

## Implementación del Método para la Determinación de Isótopos Estables de Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en Carbones Mediante Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS)

## Implementation of the Method for the Determination of Stable Isotopes of Carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in Coals by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

M. Moreno<sup>1, a)</sup>, M. Peña<sup>1, b)</sup> y R. Álvarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio Geológico Colombiano, Bogotá, Dirección de Asuntos Nucleares, Carrera 50 No. 26-20 Bogotá, D.C. Colombia

<sup>2</sup>Estación Biológica Doñana, Laboratorio de Isótopos Estables LIE, Avd. Américo Vespucio s/n 41001 Sevilla España

Autores para correspondencia: <sup>a)</sup>mmorenof@sgc.gov.co, <sup>b)</sup>mlpena@sgc.gov.co

### Resumen

Este artículo describe el procedimiento para la determinación de la relación isotópica de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) expresado en delta ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en el intervalo de -46.6 ‰ a +37.63 ‰ mediante un sistema compuesto por un analizador elemental, acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (EA-IRMS por sus siglas en inglés) en el laboratorio de Isótopos Estables del Servicio Geológico Colombiano. Los estándares utilizados en el análisis fueron IAEA-LSVEC, USGS-43, NBS-19 y el USGS-41. Los resultados obtenidos de la implementación del método respecto a los parámetros evaluados, permitieron concluir que el método de EA-IRMS es apto para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$  en el intervalo de trabajo establecido, razón por la cual, los resultados son confiables y comparables con los reportados por cualquier otro laboratorio, gracias a los criterios de aceptación establecidos previamente y al análisis estadístico realizado a cada uno de ellos.

**Palabras clave:** Espectrometría de Masa de Relaciones Isotópicas (IRMS), Isótopos Estables, Relación Isotópica.

### Abstract

This paper describes the procedure for determining the isotopic ratio of carbon ( $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ) expressed in delta ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in the range -46.6 ‰ to +37.63‰ by system composed of an elemental analyzer coupled to a mass spectrometer of isotope ratios (EA-IRMS) in the stable solid isotopes laboratory at the Servicio Geológico Colombiano. The reference materials used in the analysis were IAEA-LSVEC, USGS-43, NBS-19 and USGS-41. The results allow us to conclude that the EA-IRMS is suitable for determination of  $\delta^{13}\text{C}$  in coals as a matrix, in the range evaluated; in a reliable and comparable with any other other laboratories thanks to the acceptance criteria and the statistical analysis performed.

**Keywords:** Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), Stable Isotopes, Isotopic Relation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Servicio Geológico Colombiano cuenta con el Laboratorio de Isótopos Estables en Muestras Sólidas ubicado en la sede CAN en Bogotá. Desde el año 2013 se inició el proceso de implementación del laboratorio que consistió en las adecuaciones físicas, condiciones ambientales y la transferencia de conocimiento por parte de expertos internacionales en la técnica espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

Los análisis realizados en este laboratorio permiten la determinación y caracterización de depósitos, procedencia y fluidez de minerales; permitiendo diferenciar unidades geológicas, definir ambientes de génesis de hidrocarburos, naturaleza de aguas y gases, entre otras. Adicionalmente, permite el análisis de abundancias isotópicas en muestras enriquecidas con isótopos estables, por lo tanto se convierte en una buena alternativa al uso de marcadores isotópicos para el seguimiento de la formación de minerales, paleotemperaturas e historia de las rocas [1]. El laboratorio cuenta con un sistema de espectrometría de masas que permite el análisis de relaciones isotópicas de los elementos ligeros: carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ), oxígeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ), azufre ( $\delta^{34}\text{S}$ ) e hidrógeno ( $\delta\text{D}$ ) en muestras orgánicas e inorgánicas, sólidas como suelos, sedimentos, rocas y minerales con el fin de apoyar los estudios geológicos y de exploración de minerales.

Los isótopos estables son átomos no radiactivos de un elemento químico que tienen el mismo número de protones pero diferente número de neutrones y por lo tanto, diferente masa. Estos elementos se encuentran distribuidos por toda la Tierra en forma de diferentes moléculas, constituyendo unos excelentes trazadores naturales de los procesos fisicoquímicos que ocurren en la naturaleza [2].

