

# ALAN

**Volumen 54. N° 4. Diciembre 2004  
Suplemento 2**

**A R C H I V O S**

**Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**

**L A T I N O A M E R I C A N O S**

**Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición**

**D E N U T R I C I O N**



*Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)* es editado como órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), para la divulgación de conocimientos en el campo de la alimentación y de la nutrición principalmente en el Hemisferio Americano. En sus páginas se acogen manuscritos en español, inglés, portugués y francés, tanto de miembros como de aquellos que no sean miembros de la Sociedad, y de cualquiera de las siguientes categorías: 1. Trabajos generales (revisiones científicas críticas); 2. Trabajos de investigación (originales); 3. Trabajos de nutrición aplicada (resultados analíticos de programas de intervención y discusión de recomendaciones de aplicación práctica), y 4. Cartas al Editor (comentarios cortos de interés general o relacionados con resultados o conceptos científicos publicados previamente en *Archivos*).

*Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)* is the official publication of the Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), for the dissemination of knowledge in the fields of food and nutrition, principally throughout the American Hemisphere. Articles in Spanish, English, Portuguese and French are accepted, both from the Society members and from nonmembers, in the following categories: 1. General articles (critical scientific reviews); 2. Research articles (originals); 3. Papers in applied nutrition (analytical results from intervention programs and discussion of recommendations of practical application), and 4. Letters to the Editor (short comments of general interest or about scientific facts and concepts previously published in *Archivos*).




**Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición**

Apartado 62.778. Chacao.  
Caracas 1060. Venezuela, S.A.  
Fax (58.212) 286.00.61

Ubicación en formato digital: <http://www.scielo.org.ve>  
Correo electrónico: [alanven04@hotmail.com](mailto:alanven04@hotmail.com)

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION está registrado en ASEREME e indizado en las siguientes Bases de Datos: LILACS/CD ROM; Food Science & Technology Abstracts; MEDLINE, Life Science Collection; Science Citation Index

## ENTIDADES PATROCINANTES

- **FONACIT.** Venezuela
- **Fundación para la Alimentación y Nutrición “José María Bengoa”**  
Caracas, Venezuela
- **Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)**  
Guatemala, Guatemala C.A.
- **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION.** Venezuela
-  **Hellogg's** América Latina
-  **PRODUCTOS ROCHE,** América Latina
- **Fundación POLAR**
- **Centro de Atención Nutricional Infantil Antímano. CANIA**
- **PARMALAT de Venezuela**
- **ADM Protein Specialties**
- **Coca-Cola de Venezuela**
-  **Kraft Foods**  
**Kraft Foods Venezuela, C.A.**

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION se complace en destacar y agradecer el apoyo económico recibido del FONACIT para la edición sostenida de la revista.  
Bajo la responsabilidad del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la  
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

---

VOL 54

DICIEMBRE 2004

SUPL N° 2

---

## Contenido

Páginas

Prólogo ..... 3

Utilidad de los isótopos estables en salud humana y nutrición: espectrometría de masas y test de aliento con <sup>13</sup>C-urea aplicados a la detección de infección por *Helicobacter pylori*

Barrado A., Preston T., Slater C., Zubillaga M., Miranda-da-Cruz B., Mokhtar N., Zednik M.,

Valencia M.E. y Boccio J. .... 5

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the  
Latin American Society of Nutrition

---

VOL 54

DECEMBER 2004

SUPPL N° 2

---

## Contents

Pages

Prologue .....	25
<b>The usefulness of stable isotopes in nutrition and human health: the application of mass spectrometry and <sup>13</sup>C-breath tests to detect <i>Helicobacter pylori</i> infection</b> Barrado A., Preston T., Slater C., Zubillaga M., Miranda-da-Cruz B., Mokhtar N., Zednik M., Valencia M.E. and Boccio J. ....	27

## PROLOGO

Este artículo trata de responder algunos de los interrogantes surgidos durante el desarrollo de la parte práctica del Curso de Capacitación organizado en el marco del proyecto ARCAL-RLA-6042-IAEA “Diagnóstico temprano de la infección por *Helicobacter pylori* mediante técnicas nucleares” que tuvo lugar en Hermosillo, México, durante la primera semana de noviembre de 2003. Hemos incluido algunos aspectos generales de la infección por *Helicobacter pylori* así como del método, conocido como Urea Breath Test (<sup>13</sup>C-UBT). Esperamos que este manual pueda ser usado y comprendido por el lector interesado. Cualquier duda, sugerencia, corrección o pregunta serán bienvenidas y contestadas con sumo gusto.

Los autores



## Utilidad de los isótopos estables en salud humana y nutrición: espectrometría de masas y test de aliento con <sup>13</sup>C-urea aplicados a la detección de infección por *Helicobacter pylori*

Barrado A.<sup>1</sup>, Preston T.<sup>2</sup>, Slater C.<sup>3</sup>, Zubillaga M<sup>1</sup>, Miranda-da-Cruz B.<sup>4</sup>, Mokhtar N.<sup>4</sup>, Zednik M.<sup>5</sup>,  
Valencia M.E.<sup>6</sup> y Boccio J.<sup>1</sup>

**RESUMEN.** El interés en investigación en el área de *Helicobacter pylori* se ha incrementado en los últimos años. La infección por *H. pylori* puede producir gastritis crónica a lo largo de toda la vida. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que esta infección bacteriana es la de mayor prevalencia en el mundo, afectando el 50% de la población mundial. Así, es claro que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* representa un paso clave en el manejo de los pacientes que acuden al gastroenterólogo. Así mismo, debido al amplio rango de patologías relacionadas con la infección por esta bacteria que van desde la deficiencia de micronutrientes a procesos neoproliferativos, demuestran el potencial efecto nocivo que puede provocar la infección por *H. pylori* en la salud humana. En los últimos años se han mejorado significativamente los métodos de diagnóstico. El uso de isótopos estables, especialmente los denominados prueba del aire exhalado, como métodos seguros y no invasivos, han sido un paso clave en una nueva era de investigación dedicada al diagnóstico como así también en la elección de las terapias de erradicación para *H. pylori*. Esta técnica nuclear no invasiva, que actualmente es considerada método de referencia para la determinación de la infección por *H. pylori*, ha sido exitosamente implementada en América Latina. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la infección por *H. pylori*, el impacto de la implementación de esta metodología en la región es muy alto. En este artículo se discute en forma detallada los aspectos de esta metodología para armonizar la aplicación de este método diagnóstico en las regiones en vías de desarrollo.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, UBT, diagnóstico, isótopos estables, espectrometría de masas.

**SUMMARY.** The usefulness of stable isotopes in nutrition and human health: the application of mass spectrometry and <sup>13</sup>C-breath tests to detect *Helicobacter pylori* infection. The interest in *Helicobacter pylori* has escalated in recent years. *H. pylori* may produce a chronic gastric infection which is usually life-long and many epidemiological studies have shown that this is the most common bacterial infection throughout the world involving 50% of the world population. Thus, it is clear that the diagnosis of *H. pylori* infection represents at least a key step in the management of many of the patients referred to the gastroenterologist. Additionally, due to the wide range and relevance of pathologies possibly related to this infection, from micronutrient malnutrition and co-infections to malignancies, there is the potential for *H. pylori* to be a major health problem. Improved methods for the diagnosis and follow up treatment of the infection have been developed. Use of stable isotopes as non-invasive and safe diagnostic methods, namely (<sup>13</sup>C) breath tests, has been the key to a new era of research in *H. pylori* epidemiology and diagnosis as well as the establishment of eradication therapies. This non-invasive nuclear technique, that is considered the gold standard for the diagnosis of this bacterial infection, has successfully been standardized and implemented along Latin America. Taking into account the high prevalence of this bacterial infection, the impact of this technique in the whole region is very high. In this article we discuss several aspects of this methodology in order to harmonize the application of this method in developing regions.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, UBT, diagnosis, stable isotope, mass spectrometry.

### INTRODUCCION

El interés en el *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ha aumentado en los últimos años. *H. pylori* puede producir una infección gástrica en forma crónica siendo siempre de larga evolución y muchos estudios epidemiológicos muestran que esta es probablemente una de las infecciones bacterianas más comunes pues abarcan al 50% de la población mundial. Por lo tanto, es claro que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* representa como mínimo un paso clave en el control de muchos de los pacientes que recurren a consultar a un gastroenterólogo. Adicionalmente, debido a la amplia gama y relevancia de patologías que posiblemente estén relacionadas

<sup>1</sup>Laboratorio de Isótopos Estables Aplicados a Biología y Medicina. Cátedra de Física. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio Bioquímico de Isótopos Estables. Universidad de Escocia. Centro de Investigaciones del Medio Ambiente. East Kilbride. Glasgow. Gran Bretaña.

<sup>3</sup>Universidad de Glasgow. División de desarrollo en Medicina. Hospital de Yorkhill. Glasgow. Gran Bretaña.

<sup>4</sup>Sección para el Estudio de la Nutrición y la Salud relacionados con el Medio Ambiente. División de Salud Humana. Organismo Internacional de Energía Atómica. Viena. Austria.

<sup>5</sup>Departamento de Cooperación Técnica. Sección Latinoamericana. Organismo Internacional de Energía Atómica. Viena. Austria.

<sup>6</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC Hermosillo. México.

a esta infección, desde malnutrición de micronutrientes hasta cáncer, existe la convicción que el *H. pylori* es uno de los principales problemas de salud. Se están desarrollando métodos para el mejor diagnóstico y control del tratamiento de la infección. Los isótopos estables son utilizados en nuevos métodos de diagnóstico seguros y no invasivos denominados, pruebas de aliento con  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -breath test), siendo la clave para una nueva era en la investigación sobre la epidemiología del *H. pylori*, tanto en el diagnóstico como el establecimiento de terapias erradicadoras.

