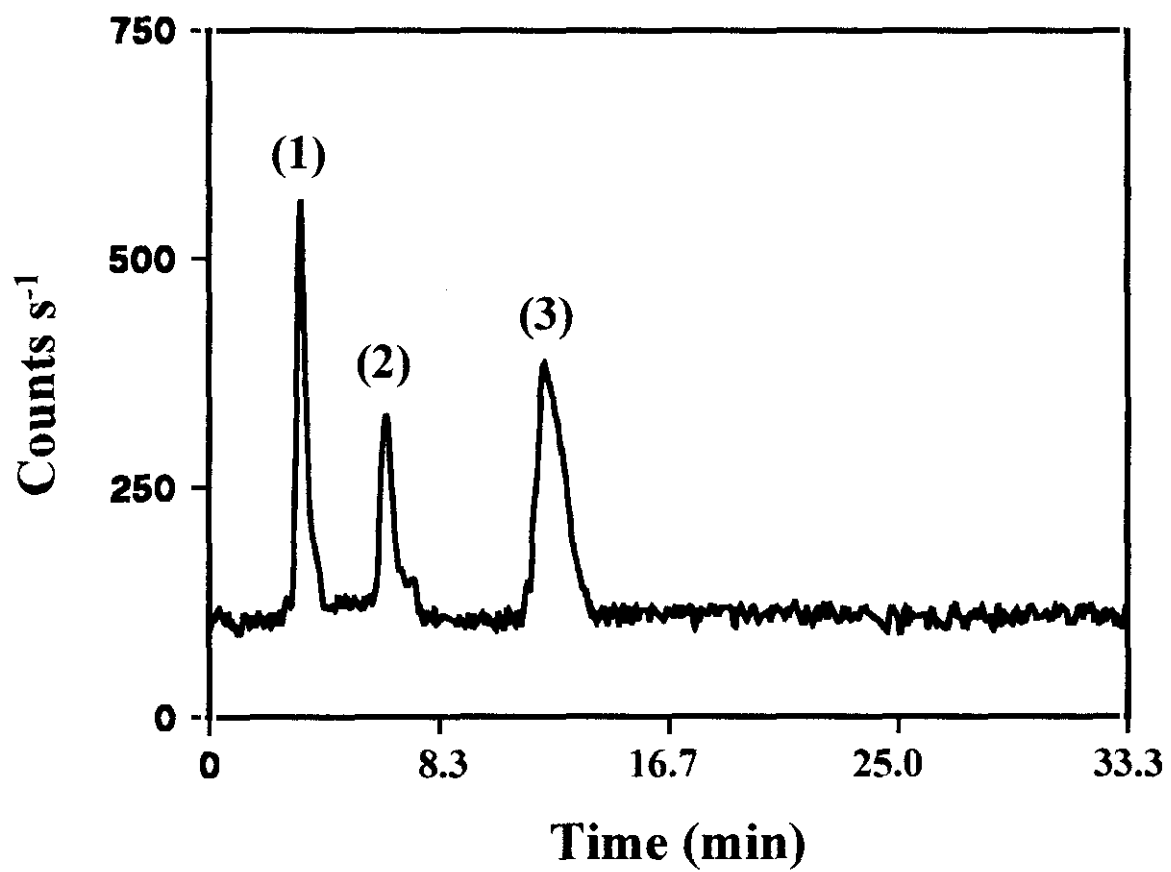
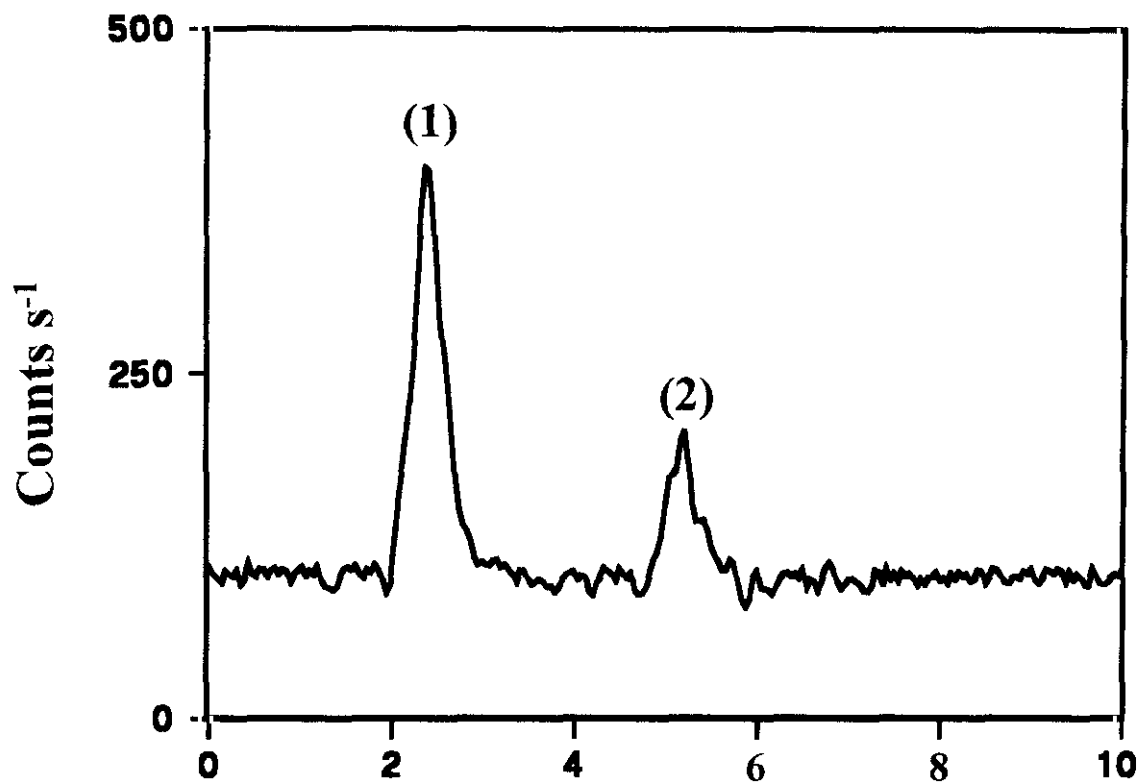