Las variaciones en la abundancia isotópica o la forma en que los isótopos se distribuyen entre diferentes sustancias es producida por medio de procesos fisicoquímicos, incluyendo reacciones enzimáticas, proceso denominado como fraccionamiento isotópico. Específicamente, el fraccionamiento puede ser causado por reacciones de intercambio isotópico entre dos sustancias coexistentes que implican la redistribución de los isótopos de un elemento. Como resultado de este fraccionamiento isotópico es posible encontrar sustancias que varían ligeramente en la composición de sus isótopos estables y por lo tanto en su masa.

Estas pequeñas variaciones pueden ser medidas por Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas [3].

Las principales aplicaciones del análisis de isótopos estables están centradas en estudios ecológicos (ciclos biogeoquímicos, cadenas tróficas, contaminantes, etc.). En paleontología, se utilizan como excelentes trazadores que permiten determinar las variaciones de C, S, N, H y O en las plantas, suelos y agua. Mediante variaciones en el fraccionamiento isotópico es posible interpretar cambios en alimentación, variaciones climáticas, entre otros; así como determinar biomarcadores para la detección de vida antigua al realizar el análisis en restos fosilizados.

Las relaciones isotópicas han sido utilizadas para la determinación de sustancias nutritivas a través de las diferentes especies de una comunidad biológica, por ejemplo el carbono en los animales depende de la ingesta de los mismos; se pueden determinar las dietas fósiles al tomar los isótopos de carbono y nitrógeno de los constituyentes fosilizados del colágeno. Al hacer el estudio isotópico se podrá conocer con qué tipo de plantas o animales basaba su dieta el organismo fosilizado [4]. Esta técnica también puede ser empleada en la determinación de cambio climático por medio de análisis isotópico de  $\text{CO}_2$  atmosférico y terrestre.

Los isótopos estables de elementos ligeros como H, N, C, O y S son la columna vertebral de la geoquímica isotópica, ya que estos elementos están presentes en la mayoría de los procesos que ocurren en la tierra [5].

Debido a que la abundancia de los isótopos pesados es muy baja, es más fácil realizar medidas relativas que medir abundancias absolutas, por ello para las determinaciones isotópicas se emplea la notación  $\delta$  (delta) que es definida por la EC 1:

$$\delta X_{\text{Muestra}}(\text{per mil}) = \frac{R_{\text{Muestra}} - R_{\text{Estándar}}}{R_{\text{Estándar}}} \times 1000 \text{ (I)} \quad (1)$$

Donde  $R_{\text{Muestra}}$  es la relación isotópica del isótopo pesado y ligero en la muestra y  $R_{\text{Estándar}}$  es la misma relación en el estándar,  $\delta x$  representa  $\delta\text{D}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  o  $\delta^{15}\text{N}$  según sea el caso [1].

Este estudio presenta la implementación del método para la obtención de la relación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en muestras de carbones por medio de la

técnica EA-IRMS mediante el uso de los estándares adquiridos directamente del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y estándares secundarios proporcionados por la Estación Biológica Doñana (EBD-CSIC, España).

## 2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

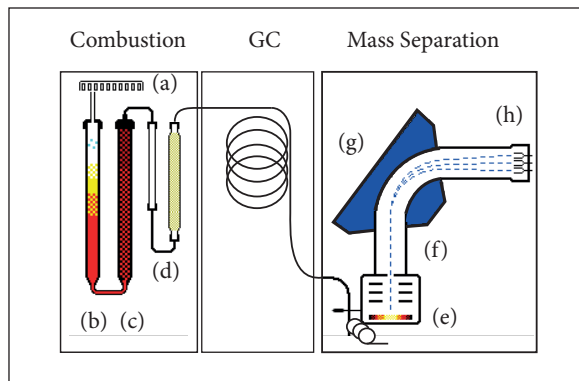
### 2.1. Principio del Método

En la espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas el análisis isotópico es realizado en forma de moléculas gaseosas del tipo CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> las cuales son introducidas en un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas mediante un flujo de helio como gas portador. Para llevar las moléculas que contienen los isótopos estables a estas especies, es necesario un proceso analítico previo en donde las muestras reaccionan a altas temperaturas y en presencia de catalizadores, con el fin de transformar la materia a analizar en las especies que son utilizadas como referencia [6].