### ***Helicobacter pylori***

*H. pylori* es una bacteria Gram negativa, de forma espiral, microaerófila, que se aísla en la mucosa gástrica humana; produce grandes cantidades de ureasa, una enzima que hidroliza la urea produciendo dióxido de carbono y amoníaco.

Están identificados dos modelos de distribución de infección por *H. pylori*. Los países en vías de desarrollo tienen, en primera instancia, una elevada proporción de niños infectados desde los primeros años de vida y casi todos los adultos están colonizados.

Estudios muestran una prevalencia de aproximadamente 13-70% en sujetos entre 0-20 años de edad y 70-94% en mayores que 30. El segundo modelo está caracterizado por el incremento de la prevalencia de la infección por *H. pylori* a partir de los 20 años, y esto es típico de los países desarrollados con valores de 5-15% de prevalencia en niños y 20-60% en individuos entre 30-75 años de edad. Puede decirse, entonces, que la infección por *H. pylori* está distribuida en todo el mundo con una prevalencia promedio de 50%. Hay también una relación inversa entre la prevalencia de la infección y el nivel socioeconómico de la población en estudio.

Esta bacteria puede producir gastritis crónica en el antro, úlcera péptica y está asociada con cáncer de estómago. Portadores de *H. pylori* superan en 15 veces la probabilidad de desarrollar úlcera duodenal a individuos negativos para *H. pylori*. La infección predominante, y concomitante inflamación, en úlceras duodenales y gástricas tienden a encontrarse en el antro y cuerpo, respectivamente. La evidencia más convincente que el *H. pylori* es una clave en la patogenia de la úlcera péptica es la observación de que su erradicación reduce drásticamente el índice de recurrencia de la úlcera. La sucesión hipotética de eventos en la patogenia de la úlcera duodenal se inicia con la infección que causa la inflamación de la mucosa. Esto conduce a alteraciones de la regulación hormonal con un efecto neto de hipersecreción ácida. La mucosa del duodeno reacciona ante dicha hipersecreción ácida con la formación de una metaplasia gástrica, que permite al *H. pylori* colonizar el duodeno. El suceso final de la ruptura de la mucosa está causado por factores variados. En períodos largos de tiempo entre el comienzo de la infección y la

aparición del carcinoma de intestino de tipo gástrico resultados sugieren la asociación de *H. pylori* y gastritis crónica, evolucionando a través de atrofia, metaplasia y displasia de intestino. Muchos factores involucrados en la virulencia del *H. pylori* han sido estudiados en forma detallada, incluyendo la ureasa, la citotoxina vacuolar (Vac A), el producto de la citotoxina asociada al gen A (Cag A), la proteína activada por neutrófilos (NapA) y lipopolisacáridos. La adhesión de la bacteria a la superficie de la mucosa es un importante paso inicial para la colonización e infección. Por otra parte, es ampliamente aceptado que el *H. pylori* se adhiere a receptores del epitelio gástrico por medio de adhesinas específicas. Este es un tema digno de más investigación para clarificar el mecanismo de colonización del *H. pylori* y la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento.

*H. pylori* también está vinculado con la malnutrición de micronutrientes. Aunque la absorción de éstos no tiene lugar en el estómago, este órgano contribuye al proceso por medio de la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, que durante la digestión contribuye, no solamente liberando los micronutrientes de la matriz de los alimentos sino también manteniendo en forma soluble a los minerales esenciales. La aclorhidria (disminución de la secreción de ácido clorhídrico) ocurre en el 40-50% de los pacientes infectados con *H. pylori*, a consecuencia de lo cual la absorción de micronutrientes es pobre, y puede comprometer el nivel nutricional de los individuos infectados, produciendo la aparición de síntomas de deficiencia de dichos micronutrientes.

### **Investigación en nutrición y metabolismo con isótopos estables**

Las técnicas nucleares son utilizadas para determinar aspectos dinámicos del metabolismo de animales y humanos. Los isótopos pueden ser radioactivos o estables. Estos últimos permiten su uso en grupos vulnerables, tales como mujeres embarazadas y niños, donde los isótopos radioactivos pueden tener un inaceptable riesgo médico. El mundo de la nutrición ha reconocido el significado de las técnicas isotópicas, especialmente las que utilizan isótopos estables, como suministrando metodologías precisas y no invasivas para medir asimilación de nutrientes, nivel nutricional y su vinculación con el metabolismo. Los isótopos estables son vistos actualmente como herramientas de investigación de gran valor, ya que virtualmente su uso no involucra riesgos para la salud. Por lo tanto los isótopos estables son de elección para el trabajo en humanos, especialmente niños y mujeres embarazadas pudiéndose administrar en forma oral o intravenosa y cuando son incorporados en los productos del metabolismo, tales como agua corporal, urea o  $\text{CO}_2$ , pueden estar en muestras sencillas como saliva, leche, aliento, orina y heces.

El test del aire espirado utilizando  $^{13}\text{C}$ , está basado en

entregar al cuerpo un sustrato enriquecido con  $^{13}\text{C}$  por vía oral o por inyección. En el tejido objetivo, una enzima específica metaboliza selectivamente el sustrato tal que el trazador es liberado irreversiblemente como  $^{13}\text{CO}_2$  dentro del pool de bicarbonato corporal. El trazador es luego transportado por la circulación sanguínea y exhalado en el aliento.

Puede medirse el enriquecimiento del aliento en  $^{13}\text{CO}_2$  luego de un tiempo de incorporar el sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$ . El análisis del isótopo puede ser realizado por el espectrómetro de masas que determina relaciones isotópicas (IRMS).

Las pruebas de aliento que utilizan  $^{13}\text{C}$  son usadas principalmente como herramientas de investigación, pero también son empleadas con éxito en pocos países privilegiados, como una forma sencilla de realizar en forma certera la evaluación de la función gastrointestinal. El test puede ser presentado en un kit, para ser usado en toda la población. Las muestras con el aire exhalado pueden conservarse inalterables en tubos de vidrio llamados Exetainers por lapsos superiores a seis meses antes de ser enviados por correo común a los laboratorios que centralizan su análisis.

La prueba de aliento que utiliza urea (UBT) detecta la presencia gástrica de *H. pylori*. La alta actividad de ureasa producida por el *H. pylori* ha facilitado el desarrollo de métodos diagnósticos usando  $^{13}\text{C}$ -urea o  $^{14}\text{C}$ -urea, que es hidrolizada, produciendo  $^{13}\text{CO}_2$  o  $^{14}\text{CO}_2$  que es exhalado. Estas metodologías tienen las ventajas de ser representativas de toda la superficie del estómago y además no son invasivas. Hasta ahora el diagnóstico de la infección gástrica por *H. pylori* se realizaba mediante la histología, cultivo, test de ureasa rápida y la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) de las muestras obtenidas por métodos invasivos como la endoscopia. Ninguno de estos diagnósticos pueden ser considerados como métodos de referencia ya que las muestras obtenidas por endoscopia son focales y por lo tanto no representan la totalidad de la superficie del estómago.

En este artículo, nosotros describiremos y discutiremos algunos aspectos metodológicos relacionados con el diagnóstico de la infección por *H. pylori* mediante al análisis de la relación  $^{13}/^{12}\text{CO}_2$  en el aire exhalado, utilizando espectrometría de masas.

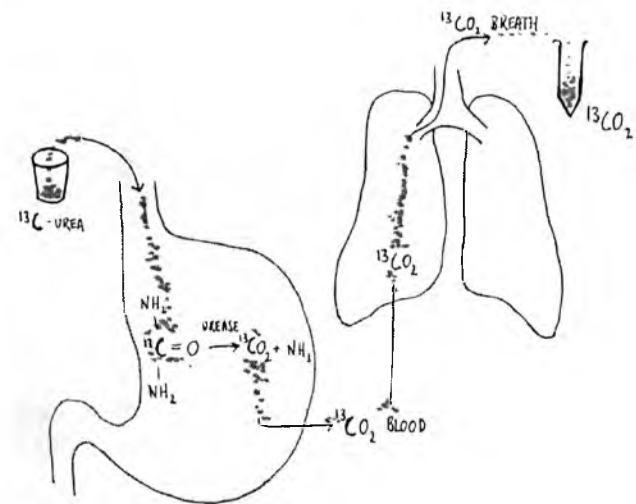
### Prueba del aire espirado con $^{13}\text{C}$ -urea ( $^{13}\text{C}$ -UBT)

La prueba del aire espirado con  $^{13}\text{C}$ -urea es utilizada para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. En esta prueba, se administra  $^{13}\text{C}$ -urea en forma oral mediante un alimento (comúnmente jugo natural de naranjas). La ureasa producida por el *H. pylori* en el estómago, actúa hidrolizando la urea, liberando  $^{13}\text{CO}_2$  que se incorpora al pool de bicarbonato del organismo y es eliminado en el aire exhalado. La relación isotópica del aliento, enriquecido en  $^{13}\text{CO}_2$ , puede ser medido por espectroscopia de masas (IRMS). El aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  en

el aire espirado, a partir de un valor de corte, dentro de los 45 minutos de la ingestión de  $^{13}\text{C}$ -urea es indicativo de la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica.

### La metodología tal como es realizada en Latinoamérica

- Ayuno de seis horas.
- Obtención de muestras basales de aire exhalado por duplicado.
- Ingestión de 50 – 100 mg de  $^{13}\text{C}$ -urea mediante un alimento (jugo de naranjas natural).
- Obtención de muestras de aire exhalado luego de 30 y 45 minutos de la administración de  $^{13}\text{C}$ -urea.
- Medida de las muestras de aire exhalado por IRMS.



**Materiales:** (Fig. 1) Son necesarios pocos materiales para realizar el test.

- 50 – 100 mg de  $^{13}\text{C}$ -urea.
- Alimento de prueba: jugo de naranjas natural.
- Bombilla descartable
- Cuatro tubos: dos para las muestras basales (tapa roja) y dos para las muestras de 30 y 45 minutos post-ingestión de  $^{13}\text{C}$ -urea (tapa azul).