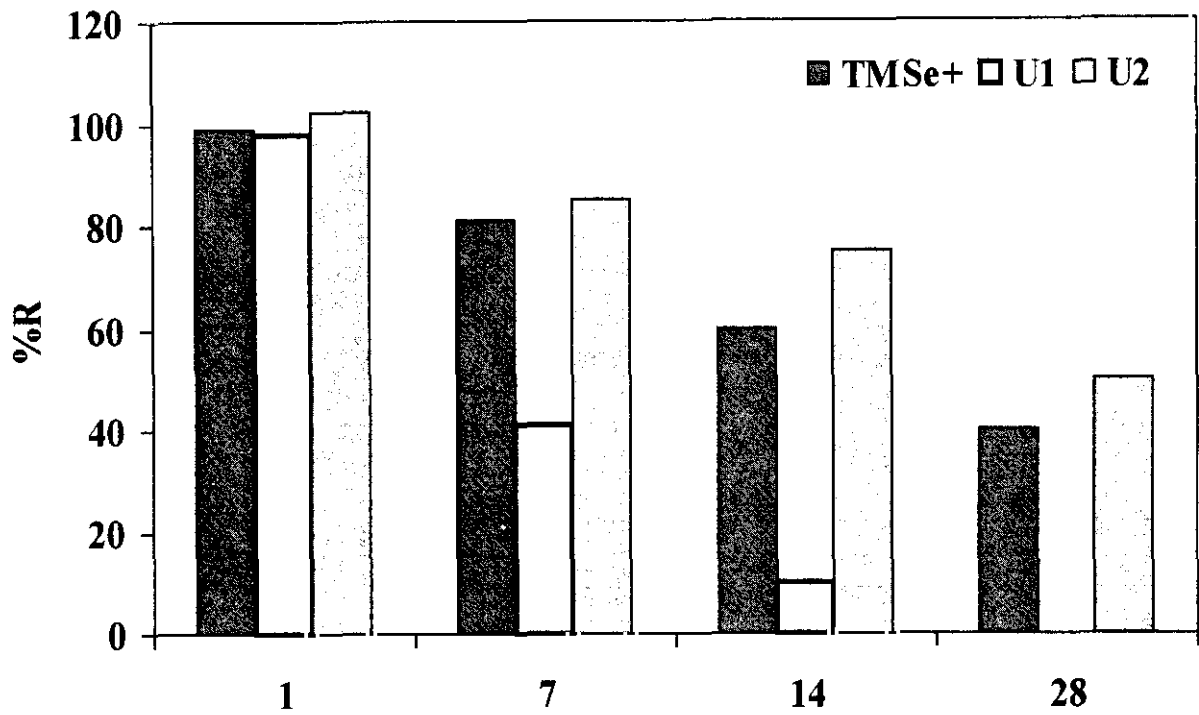