La primera parte del proceso ocurre en un analizador elemental “Flash HT Plus”, el cual cuenta con dos hornos instalados para dos modos de operación. El primero de ellos es el modo de combustión en donde se determinan los isótopos de carbono, nitrógeno y azufre en las moléculas gaseosas de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>, respectivamente. El segundo modo de operación es por pirólisis que sirve para determinar los isótopos de hidrógeno y oxígeno. Los gases limpios producidos en los hornos de combustión y pirólisis pasan por una columna cromatográfica en donde son separados. El analizador elemental (Figura 1) es acoplado al espectrómetro de masas por medio de una unidad llamada Conflo IV, que regula la entrada de los gases producidos al espectrómetro de masas.

La detección en el espectrómetro de masas se da al entrar los gases por una válvula tipo aguja. Un filamento caliente genera un bombardeo de electrones que sirven como fuente de ionización de las moléculas de gas presentes [7]. Las moléculas ionizadas entran en un fuerte campo magnético producido por un electroimán el cual realiza la separación por masas.

Figura 1. Proceso para la determinación isotópica de carbono



(a) Automuestreador, (b) Columna de combustión, (c) Columna de reducción, (d) Trampa de agua, (e) Fuente iones, (f) tubo de vuelo, (g) Desviación magnética, (h) Detectores.

### 2.2. Materiales, insumos y equipos

Los equipos utilizados fueron: Microbalanza Sartorius® (Cubis MSE6.6S-000-DM). Sistema de espectrometría de masas compuesto por un Analizador Elemental Flash 2000, una Interfase Conflo IV y un Espectrómetro de masas de relación isotópica (IR-MS) Delta V Advantage Isotope ratio MS Thermo Fisher Scientific®. Los materiales utilizados como referencia se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estándares utilizados para la determinación de la linealidad de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C por δ<sup>13</sup>C (‰)

Nombre	STD	δ <sup>13</sup> C (‰)
Lithium Carbonate	IAEA – LSVEC	-46,6
Indian human hair powder	USGS – 43	-21,28
Limestone	NBS 19	1,95
L-glutamic acid	USGS – 41	37,63

Para el pesaje de las muestras se utilizaron cápsulas de estaño (8 x 5 mm) volumen 157 µL y reactores de cuarzo utilizados para los análisis de C y N.

### 2.3. Implementación de la metodología para la determinación de la relación isotópica de carbono.

Las siguientes son las características del mensurando a cuantificar que definen el método y fueron empleadas para la implementación del mismo.

1. Mensurando: Relación isotópica de Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  por  $\delta^{13}\text{C}$ ).
2. Técnica analítica: Espectrometría de masas de razones isotópicas (IRMS).
3. Parámetros de Implementación y criterios de aceptación:

**Linealidad** [8]: capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo de medición de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

**Tabla 2. Criterios de aceptación para la determinación de la linealidad**

Criterio	Características
Coefficiente de correlación	$r > 0,99$ $H_0$ : No significativo $H_1$ : Sí significativo
Pendiente	$H_0$ : $b=0$ $H_1$ : $b \neq 0$ Estadísticamente diferente de cero
Punto de corte	$H_0$ : $a = 0$ $H_1$ : $a \neq 0$
Regresión	$H_0$ : No hay relación significativa entre X y Y. No hay regresión $H_1$ : Sí hay relación significativa entre X y Y. Sí hay regresión
Residuales	No debe presentarse una tendencia en la gráfica de los residuales Vs los niveles de la curva.

Los criterios de aceptación utilizados se resumen en la Tabla 2. La linealidad se evaluó mediante la recta correspondiente a la ecuación  $y = bx + a$ , donde  $y$  corresponde a los valores reales de los estándares

utilizados y  $x$  a los valores obtenidos para los mismos estándares. Usando el análisis de la regresión y correlación por mínimos cuadrados para el intervalo de trabajo, el análisis de la gráfica y el tratamiento estadístico de los datos para cada uno de los parámetros evaluados. El intervalo de trabajo se detalla en la Tabla 1.

**Exactitud:** está compuesta por los parámetros que se relacionan en la figura 2.

**Figura 2. Determinación de la exactitud**



**Veracidad:** es la proximidad entre el promedio de un número infinito de réplicas de valores de medición y un valor de referencia o convencionalmente verdadero. La exactitud está relacionada de forma inversa con el error sistemático de medición, el cual puede ser estimado como un sesgo de medición.