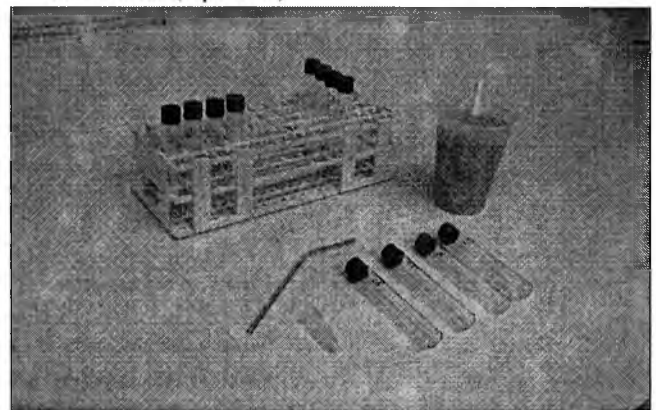


FIGURA 1

**Agregado de la  $^{13}\text{C}$ -urea en el alimento de prueba (Fig. 2)**

La  $^{13}\text{C}$ -urea se disuelve fácilmente revolviendo el jugo de naranjas. El gusto de éste no es alterado.

**FIGURA 2****Cepillado de dientes (Fig. 3)**

Antes de la ingesta de  $^{13}\text{C}$ -urea deberá efectuarse un cepillado de dientes para evitar la potencial interferencia de *H. pylori* presente en la placa dental.

Esto puede hacerse sin pasta dental, usando solamente agua.

**FIGURA 3****Obtención de las muestras basales de aire espirado (Fig. 4)**

Las muestras basales deberían tomarse por duplicado Para determinar la relación  $^{13}/^{12}\text{CO}_2$  usando los tubos (Exetainer) de tapa roja.

El aire exhalado debe ser soplado, a través de una bombilla descartable, dentro del Exetainer.

**FIGURA 4****Ingesta del alimento que contiene la  $^{13}\text{C}$ -urea (Fig. 5)**

Es indispensable que se ingiera la totalidad del alimento que contiene la dosis de  $^{13}\text{C}$ -urea.

**FIGURA 5**

**Cepillado de dientes (Fig. 6)**

Luego de la ingesta del alimento conteniendo  $^{13}\text{C}$ -urea, debe realizarse otro cepillado de dientes para eliminar cualquier residuo de  $^{13}\text{C}$ -urea en la cavidad bucal, donde la bacteria puede mostrar actividad de la ureasa que interferiría con el test. La limpieza debe hacerse sin utilizar pasta dental. Sólo debe emplearse agua.

**FIGURA 6****Muestra de aliento a los 30 minutos (Fig. 7)**

Use un Exeteiner de tapa azul.

La muestra de aire proveniente de una espiración normal y profunda deberá ser soplada dentro del Exeteiner a través de una bombilla descartable.

**FIGURA 7****Muestra de aliento a los 45 minutos (Fig. 8)**

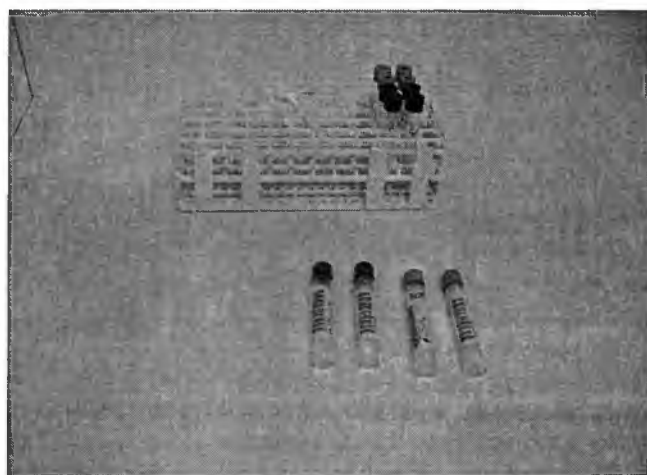
Use un Exeteiner de tapa azul.

La muestra de aire proveniente de una espiración normal y profunda deberá ser soplada dentro del Exeteiner a través de una bombilla descartable.

**FIGURA 8****Medida de las muestras de aliento (Fig. 9)**

Cada muestra de aliento es identificada mediante una etiqueta que contiene un código de barras.

Las muestras pueden guardarse a temperatura ambiente por más de seis meses, hasta ser remitidas mediante correo común a un laboratorio central.

**FIGURA 9**

Los valores basales se determinan por duplicado y se obtienen muestras a los 30 y 45 después de la ingesta de 250  $\text{cm}^3$ , aproximadamente, de jugo de naranjas natural a los que se agregaron 50 mg de de urea enriquecida con  $^{13}\text{C}$ . Esta forma

de administración retarda el vaciado gástrico de la  $^{13}\text{C}$ -urea y favorece su contacto con la totalidad de la mucosa gástrica. Esto es importante para la sensibilidad del método dado que el *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica pero sólo en forma de parches.

### Espectrometría de masas

El espectrómetro de masas, el ciclotrón y el aparato de J.J. Thompson se fundamentan en la interacción de los campos eléctricos y magnéticos con iones, es decir átomos o moléculas cargadas eléctricamente.

En 1897 J.J. Thompson en Cambridge, Inglaterra, midió por primera vez la relación entre la carga del electrón y su masa, utilizando un tubo de vidrio (tipo ampolla) en la cual se había efectuado el vacío. En dicho tubo, un haz de electrones, arrancados de una placa llamada cátodo, es acelerado y llegan hasta una pantalla recubierta con una sustancia fluorescente que revela el sitio del impacto. Lawrence y Stanley Livingston de la Universidad de California idearon en 1931, el ciclotrón, un dispositivo que consta de dos cámaras metálicas en forma de letra D, diseñadas para conseguir un haz de partículas atómicas cargadas que posean gran velocidad.

Conceptualmente la espectrometría de masas consiste en la separación de iones que son producidos y separados o filtrados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ) para ser finalmente detectados. Con este principio se han desarrollado diferentes instrumentos.

El enriquecimiento del aliento en  $^{13}\text{C}$  es medido utilizando un espectrómetro de masas que determina relaciones isotópicas. El primer espectrómetro de masas para medir relaciones isotópicas (IRMS) fue diseñado por Alfred Nier en 1947 (1).

El avance de la tecnología en los últimos tiempos, especialmente en la introducción de las muestras, ha aumentado la eficiencia, sensibilidad y especificidad de este método. Tom Preston y colaboradores introdujeron el flujo continuo (2,3,4). En los instrumentos de flujo continuo, el  $\text{CO}_2$ , arrastrado por una corriente de helio, es separado de otros componentes de una muestra de aire exhalado en una columna cromatográfica en fase gaseosa. El vapor de agua es removido y el  $\text{CO}_2$  es transportado dentro del IRMS, eliminando la necesidad de la preparación previa de la muestra. El agregado de un autosampler y el control del instrumento mediante una computadora, conduce al primer sistema completamente automatizado para el análisis del enriquecimiento del aire espirado en  $^{13}\text{CO}_2$  (5). Otros avances incluyen la introducción de un software de uso fácil, permitiendo la extensión de la espectrometría de masas IRMS, a muchos laboratorios alrededor del mundo.

### Nociones sobre isótopos

Los isótopos son formas de un elemento con diferente masa que tienen el mismo número de protones (y por lo tanto de electrones dado que los elementos son neutros eléctricamente), diferenciándose en la cantidad de neutrones.

Los electrones son los responsables del comportamiento químico por lo que los isótopos no pueden diferenciarse mediante reacciones químicas, pero al poseer distinto número de neutrones, sus masas son distintas.

La nomenclatura aceptada para nombrar a los elementos es



**X:** elemento; **A:** número másico ( $A = Z + N$ ); **Z:** número atómico, número de protones; **N:** número de neutrones.

Los isótopos de un mismo elemento químico tienen el mismo Z y difieren en A.

En las pruebas de aliento utilizando  $^{13}\text{C}$ , necesitamos considerar los isótopos presentes en el  $\text{CO}_2$  de las muestras de aire exhalado.

La Tabla 1 muestra las composiciones porcentuales del carbono y del oxígeno, en sus especies, es decir la abundancia isotópica de las mismas.

Tabla 1

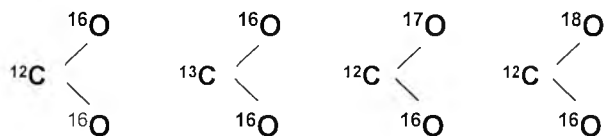
Atomo	Isótopo	Abundancia isotópica (%)
C	$^{12}\text{C}$	98.89
	$^{13}\text{C}$	1.108
	$^{14}\text{C}$	Sumamente baja
O	$^{16}\text{O}$	99.76
	$^{17}\text{O}$	0.04
	$^{18}\text{O}$	0.2

Los elementos pueden presentarse en forma de isótopos estables o radioactivos.

En el caso del carbono, encontramos dos isótopos estables,  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ , y un isótopo radiactivo, el  $^{14}\text{C}$ . Los tres isótopos del oxígeno mostrados en la tabla son estables.

Debe ser observado que en un ser humano de 70 kilogramos de peso puede estimarse una cantidad de  $^{13}\text{C}$  de aproximadamente 120 g. Teniendo en cuenta esto, si la dosis de  $^{13}\text{C}$ -urea suministrada para la prueba es de 50 mg (~11 mg de  $^{13}\text{C}$ ), resulta ser apenas 0,01 por ciento de la cantidad total de  $^{13}\text{C}$ .

Varias especies moleculares del  $\text{CO}_2$  pueden ser formadas combinando los diversos isótopos.



Estas moléculas de CO<sub>2</sub> corresponden a masas 44, 45, 45 y 46, respectivamente.

La probabilidad de encontrar estas composiciones en los iones formados en el aire espirado depende de la abundancia isotópica de los elementos. Otras moléculas del CO<sub>2</sub>, que podrían ser formadas combinando dos o más isótopos de menor importancia, tienen una probabilidad muy baja de ocurrencia.