Fig.2 (a) upper graph and (b) lower graph

Pyrex T= -18 °C



Pyrex T= 4 °C

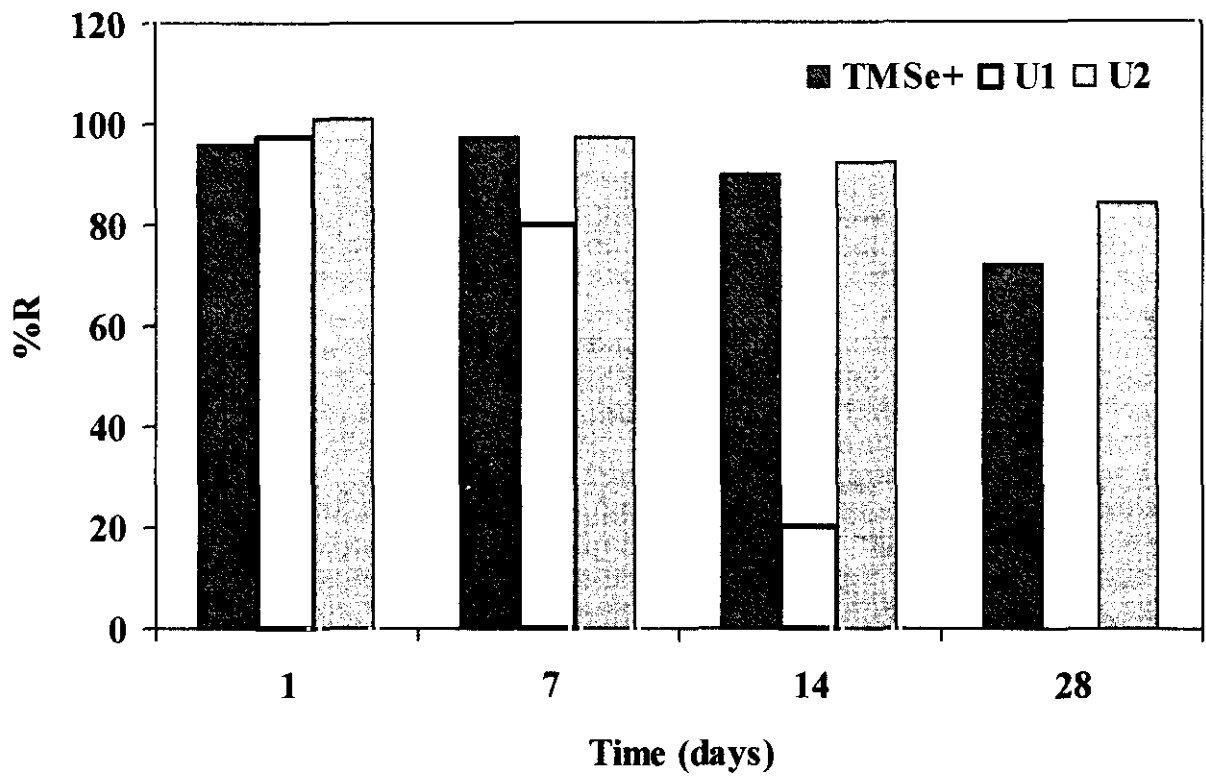
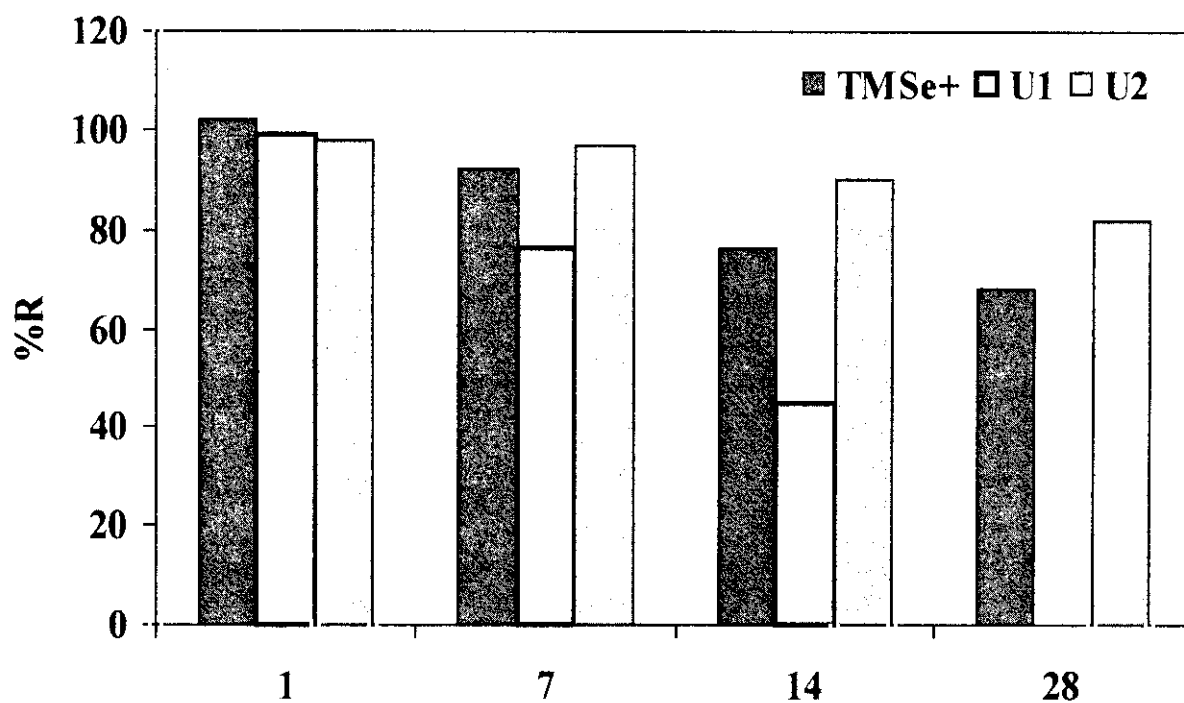