La estimación del sesgo en los resultados de medición se obtuvo midiendo 10 veces el valor de seis materiales de referencia, en condiciones de repetibilidad o de precisión intermedia. La estimación del sesgo fue dada por diferencia entre el valor promedio de los valores de medición para un material y el valor convencionalmente verdadero de dicho material. Para la evaluación de la veracidad se realizaron las siguientes mediciones:

**Tabla 3. Muestras utilizadas para la evaluación de la veracidad**

Estándar	$\delta^{13}\text{C}_{\%VPDB}$
USGS - 43	-21,28
IAEA - CH7	-32,15
LIE-CV	-22,19
LIE-BB	-18,58
LIE EEZ-20	-12,26
LIE PA 2	-15,84

**Precisión:** es el grado de concordancia entre las indicaciones o valores de una magnitud medidos, obtenidos por mediciones replicadas sobre el mismo objeto o uno similar bajo condiciones específicas [9]. La precisión fue medida por el grado de dispersión de los resultados individuales con respecto a la media, y está expresada matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o Coeficiente de Variación (CV). Se evaluó a través de repetibilidad y reproducibilidad intermedia. Se realizaron 10 determinaciones de cada uno de las muestras, determinando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

**Repetibilidad:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de mediciones sobre la misma muestra bajo las mismas condiciones. Para la evaluación de la repetibilidad se tomaron los ensayos realizados para la veracidad además los ensayos realizados a una muestra de papel de caña en el LIES y el LIE-EBDA.

**Precisión intermedia:** El objetivo del estudio de precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, usando el mismo procedimiento, pero en un intervalo de tiempo mayor, posiblemente por diferentes analistas quienes pueden usar el equipo en forma diferente. Se evalúan los efectos causados al variar factores tales como el día, el analista, el instrumento, entre otros. La evaluación de la precisión intermedia se realizó con analistas diferentes en días distintos. Se evaluó la respuesta sobre la muestra de papel de caña [10].

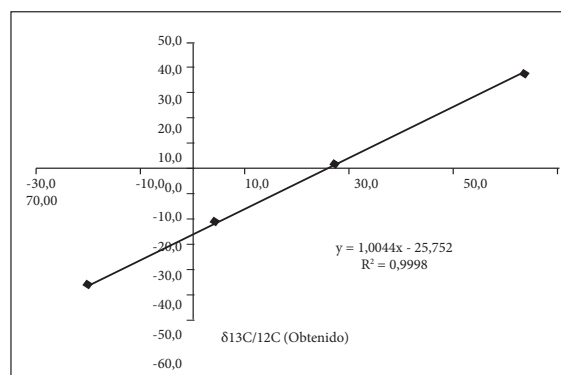
**Reproducibilidad:** La reproducibilidad fue evaluada por medio de los análisis sobre una misma muestra (papel de caña) en el Laboratorio de Isótopos Estables del Servicio Geológico Colombiano (LIES) y el Laboratorio de Isótopos Estables de la Estación Biológica Doñana (LIE-EBDA).

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación, se relacionan los resultados obtenidos para la implementación de la metodología basados en los criterios de aceptación establecidos previamente.

**Linealidad:** La figura 3 presenta los resultados obtenidos para la curva de calibración, con el fin de evaluar la linealidad de la relación isotópica de carbono en el intervalo - 46,6‰ hasta +37,63‰.

Figura 3. Gráfica de linealidad para determinación de carbono



Al realizar análisis de residuales se observa que no presentan ninguna tendencia, estos resultados se encuentran aleatorios lo cual indica que el modelo de regresión escogido ofrece un buen ajuste.

De acuerdo a los datos reportados en la Tabla 4 se considera que el método es lineal para el intervalo evaluado de relación isotópica de carbono. En cuanto al punto de corte, de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos, se observa como este es estadísticamente diferente de cero, sin embargo en virtud de la naturaleza del mensurando correspondiente a una medición relativa, este criterio fue descartado como requisito para aceptación de la linealidad.