La cantidad de iones de masa 44 será más de 90 veces mayor que el de otras masas, debido a la contribución de <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>, formado por los isótopos más abundantes.

### Spectrómetro de Masas de Relación Isotópica (IRMS)

Una variedad de IRMS, diseñados especialmente para el análisis automatizado de las pruebas de aire exhalado con <sup>13</sup>C, están disponibles comercialmente. La fotografía (Fig. 10) muestra el equipo instalado en el Laboratorio de Isótopos Estables aplicados a Biología y Medicina, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se trata de un espectrómetro de masas Finnigan BreathMAT (Thermo Electron Corporation, teléfono: Africa +27 11 570 1840, Reino Unido +44 1442 233555; www.thermo.com). Aunque este instrumento no está muy difundido comercialmente, en principio, su diseño y operación es similar a otros instrumentos.

En la Figura 10 de izquierda a derecha, pueden observarse los diferentes componentes:

1. Tubos de He y CO<sub>2</sub> semiocultos por una de las operadoras.
2. Sobre la mesa se encuentran: el espectrómetro, el autosampler con algunos magazines, la bandeja receptora de tubos, el monitor y la impresora.
3. Debajo de la mesa: el compresor, la bomba de vacío rotativa y la CPU de la computadora (parcialmente oculta).

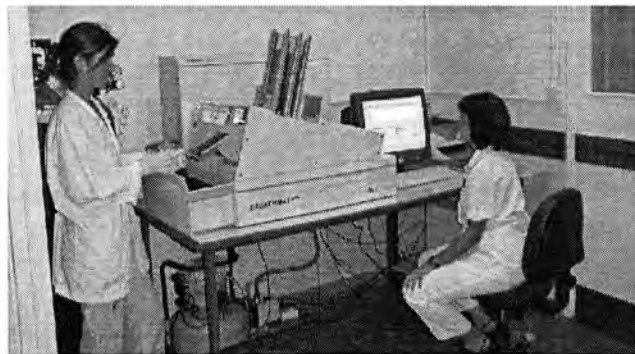


FIGURA 10

Describiremos paso a paso el procedimiento para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* que usa la prueba del aire espirado utilizando <sup>13</sup>C-urea.

La toma de las muestras ha sido descrita con anterioridad (páginas 7 a 9). El proceso de análisis de dichas muestras comienza con su identificación, adhiriendo a los tubos las etiquetas auto-adhesivas que llevan impreso un código de barras. Luego los tubos son colocados en los magazines y estos en el compartimiento (Fig. 11) destinado a ellos en el autosampler. En cada serie de medidas, pueden colocarse 10 magazines con 20 tubos cada uno.

Una vez que el código de barras ha sido leído por el lector laser, el autosampler realiza las maniobras destinadas a que el tubo sea pinchado por la aguja (Fig. 11).

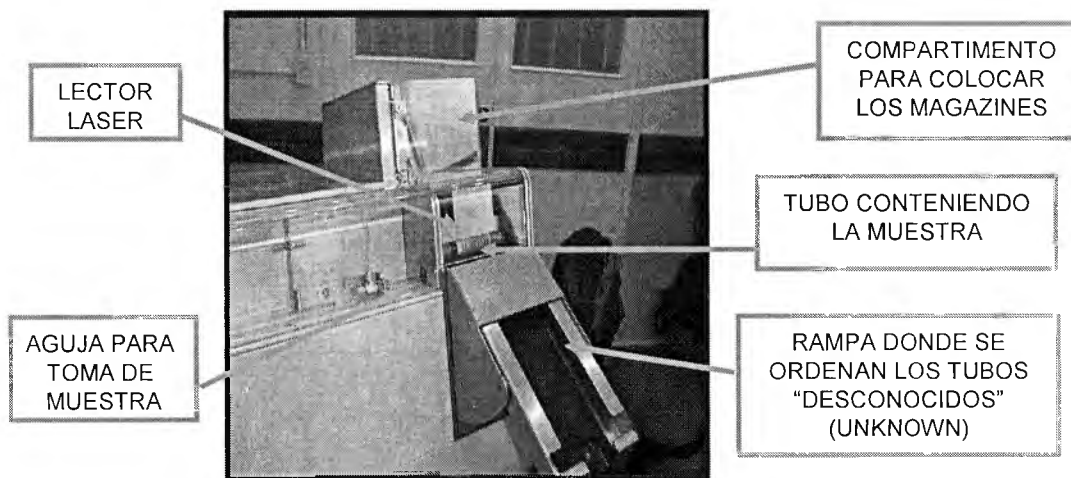


FIGURA 11

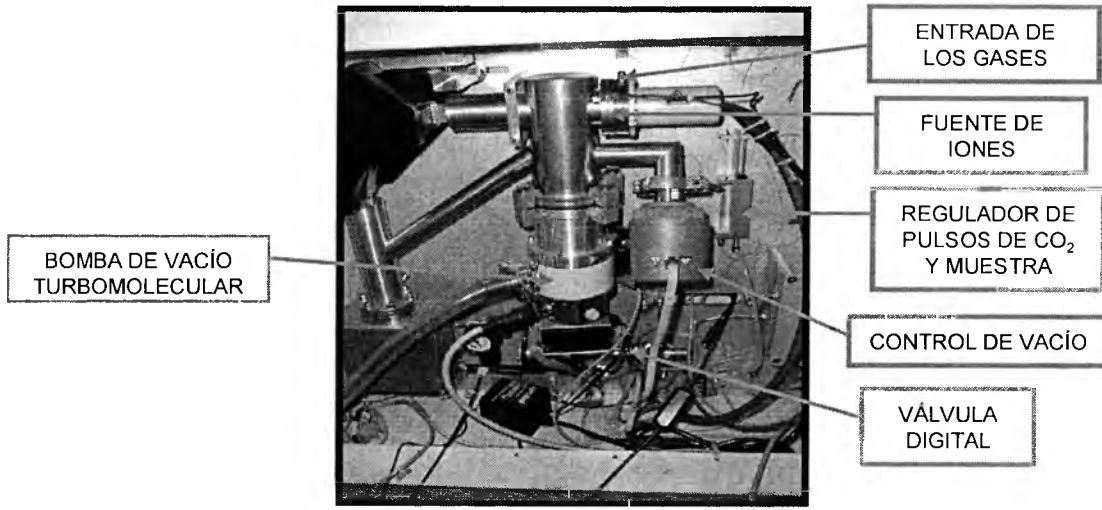


FIGURA 12

La muestra del aire exhalado es desplazada del tubo mediante una corriente de helio que ingresa por la aguja. La aguja tiene dos vías concéntricas. El helio se introduce a través de la vía central, y la muestra de aire espirado ingresa a la aguja por un orificio lateral siendo transportada al IRMS por la misma corriente de helio. Una vez extraída la muestra, el tubo es empujado hacia una caja pero, si por alguna razón, el lector laser no puede leer el código de barras, es derivado a una rampa (Fig. 11) donde quedan ordenados según la secuencia en que las muestras fueron medidas.

La muestra de aire exhalado es llevada por la corriente del helio a una válvula digital (Valco Valve) (Fig. 12) de ocho vías. Esta válvula tiene dos posiciones: "Load" e "Inject" (carga

e inyección). En la posición "carga", la muestra llena un capilar en forma de espiral (loop) de 2 ml de capacidad. El cambio de posición de la válvula a "inyección" hace que todo el contenido del lazo fluya hacia la columna de cromatografía en fase gaseosa (GC) (Fig. 13). Un nuevo cambio de posición lleva a la válvula a la posición de "carga" y, mientras se llena el lazo, existe un flujo alternativo de helio con la columna cromatográfica. Los cambios de posición de la válvula son controlados por el software y ocurren en momentos predeterminados del proceso. El aire exhalado contiene principalmente: oxígeno, nitrógeno, vapor de agua y dióxido de carbono.

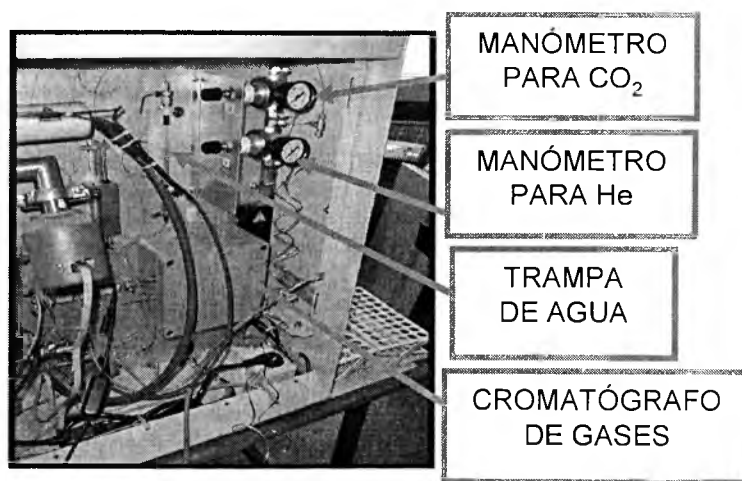


FIGURA 13

Los gases entran en el CG y son separados. Al salir se encuentran con la **trampa de agua**; (Fig. 13) el vapor de agua difunde a través de una superficie de Nafion quedando retenida.

El resto de los componentes llevados por un flujo de helio, pasa ahora a través de un elemento denominado **Standard Injection Device** (Fig. 12) cuya función es alternar la llegada a la fuente de iones, de pulsos de muestra-helio y del gas de referencia.

Los gases penetran en la **fente de iones** (Fig. 12) donde existen condiciones de **alto vacío**, producidos por las **bombas, turbomolecular y rotatoria**, (Fig. 14) que actúan acopladas.

Allí existe un **filamento** de tungsteno que emite electrones que ionizan el CO<sub>2</sub> transformándolo en un ión positivo CO<sub>2</sub><sup>+</sup>.