Fig.3 (a) upper graph and (b) lower graph

Polyethylene T= -18 °C



Polyethylene T= 4 °C

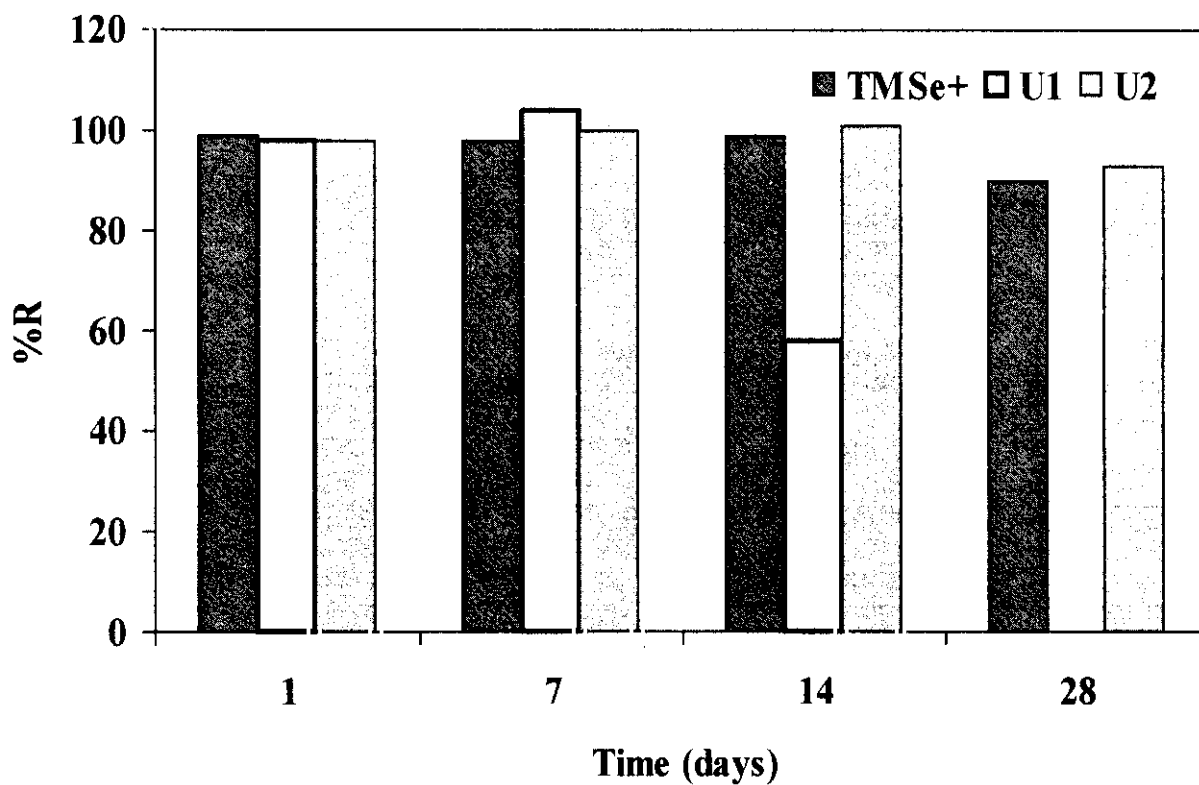


Fig.3 (c) upper graph and (d) lower graph