Tabla 4. Resultados para la linealidad de la relación isotópica de carbono

Criterio	Hipótesis	Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Coeficiente de correlación	-	> 0,99	1,00	Cumple
	H <sub>0</sub> : no significativo H <sub>1</sub> : Sí significativo	t <sub>cal</sub> > t <sub>crit</sub> : se rechaza H <sub>0</sub>	t <sub>cal</sub> : 28141,09 t <sub>crit</sub> : 2,23	Se rechaza H <sub>0</sub> r significativo
Pendiente	H <sub>0</sub> : b=0 H <sub>1</sub> : b ≠ 0	t <sub>cal</sub> > t <sub>crit</sub> : se acepta H <sub>0</sub>	t <sub>cal</sub> : 210,93 t <sub>crit</sub> : 2,23	Se rechaza H <sub>0</sub> ; b Estadísticamente diferente de cero.
	Regresión	H <sub>0</sub> : no hay relación significativa entre X y Y. H <sub>1</sub> : Sí hay relación significativa entre X y Y.	F <sub>tab</sub> > F <sub>crit</sub> : se acepta H <sub>0</sub>	F <sub>tab</sub> : 44492 F <sub>crit</sub> : 1,41E-19

**Veracidad:** la evaluación de la veracidad se realizó con la medición de los estándares referenciados en la Tabla 5. A cada uno de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los estándares primarios y secundarios se les realizó una serie de medidas con el fin de calcular el sesgo implicado en la medición. En cuanto a la veracidad los resultados de la Tabla 5 se observa que no existe diferencia significativa con los valores obtenidos y los valores teóricos, ya que los resultados de exactitud obtenidos se encuentran dentro del intervalo establecido como criterio de aceptación (90 – 110%).

El descarte de datos se hizo mediante el contraste estadístico de Grubbs. Estos resultados demuestran que el método, en las condiciones del laboratorio, con analistas diferentes y en días distintos, genera resultados con veracidad satisfactoria para estándares que se encuentren en el rango establecido, por tanto se considera que el método es veraz en el intervalo evaluado y definido previamente en la linealidad.

**Repetibilidad:** A partir de los datos obtenidos de  $\delta^{13}\text{C}$  de los estándares (Tabla 5) y de los valores obtenidos para la muestra de papel de caña (Tabla 6), se observa que estos resultados presentan un coeficiente de variación que está dentro del límite ( $\text{CV} < 5,66\%$ ) indicado por los criterios del laboratorio. El criterio fue establecido por medio de la ecuación de Horwitz, ver Ec. 2.

$$CV \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (2)$$

Donde,

CV: Coeficiente de variación

C: relación isotópica en partes por mil ‰.

La repetibilidad también fue evaluada por medio de las mediciones de una muestra de papel de caña, realizadas por el mismo analista en un mismo día (Tabla 6). Se observa que los coeficientes de variación son menores al valor crítico estimado por medio de la ecuación de Horwitz.

Los resultados permiten establecer que la metodología analítica presenta un alto grado de precisión (ya que las medidas realizadas dan un coeficiente de variación menor al 5,66%), así como repetibilidad para el análisis de  $\delta^{13}\text{C}$ .

**Precisión intermedia:** A partir de los resultados obtenidos entre los analistas 1 y 3 (Tabla 6), las medidas fueron tomadas en el mismo laboratorio (Laboratorio de Isótopos estables en muestras sólidas - Servicio Geológico Colombiano), empleando el mismo equipo y la misma técnica en diferentes días. Se observa que estos resultados presentan un coeficiente de variación que está dentro del límite indicado por los criterios del laboratorio. El criterio fue establecido por medio de la ecuación de Horwitz ( $\text{CV} < 5,66\%$ ).

Lo anterior permite concluir que la metodología analítica presenta buena precisión en términos de precisión intermedia para el análisis de  $\delta^{13}\text{C}$ .

Tabla 5. Datos obtenidos para determinación de la veracidad del método

Estándar	USGS-43	IAEA-CH7	LIE-CV	LIE-BB	LIE-EEZ-20	LIE-PA
Fecha análisis	25/11/2014	12/05/2014	27/11/2014	27/11/2014	27/11/2014	02/12/2014
Valor real	-21,28	-32,15	-22,19	-18,58	-12,26	-15,84
n	9	10	10	10	11	11
Promedio ( $\delta^{13}\text{C}\%$ )	-21,46	-31,73	-22,84	-18,96	-12,39	-16,14
Desvest	0,12	0,036	0,093	0,15	0,076	0,25
CV	0,54	0,11	0,41	0,82	0,61	1,54
% Error	-0,84	1,30	-2,92	-2,02	-1,06	-1,88
%Exactitud	100,84	98,70	102,92	102,02	101,06	101,88