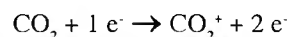
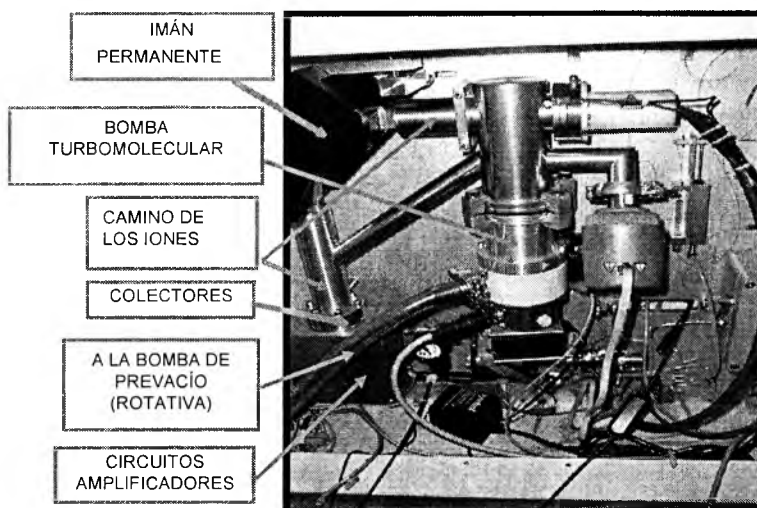


FIGURA 14



Los iones se forman por la colisión entre las moléculas del gas y los electrones emitidos por el filamento por efecto termoiónico. Dos imanes permanentes pequeños dentro de la fuente de iones hacen que dichos electrones describan trayectorias en espiral aumentando la probabilidad de colisión con las moléculas de CO<sub>2</sub>. La emisión de electrones está bajo un estricto control electrónico, para mantener constante la eficiencia de ionización. En la fuente de iones hay un alto vacío, 10<sup>-6</sup> mbar (la presión atmosférica es algo más de 1.000.000.000 veces mayor!!!) que está producido por dos bombas de vacío, una bomba mecánica rotativa (prevacío) y una bomba turbomolecular (alto vacío) conectadas en serie. De esta manera se consigue lograr una trayectoria libre de colisiones no deseadas para los iones.

Los iones de CO<sub>2</sub><sup>+</sup> resultantes, son acelerados en el campo eléctrico producido por una diferencia de potencial de aproximadamente 3000 voltios (potencial de aceleración).

La energía del campo eléctrico producido por esta diferencia potencial se transfiere a los iones y su valor puede ser calculado fácilmente (véase el Anexo 2).

El espectrómetro Finnigan BreathMAT es un IRMS, espectrómetro de masas de sector magnético de baja resolución. No posee selector de velocidad como se describirá en el Anexo 1. Los iones con diferente masa ingresan al campo magnético, con diferentes velocidades describiendo trayectorias con diferentes radios. El IRMS está diseñado para separar iones de relaciones masa-a-carga 44, 45 y 46. Los detectores son colectores de iones llamados **copas de Fara-**

**day** (Fig. 15). Al ser diferentes las abundancias isotópicas se producen corrientes eléctricas de distintas intensidades en cada detector (cup1, cup2 y cup3). Por lo tanto, la ganancia en cada amplificador es optimizada (por el valor del resistor instalado) de modo que los que reciben los iones menos abundantes (correspondientes a las masas 45 y 46) tengan aproximadamente 100 veces más aumento que el que corresponde a la masa 44 (cup 1).

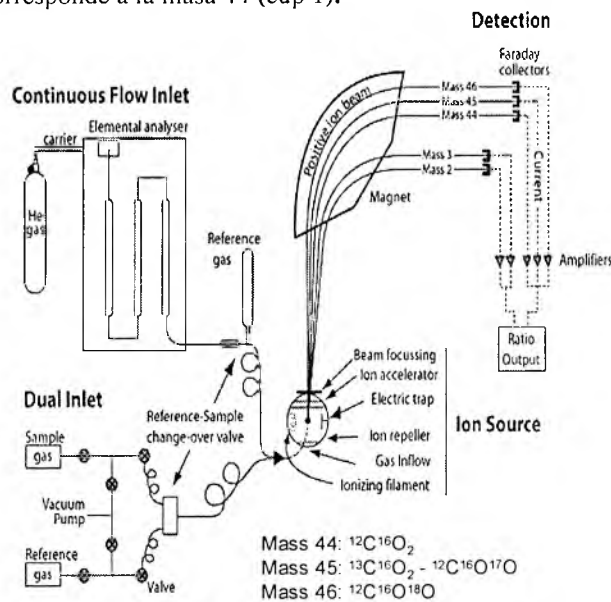


FIGURA 15

### Tratamiento de los datos

Los resultados obtenidos usando IRMS están expresados como una relación de intensidades de corriente eléctrica (la relación  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  se denomina ratio 45 por el software del Breath MAT). La colección simultánea de las especies isotópicas permite establecer las relaciones entre las intensidades originadas por cada una de dichas especies, sin que puedan estar afectadas por variaciones en la cantidad total de iones que llegan a los colectores ya que se determinan relaciones entre las intensidades y no valores absolutos de las mismas. El procesamiento de las medidas que realiza el espectrómetro incluye la comparación de la relación ratio 45 (en realidad 45/44) de la muestra con la relación ratio 45 del  $\text{CO}_2$  de referencia, que posee una composición isotópica conocida de isótopos del carbono y posteriormente con un patrón internacional de composición isotópica conocida de carbono. Los resultados de las comparaciones con el gas de referencia se conocen como "delta" (Del o  $\delta$ ) y se expresan en unidades ‰, por mil. El estándar internacional original, una piedra caliza llamada **Pee Dee Belemnite (PDB)**, se ha agotado en la naturaleza pero se ha definido un nuevo patrón primario (6). Este nuevo estándar se conoce como **Vienna PDB (VPDB)**.

El valor de la relación isotópica del gas de referencia, ratio 45, con respecto al patrón internacional PDB, es ingresado

dentro del software que automáticamente emprenderá una serie de correcciones para evaluar la contribución del  $^{17}\text{O}$  a la masa 45 en el cálculo del Ratio 45/44 (la corrección de Craig, puede encontrarse en un esquema más adelante en la página 15. El resultado calculado como  $\delta^{13}\text{C}$  o Del 13, resulta de comparaciones con el gas de referencia, que luego es comparado con el PDB. El nuevo valor se denomina **Del 13 PDB**. El resultado final de todas las muestras está determinado por la diferencia entre el **Del 13 PDB** de la muestra obtenida luego de la administración de  $^{13}\text{C}$ -urea y el **Del 13 PDB** valor correspondiente a la toma basal. Ese valor es llamado **DOB (Delta Over Baseline)**, diferencia sobre el nivel basal. Los resultados de las pruebas de aire espirado con  $^{13}\text{C}$  pueden ser expresados también en partes por millón (ppm)  $^{13}\text{C}$  y ppm  $^{13}\text{C}$  en exceso (7).

La precisión del análisis se convierte en deficiente cuando la concentración de  $\text{CO}_2$  es más baja que lo deseable. Cuando la corriente de iones disminuye por debajo de un valor mínimo que se predetermina, el programa produce un mensaje de "baja señal". En estos casos deben descartarse los valores de DOB que la planilla entrega automáticamente. Las bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  generalmente resultan de muestras mal recolectadas, pero también puede deberse a una incorrecta colocación de la tapa del Exetainer.

Los resultados de las determinaciones aparecen en una

Tabla 2

Sample	Barcode	Name	Remarks	DOB	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
Basal	52100	NICOLAS		0.0	5.1	-1.6	1.2	0.4	5.5	-22.6	2398
30 min	52100		Positive	47.3	50.7	1.3	1.2	0.4	54.1	24.7	1980
Basal	52130			0.0	4.8	-0.8	1.2	0.4	5.2	-22.9	2478
45 min	52130		Positive	31.3	35.1	4.3	1.2	0.4	37.3	8.4	1664
Basal	52200	ULISES		0.0	7.1	-4.3	1.2	0.4	7.7	-20.5	2502
30 min	52200		Positive	57.2	62.5	8.3	1.3	0.4	66.4	36.7	604
Basal	52230			0.0	7.0	-4.6	1.2	0.4	7.6	-20.5	2414
45 min	52230		Positive	41.6	47.3	-0.7	1.2	0.4	50.5	21.2	2634
Basal	52300	MARCOS		0.0	9.0	-2.1	1.2	0.4	9.7	-18.5	2477
30 min	52300		Negative	1.5	10.5	-1.8	1.2	0.4	11.3	-17.0	2317
Basal	52330			0.0	6.9	-6.9	1.2	0.4	7.6	-20.5	2922
45 min	52330		Negative	2.2	9.2	-2.6	1.2	0.4	9.9	-18.3	2643

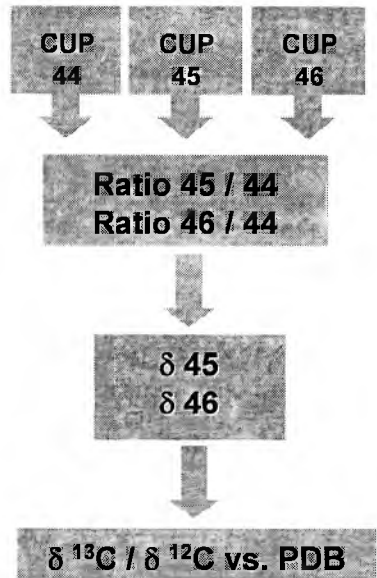
planilla similar (Tabla 2) a la que se muestra a continuación.

El valor de corte del test es el DOB mayor que 3.5, es decir si uno de los valores de DOB de una muestra es mayor que 3,5 el resultado será POSITIVO (8).