**Tabla 6. Datos obtenidos para la muestra de papel de caña por tres analistas diferentes, y en diferentes laboratorios**

Fecha análisis	03/12/2014	EBDA	14/02/2014
Réplica/Analista	Analista 1	Analista 2	Analista 3
n	10	18	27
Máximo	-12,807	-12,877	-12,907
mínimo	-13,451	-13,238	-13,235
T Alto	1,618	1,824	1,383
T bajo	1,870	1,705	1,900
Valor crítico G (0.05)	2,262	2,120	2,060
Promedio ( $\delta^{13}C\%$ )	-13,11	-13,06	-13,0
Desvest	0,18	0,10	0,10
CV	1,41	0,79	0,77

**Reproducibilidad:** Los datos de reproducibilidad fueron evaluados por medio de las mediciones de una

misma muestra (papel de caña) que se realizaron en dos laboratorios distintos. Los resultados se presentan en la Tabla 6, en donde se consignan los datos de los analistas 1 y 3 que fueron tomadas en el laboratorio de Isótopos Estables del Servicio Geológico Colombiano y los datos del analista 2 fueron tomados en la Estación Biológica Doñana.

El análisis de varianza que se presenta en la Tabla 7 demostró que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los conjuntos de datos objeto de estudio, adicionalmente se puede establecer que el valor esperado es estadísticamente igual para los tres conjuntos de datos.

Los resultados de la evaluación de la reproducibilidad muestran que aunque se cambien las condiciones en que se hace el ensayo, con diferente analista, diferente día y diferente laboratorio, el método sigue presentando buena precisión (coeficiente de variación menor al 5,66%) para la determinación  $\delta^{13}C$ . Por tanto, acorde con los resultados de las Tablas 6 y 7, se puede concluir que el método es reproducible para el fin previsto.

**Tabla 7. Análisis de varianza para la reproducibilidad**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0476	2	0,0238	1,361	0,265	3,175
Dentro de los grupos	0,910	52	0,0175			
Total	0,957	54				

## 4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que existe relación lineal en el intervalo de trabajo seleccionado con respecto a los materiales de referencia disponibles en el laboratorio, los cuales tienen  $\delta^{13}C$  entre -46,6‰ y +37,63‰ (tablas 8 y 9).

Los resultados encontrados de la técnica de espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS por sus siglas en inglés) presentan buena exactitud, determinada con base en la veracidad, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (Tabla 10).

En cuanto a los parámetros evaluados y los criterios de aceptación establecidos, es posible concluir que el método IRMS es apto para la determinación de las relaciones isotópicas de carbono en el intervalo de trabajo establecido, razón por la cual los resultados analíticos son confiables y podrán ser comparados con los obtenidos en otros laboratorios.

De acuerdo con la naturaleza del mensurando, el cual corresponde a una medición relativa, los parámetros de límite de detección y límite de cuantificación no aplican en esta técnica.

Con el fin de aumentar el rango de mediciones del método, se propone que a futuro se realicen estudios

para medir la precisión en un intervalo más amplio de relaciones isotópicas para el carbono.

Debido a que los materiales de referencia certificados son costosos y de difícil consecución, se recomienda

hacer pruebas para encontrar materiales de referencia secundarios que puedan servir para el aseguramiento de la calidad analítica de resultados y el análisis rutinario.

**Tabla 8. Rango validado para  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$**

Parámetro	Carbono	Observaciones
<b>Linealidad Rango Validado</b>	-46,6 a -37,63‰	Se garantiza la realización de análisis en estos rangos de relación isotópica ya que al hacer el análisis de linealidad se encontró que medidas realizadas de $\delta^{13}\text{C}$ en este rango presentan comportamiento lineal.