Se han ocultado varias columnas y los valores se han redondeado a un decimal a efectos de mostrar las de mayor interés. En la segunda columna aparecen los números que identifican a cada uno de los pacientes. Una señal sonora indica cuando es leído el código de barras; el tubo continúa el proceso mientras el sistema registra el número en la columna

correspondiente. Si la lectura del código de barras no se realiza por alguna causa, la señal no se produce y el exeteiner es derivado a una rampa ordenadora una vez que la muestra ha sido analizada. En la planilla aparecerá la leyenda "Desconocido" (Unknown) seguida de un número que indica el orden de la secuencia en que fue medido. Cuando esto sucede por décima vez en un proceso, éste se detendrá, debido a que la rampa estará colmada. En estos casos las identificaciones de las muestras se introducen en forma manual en el orden dado por la ubicación del tubo en la rampa.

La columna “mV” contiene los valores de la señal originada en el detector de los iones de masa 44 (del isótopo <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>16</sup>O), el más abundante. Estos valores constituyen un control de calidad del proceso de medición pues la señal medida debe ser mayor que un valor umbral predeterminado.



El diagrama muestra la serie de pasos comprendidos en la medida de la relación <sup>13</sup>C / <sup>12</sup>C en la muestra y en el gas de referencia.

**Ratio 45 and 46:** Son relaciones establecidas entre las relaciones de intensidades de corriente originadas por los iones que llegan a los detectores:

$$R_{45/44} = \frac{{}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2 + {}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2} = {}^{13}\text{R}_{45/44} + 2 \cdot {}^{17}\text{R}_{45/44}$$

Los datos expresados bajo la forma de notación δ (delta) son los resultados de las relaciones con el gas de referencia:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[ \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{reference}}} \right) - 1 \right] \cdot 10^3$$

Del 45:  $\delta_{45} = \frac{(\text{ratio } 45 / 44_{\text{sample}} - \text{ratio } 45 / 44_{\text{ref.}})}{\text{ratio } 45 / 44_{\text{ref.}}} \cdot 1000 \text{ (‰)}$

Del 46:  $\delta_{46} = \frac{(\text{ratio } 46 / 44_{\text{sample}} - \text{ratio } 46 / 44_{\text{ref.}})}{\text{ratio } 46 / 44_{\text{ref.}}} \cdot 1000 \text{ (‰)}$

**Del 13:** Es el dato que corresponde a la corrección por la contribución del isótopo <sup>17</sup>O a la señal de la masa 45 en el cálculo de la relación 45/44. La corrección propuesta por Craig incluye dos constantes (Craig A and Craig B), determinadas experimentalmente (9).

$$\delta^{13}\text{C} = \text{CraigA} \cdot \delta_{45} - \text{CraigB} \cdot \delta_{46}$$

$$\delta^{13}\text{C} = 1.0676758 \cdot \delta_{45} - 0.0338362 \cdot \delta_{46}$$

**Controles rutinarios de calidad**

La operación responsable de un IRMS implica la realización en forma regular de controles de calidad rutinarios.

La determinación del pico máximo (peak centre) debe efectuarse para asegurar que la alta tensión (high voltage) en la fuente de iones sea la óptima para que la mayor cantidad de iones lleguen a los detectores.

Otra prueba está dirigida a asegurar la estabilidad de la llegada de los iones a los detectores en un lapso de tiempo. Las relaciones entre las intensidades de corriente eléctrica producidas por los diferentes iones debe mantenerse dentro de determinados límites de variación durante un tiempo predeterminado.

La reproducibilidad se evalúa mediante otra prueba que asegura una precisión aceptable a través de determinaciones realizadas sobre muestras de igual composición isotópica (enriquecimiento cero).

Con menor frecuencia debe realizarse una prueba que controla la linealidad de la respuesta en función de la cantidad de iones. En este caso la variación de las relaciones entre las intensidades de corriente producidas en los detectores (ratio) debidas a diferencias en la cantidad de iones debe mantenerse dentro de límites aceptables.

En el equipo Finnigan BreathMAT, las pruebas rutinarias de control de calidad son:

- 1) High voltage; 2) Time scan; 3) CO<sub>2</sub>zero \_20

**1- High Voltage Scan (Fig. 16)**

Las señales producidas en los detectores (intensidades de corriente eléctrica) son registradas, en un intervalo de 10 voltios en la zona de alta tensión (~3000 voltios), para buscar el voltaje óptimo de aceleración de los iones.

La selección es efectuada automáticamente por el programa debiendo verificarse en el entorno del pico central que la variación de la relación de la señal masa 45 / masa 44 (cup 2/ cup 1) no supere el 1‰ (uno por mil).

Debido a la influencia de la temperatura sobre los componentes electrónicos se aconseja mantener la temperatura ambiente en valores menores que 18°C.

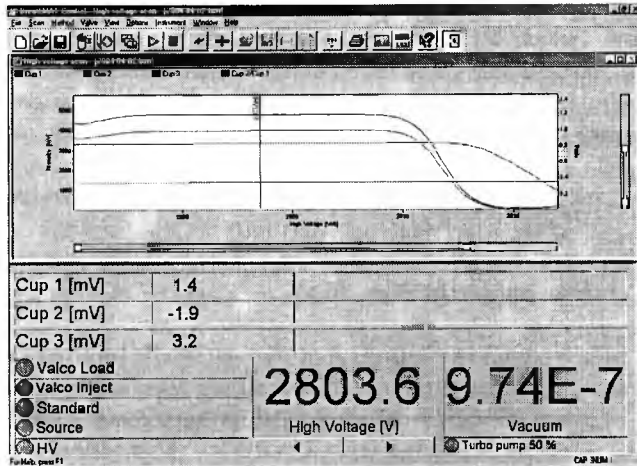


FIGURA 16

2 - Time scan (Fig. 17)

Este control consiste en registrar durante 10 minutos, las señales producidas en los detectores de las masas 44, 45 y 46 al voltaje de aceleración seleccionado anteriormente. En particular, para la señal producida por la relación 45/44 (ratio 45/44) se acepta una variación del 1‰ (uno por mil).

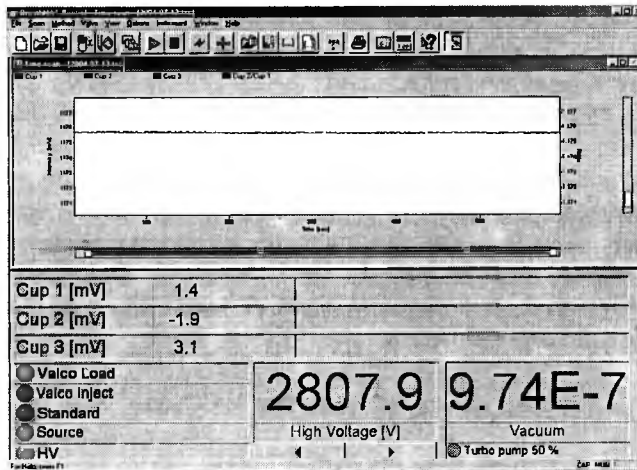


FIGURA 17

3 - CO<sub>2</sub> zero\_20

Consiste en efectuar 20 medidas del gas de la referencia. La desviación estándar de la serie de valores de Del 13 PDB se calcula por medio de una planilla Excel (Tabla 3) y no debe ser mayor que el 0,07‰ (siete centésimos por mil). El propósito de este control es comprobar la reproducibilidad de las determinaciones.

Tabla 3

No.	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
1	-0.16	-0.05	1.18	0.42	-0.17	-28.06	3108.20
2	-0.12	-0.08	1.18	0.42	-0.13	-28.03	3105.40
---							
19	0.00	0.01	1.18	0.42	0.00	-27.90	3076.50
20	0.02	-0.07	1.18	0.42	0.02	-27.88	3143.90
						<b>0.05</b>	

El valor destacado (0.05 ‰) en la tabla al final de la columna Del13 PDB corresponde a la desviación estándar de los 20 valores precedentes. El test es satisfactorio.

**Otros tests de aliento en salud humana**

**Prueba del aire exhalado para el la determinación de vaciamiento gástrico en fase sólida usando 1-<sup>13</sup>C-ácido octanoico**

La prueba del vaciamiento gástrico en fase sólida fue

$$PDRh^{-1} = \frac{VCO_2(\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}) \cdot \text{Enriquecimiento del aire exhalado en } ^{13}\text{CO}_2(\text{Exceso en ppm}) \times 100}{\text{Cantidad de sustrato ingerido (mmol) x enriquecimiento de sustrato (porcentaje de exceso de átomos de } ^{13}\text{C} \cdot 10^4)}$$

Observe que muchos programas de procesamiento de datos de equipos IRMS solo expresan los resultados como notación δ<sup>13</sup>C (7). Como en la prueba del ácido octanoico es más conveniente expresar las dosis del trazador en unidades de fracción de átomo (porcentaje de exceso de átomos o exceso en ppm), es necesario convertir las unidades de enriquecimiento expresadas como Delta (7).

Una pequeña dosis (generalmente 100 µL) de 1-<sup>13</sup>C-ácido octanoico es incorporado en el alimento de prueba (comúnmente yema de huevo) y cocinado. El sujeto se mantiene sentado y en reposo. Se obtiene una muestra de aire basal y luego ingiere la comida de prueba. Se obtiene una serie de muestras de aire durante un período de seis horas. El protocolo completo esta disponible en el sitio Web de SIGN ([www.med.rug.nl/sign](http://www.med.rug.nl/sign)).

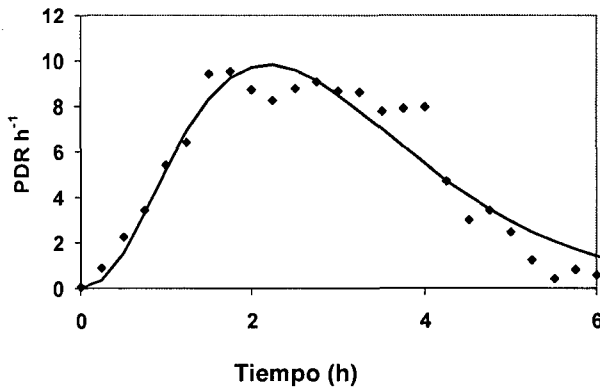
detalladamente descrita por Ghooos y colaboradores (10,11). A diferencia con el UBT, donde los datos se expresan en unidades del enriquecimiento, se ha convenido en convertir los datos de IRMS de la prueba del aire exhalado usando ácido octanoico, en unidades de porcentaje de dosis recuperadas (PDR), donde,

están ampliamente facilitados utilizando hojas de cálculo. Todos los fabricantes de IRMS proveen formatos de salida de datos que pueden ser importadas apropiadamente por planillas de cálculo comerciales como por ejemplo Microsoft Excel.

El resultado del test del aire exhalado con ácido octanoico, el tiempo medio de vaciamiento gástrico, es valioso por ser una medida cinética. Estrictamente hablando, esta información puede ser calculada del gráfico de “enriquecimiento del trazador en función del tiempo” sin tener que convertirlo a PDR. Sin embargo es esencial expresar el resultado en unidades de PDR en ciertas pruebas de aire exhalado (ver abajo).

El estudio anterior fue realizado utilizando un IRMS AP2003 diseñado para el análisis automático de test de aire exhalado con <sup>13</sup>C. Este equipo es fabricado actualmente por GV Instruments, Crewe Road, Wythenshawe, Manchester M23 9BE, UK (tel: +44 (0) 161 9022100; fax: +44 (0) 161 9022198; <http://www.gvinstruments.co.uk>).

**Test del aire exhalado con <sup>13</sup>C-ácido octanoico**



**FIGURA 18**

La Figura 18 muestra la salida de los sólidos en el test del vaciamiento gástrico. El procedimiento de ajuste de una curva propuesto por Ghooos y colaboradores (10,11) revela un tiempo medio de tránsito gástrico de 2.8 horas. Cálculos como estos que involucren el manejo de datos y el ajuste de una curva

**Prueba del aire exhalado para estudiar la insuficiencia de la lipasa pancreática con <sup>13</sup>C - mezcla de triacilglicerol**

Una nueva molécula, mezcla de triacilglicerol (1.3 distearil 2-[1-<sup>13</sup>C]octanoil-glicerol), fue diseñada y desarrollada por Ghooos y colaboradores (12,13), para detectar trastornos de la digestión debidos a una baja secreción de la lipasa pancreática. El producto está disponible comercialmente ([www.isotope.com](http://www.isotope.com)). Para la prueba el triacilglicerol se incorpora en una comida y se consume. Se obtiene una serie de muestras de aire exhalado como en la prueba del ácido octanoico. Cuando el sustrato con <sup>13</sup>C es digerido por completo, las moléculas de ácido esteárico sin marca son removidas de las posiciones sn-1 y sn-2 por la lipasa pancreática. El monoacilglicerol o ácido graso no esterificado que resulta es fácilmente absorbido y transportado al hígado, donde se oxida, liberando <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, que se exhala en la respiración. Pacientes con baja secreción de lipasa pancreática dan una baja recuperación de <sup>13</sup>C en el CO<sub>2</sub> de la respiración (14).

### Test del aire espirado con $^{13}\text{C}$ -triacilglicerol mezcla

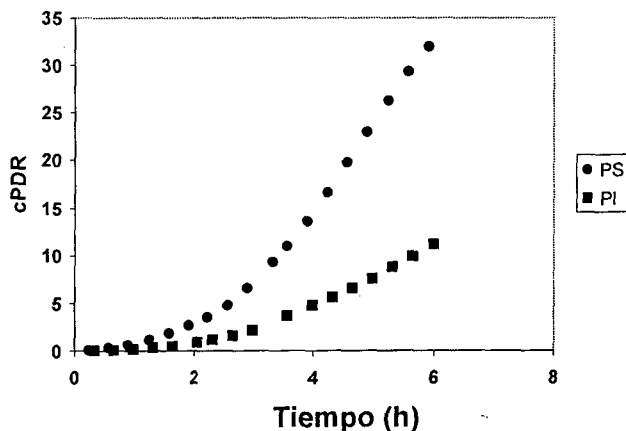


FIGURA 19

La Figura 19 muestra los valores de PDR acumulados (cPDR) en  $\text{CO}_2$  del aire exhalado por niños con fibrosis quística del páncreas luego de realizar el test del aliento con la mezcla de triacilgliceroles (● páncreas normal, PS; ■ insuficiencia pancreática, PI). Este test ha sido aplicado con éxito para calcular la suplementación necesaria de enzimas digestivas en niños con fibrosis quística (15-17). Aquí es esencial una medida exacta del PDR (18).

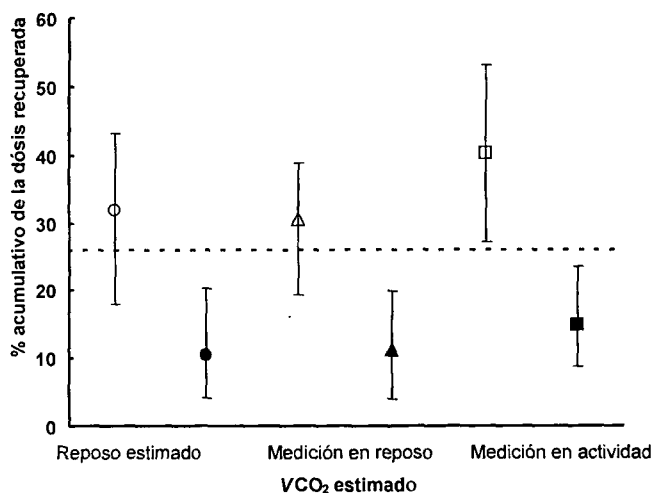


FIGURA 20

La Figura 20 muestra la importancia de obtener estimaciones correctas del  $\text{CO}_2$  producido para proporcionar datos exactos de cPDR. Las estimaciones de  $\text{VCO}_2$ , del ritmo cardíaco en condiciones de esfuerzo, fueron utilizadas para

calcular cPDR durante 6 horas en una prueba de aire exhalado con mezcla de triacilgliceroles. Los símbolos claros son los valores medios de cPDR para pacientes con páncreas normal ( $n = 19$ , mostrados con su rango). Los símbolos oscuros son los cPDR medios de los niños con fibrosis quística, que han recibido la terapia prescrita del reemplazo de la enzima pancreática pero no tomaron el PERT con la comida de prueba ( $n = 5$ , mostrados con su rango). Estos estudios fueron realizados usando un IRMS Europa ABCA diseñado para el análisis automático de las pruebas de la respiración con  $^{13}\text{C}$ . Este IRMS se fabrica actualmente por: SerCon Ltd, Wistaston Road Business Centre, Wistaston Road, Crewe, Cheshire CW2 7RP, UK (Tel: +44-(0)1270-580008; Fax: +44-(0)1270-252310; <http://www.sercongroup.com>)

### AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Organismo Internacional de Energía Atómica por haber apoyado el Curso de Aprendizaje de Hermosillo, por darnos la oportunidad de haber participado y por habernos motivado a realizar este trabajo. Finalmente quisiéramos expresar nuestro aprecio a nuestro anfitrión, el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

### REFERENCIAS

1. Nier AO. A mass spectrometer for routine isotope abundance measurements. *Review of Scientific Instruments* 1940;11,212-216.
2. Preston T & Owens NJP. Interfacing an automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and nitrogen-15 analysis. *Analyst* 1983;108, 971-977.
3. Preston T & Owens NJP. Preliminary  $^{13}\text{C}$  measurements using a gas chromatograph interfaced to an isotope ratio mass spectrometer. *Biomedical Mass Spectrometry* 1985;12, 510-513.
4. Preston T & McMillan DC. Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1988;16, 229-235.
5. Prosser SJ, Brookes ST, Linton A & Preston T. Rapid, automated analysis of  $^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  of  $\text{CO}_2$  in gas samples by continuous-flow, isotope ratio mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 1991;20, 724-730.
6. Coplen TB. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1996;60, 3359-3360.
7. Slater C, Preston T & Weaver LT. Stable isotopes and the International System of Units. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001;15, 1270-1273.
8. Slater C, Preston T, Weaver LT. Is there an advantage in normalising the results of the *Helicobacter pylori* [ $^{13}\text{C}$ ]urea breath test for  $\text{CO}_2$  production rate in children? *Isotopes in Environmental and Health Studies* 2004;40, 89-98.
9. Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1957;12, 133-149.

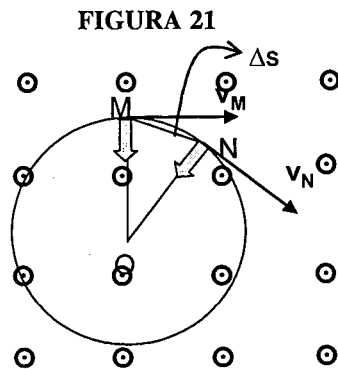
10. Maes BD, Ghos YF, Rutgeerts PJ, Hiele MI, Geypens BJ & Vantrappen G. [<sup>14</sup>C]octanoic acid breath test to measure gastric emptying rate of solids. *Digestive Diseases and Sciences* 1994;39, 104S-106S.
11. Maes BD, Mys G, Geypens BJ, Evenepoel P, Ghos YF & Rutgeerts PJ. Gastric emptying flow curves separated from carbon-labeled octanoic acid breath test results. *American Journal of Physiology* 1998;275, G169-G175.
12. Ghos YF, Vantrappen G, Rutgeerts PJ & Schurmans PC. A mixed-triglyceride breath test for intraluminal fat digestive activity. *Digestion* 1981;22, 239-247.
13. Vantrappen GR, Rutgeerts PJ, Ghos YF & Hiele MI. Mixed triglyceride breath test: a noninvasive test of pancreatic lipase activity in the duodenum. *Gastroenterology* 1989;96, 1126-1134.
14. Amarri S & Weaver LT. <sup>13</sup>C-breath tests to measure fat and carbohydrate digestion in clinical practice. *Clinical Nutrition* 1995;14, 149-154.
15. Amarri S, Harding M, Coward WA, Evans TJ & Weaver LT. <sup>13</sup>Carbon mixed triglyceride breath test and pancreatic enzyme supplementation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 1997;76, 349-351.
16. de Boeck K, Delbeke I, Eggermont E, Veereman-Wauters G & Ghos Y. Lipid digestion in cystic fibrosis: comparison of conventional and high lipase enzyme therapy using the mixed-triglyceride breath test. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1998;26, 408-411.
17. van Dijk-van Aalst K, Van Den Driessche ML, van der Schoor S, Schiffelers S, Van't Westeinde T, Ghos Y & Veereman-Wauters G. <sup>13</sup>C mixed triglyceride breath test: a noninvasive method to assess lipase activity in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2001;32, 579-585.
18. Slater C, Preston T, & Weaver LT. Use of calibrated heart rate monitors to estimate CO<sub>2</sub> production rate during the <sup>13</sup>C-mixed triacylglycerol (MTG) breath test. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 9A. 2003.