**Tabla 9. Criterios de aceptación para la linealidad del método**

Criterio	Hipótesis	Criterio de aceptación	Resultados	Conclusión
<b>Coefficiente de correlación</b>	$r > 0,99$	$> 0,99$	1,00	Cumple
	$H_0$ : No significativo	$t_{\text{cal}} > t_{\text{crit}}$ : se rechaza $H_0$	$t_{\text{cal}}$ : 28141,09	Se rechaza $H_0$ $r$ significativo
	$H_1$ : Sí significativo		$t_{\text{crit}}$ : 2,23	
<b>Pendiente</b>	$H_0$ : $b=0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{crit}}$ : se rechaza $H_0$	$t_{\text{cal}}$ : 210,93	Se rechaza $H_0$ . $b$ Estadísticamente diferente de cero
	$H_1$ : $b \neq 0$ Estadísticamente diferente de cero.		$t_{\text{crit}}$ : 2,23	
<b>Regresión</b>	$H_0$ : No hay relación significativa entre X y Y. No hay regresión	$F_{\text{tab}} > F_{\text{crit}}$ : se rechaza $H_0$	$F_{\text{tab}}$ : 44492	Se rechaza $H_0$ . Sí hay regresión.
	$H_1$ : Sí hay relación significativa entre X y Y. Sí hay regresión		$F_{\text{crit}}$ : 1,41E-19	
<b>Residuales</b>	No debe presentarse una tendencia en la gráfica de los residuales Vs los niveles de la curva.		No se presenta ninguna tendencia, se encuentran datos aleatorios lo cual indica que el modelo de regresión escogido se ajusta bien.	



Tabla 10. Criterios de aceptación para la determinación de la exactitud del método

	Criterio	Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión	Observaciones
Exactitud	Veracidad	Porcentaje de exactitud entre 90–110 %	101,24 %	Cumple	No existen diferencias significativas con los valores obtenidos y los valores teóricos ya que los % de exactitud obtenidos se encuentran dentro del intervalo establecido como criterio de aceptación.
	Repetibilidad	% CV < 5,66	0,67 %	Cumple	La metodología analítica presenta buena precisión como repetibilidad para el análisis de relación isotópica de <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C.
	Precisión Intermedia	% CV < 5,66	0,99 %	Cumple	La metodología analítica presenta buena precisión como precisión intermedia para el análisis de relación isotópica de <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C.
	Reproducibilidad	Homogeneidad de varianzas H <sub>0</sub> : Varianzas iguales H <sub>i</sub> : Varianzas diferentes		Cumple	El análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los conjuntos de datos objeto de estudio, adicionalmente se puede establecer que el valor esperado es estadísticamente igual para los tres conjuntos de datos.
		%CV < 5,66	0,99%	Cumple	Aunque se cambien las condiciones en que se hace el ensayo, con diferente analista, diferente día y diferente laboratorio, el método sigue presentando buena precisión para la determinación de la relación isotópica.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la química Vanessa Peiró del Laboratorio de Isótopos estables de la Universidad Autónoma de Madrid por su colaboración en la implementación de la técnica.

## REFERENCIAS

[1] K. C. Misra, Introduction to Geochemistry Principles and Applications, Tennessee, USA: Wiley-Blackwell, 2012.

[2] R. R. Ortega, «Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables,» de *Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales*, Ma-

drid, España, UAM Ediciones, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid, 2008, pp. 1-16.

[3] U. A. C. Laboratory, «Center for Applied Isotope Studies Stable Isotope Ecology Laboratory,» University of Georgia. Julio 1997. [En línea]. Available: <http://sisbl.uga.edu/ratio.html#intro>. [Último acceso: 22 de marzo 2017].

[4] L. S. Santiago et al., « El uso de isótopos estables en biología tropical», *Interciencia*, 9, vol. 30, 2005. [En línea]. Available: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005000900006](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000900006). [Último acceso: 22 de marzo 2017].



- [5] M. Baskaran, Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, Detroit: Springer, 2011.
- [6] E. Zaidín, «Los isótopos estables y la espectrometría de masas de isótopos,» [En línea]. Available: <http://www2.eez.csic.es/files/Los%20Isótopos%20Estables.pdf>. [Último acceso: 22 de marzo 2017].
- [7] Z. Muccio y G. Jackson, «Royal Society of Chemistry,» 14 de noviembre 2008. [En línea]. Available: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/an/b808232d#!divAbstract>. [Último acceso: 22 de marzo 2017].
- [8] Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores, «Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados,» 2016. [En línea]. Available: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf). [Último acceso: 22 de marzo 2017].
- [9] M. J. C. Miller James N, Estadística y quimiometría para química analítica, Madrid: Prentice Hall, 2002.
- [10] Centro español de metrología y JCGM, «Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados» 2012. [En línea]. Available: <http://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>. [Último acceso: 16 de marzo 2015].
- [11] R. Guerrero y M. Berlanga, «Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones», *Actualidad de la Sociedad Española de Microbiología*, vol. 30, p. 17-23, 2000.