## ANEXO 1

Una breve introducción a dos temas básicos de Física, movimiento circular y campo magnético, ayudarán a comprender las razones acerca de la separación de los isótopos en una muestra de aire espirado y la cuantificación de las relaciones isotópicas.

### 1. Movimiento circular

Cuando un ión se mueve en un campo magnético en forma tal que la dirección del vector **velocidad** es perpendicular al vector **inducción magnética**, la trayectoria es una circunferencia.



En la Figura 21 consideramos una carga positiva, en movimiento, en dos puntos M y N de su trayectoria. El campo magnético es perpendicular al papel y sale de la página.

El vector gris representa la **fuerza** que la inducción magnética **B** ejerce sobre la carga eléctrica que se mueve con velocidad **v**. La dirección de la velocidad es **tangente** a la trayectoria en cada punto. Los vectores que entran al papel pueden representarse  $\otimes$  (es la cola de una flecha) y los que salen  $\odot$  (la punta de la flecha).

En lo sucesivo cuando aparezca la magnitud en **negrita**, estaremos refiriéndonos a un vector; en cambio la magnitud en letra normal refiere al módulo o intensidad de ese vector.

Esta situación puede compararse al movimiento de una piedra atada con una soga. La piedra se mantiene en una trayectoria circular mientras exista la tensión en la cuerda. Si la cuerda se rompe, la piedra se moverá en una trayectoria rectilínea con una dirección coincidente con la que tenía el vector velocidad en el momento de cortarse la cuerda.

En el caso de la piedra las fuerzas son de **contacto**, las transmite la cuerda; en el espectrómetro de masa las fuerzas se ejercen a **distancia**.

En la Figura 21 los vectores  $\mathbf{v}_M$  y  $\mathbf{v}_N$  representan las velocidades tangenciales instantáneas en M y N respectivamente.

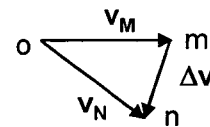
Se define la **velocidad tangencial** como el cociente entre el arco recorrido y el tiempo empleado en recorrerlo; en forma

más rigurosa debemos decir que es el límite del cociente entre  $\Delta s$  y  $\Delta t$  cuando  $\Delta t$  tiende a cero. En estas circunstancias el arco puede considerarse de la misma longitud que  $\Delta s$ , por lo que toma sentido la primera definición.

La letra griega  $\Delta$  se usa para simbolizar el "incremento de" la variable que la sigue. Reemplaza a la diferencia entre el valor que toma la variable al final y el que posea al inicio del intervalo considerado.

Si trasladamos a los vectores que representan las velocidades a un origen común podremos hallar el vector diferencia ( $\Delta \mathbf{v}$ ) entre  $\mathbf{v}_M$  y  $\mathbf{v}_N$  (Figura 22).

Figura 22



Para que se comprenda, podemos presentar a la diferencia entre vectores como una suma entre  $\mathbf{v}_M$  y  $\Delta \mathbf{v}$ . Entonces:

$$\mathbf{v}_M + \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N \quad \text{resultando} \quad \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N - \mathbf{v}_M$$

Conceptualmente, el cambio de la velocidad ( $\Delta \mathbf{v}$ ) en función del tiempo es la aceleración. Si consideramos el punto N cada vez más próximo a M, con el tiempo tendiendo a cero será:

$d\mathbf{v}/dt = \mathbf{a}$  la dirección y sentido de **a** serán iguales a los de **dv**

Cuando los puntos M y N son suficientemente próximos, el  $\Delta \mathbf{v}$  se hace perpendicular a **v** y por lo tanto también la aceleración **a**.

Es decir que la aceleración en cada punto de la trayectoria tiene una dirección que coincide con el radio y el sentido es hacia el centro.

Por ello se denomina **aceleración centrípeta** y como la relación con la fuerza es la masa del cuerpo (signo positivo), obviamente la fuerza que produce esa aceleración coincide en dirección y sentido, la marcamos con gris (Figura 21), y se llama **fuerza centrípeta**.

Esta fuerza es responsable del cambio de dirección de la velocidad tangencial.

Podemos notar que los efectos de las fuerzas pueden traducirse en cambios de la velocidad que no se refieran a su módulo. Para eso se requiere que la fuerza tenga una componente en la dirección de la velocidad y no es el caso.

La velocidad tangencial es una magnitud que caracteriza el movimiento circular. Es muy simple inferir que esta

velocidad tangencial es fuertemente dependiente del radio (distancia a la que se encuentra el móvil del centro de la circunferencia). Es necesario encontrar la relación matemática entre esas variables.

Cuando un cuerpo gira alrededor de un punto, en un tiempo dado "barre" un ángulo.

En el movimiento circular los ángulos se miden en "radianes". Se define un ángulo como igual a 1 (uno) radián cuando subtiende un arco que tiene una longitud igual al radio. Así, a un ángulo de 360° le corresponde un arco igual a la longitud de la circunferencia.

O sea si queremos establecer la equivalencia entre el sistema sexagesimal y el radián podemos tomar en cuenta esa relación y dado que medir es comparar con la unidad debemos referir el arco (la longitud de la circunferencia), al valor del radio.

$$360^\circ \text{ equivale a } \frac{2 * \pi * R}{R} = 2 * \pi$$

y dado que el cociente entre una longitud y otra longitud carece de unidad, el radián es en realidad un número, aunque a veces suele aparecer la palabra radianes para referirse al sistema en que estamos trabajando.

Por ejemplo un ángulo de 45° expresado en radianes es:  $\pi / 4$

Otra magnitud que caracteriza el movimiento circular es la velocidad angular. Se la representa por  $\omega$ .

Se define como el ángulo barrido (expresado en radianes) en un tiempo dado.

Supongamos que el ángulo "barrido" entre M y N de la Figura 1 sea  $\theta$ :

$\omega = \theta / t$  la unidad de  $\omega$  es  $s^{-1}$ , ¡ojo!,  $\theta$  medido en radianes)

La velocidad angular  $\omega$  es un vector. La expresión anterior permite el cálculo del módulo del vector. La dirección es perpendicular al plano de la trayectoria, pasa por el centro de la misma y el sentido está dado por las reglas del cálculo vectorial. Más adelante, cuando hablemos de campo magnético, se encuentra desarrollado detalladamente cómo se determina el sentido en estos casos.

Indudablemente la velocidad angular está relacionada con la velocidad tangencial ( $v$ ).

La velocidad tangencial no es otra cosa que el camino recorrido (un arco) en un cierto tiempo.

$$v = \text{arco} / t \quad (1)$$

¿cómo se mide la longitud de un arco?

Por lo que hemos dicho, al arco le corresponde un cierto ángulo, que medimos en radianes.

Si el ángulo es  $\theta$  podemos establecer esta proporcionalidad:

$$\frac{\text{arco}}{\theta} = \frac{2 * \pi * R}{2 * \pi}$$

Simplificando:  $\text{arco} / \theta = R \Rightarrow \text{arco} = \theta . R$

Reemplazando en (1):  $v = \frac{\theta * R}{t}$

y como  $\theta / t = \omega \quad v = \omega . R$

Se interpreta que la velocidad tangencial es directamente proporcional al radio de la trayectoria.

Así, por ejemplo, cuando gira una fila de soldados, el que se encuentra en el centro de giro casi permanece en el lugar (velocidad tangencial casi cero) pero el del extremo distal tiene que moverse muy rápido para que no se pierda la línea. Sin embargo el ángulo que describen es el mismo, es decir ambos tienen la misma velocidad angular.

En las Figuras 21 y 22 los triángulos OMN y omn son semejantes, porque son isósceles y los ángulos que forman los lados iguales entre sí son iguales (dos triángulos son semejantes cuando los ángulos son iguales y los lados homólogos son proporcionales).

Entonces:  $\frac{\Delta s}{R} = \frac{\Delta v}{v} \Rightarrow \Delta v = \frac{v * \Delta s}{R}$

$$a = \Delta v / t \Rightarrow a = \frac{v * \Delta s}{R * t} \text{ pero } \Delta s / t = v$$

$$\text{resulta: } a = \frac{v * v}{R} \text{ y } a = v^2 / R \quad (2)$$

La expresión (2) será utilizada a continuación.

## 2.- Campo magnético

La fuerza de origen magnético es directamente proporcional a la carga del ión, a su velocidad y al campo magnético de inducción magnética  $B$ .

La expresión matemática que permite calcular la fuerza es:

$$F = q . (v \times B)$$

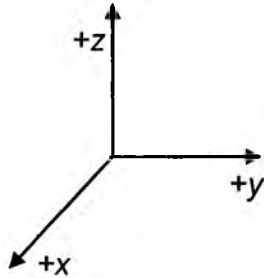
$v \times B$  es el producto vectorial de ambos vectores. Por ello es un vector.

El módulo del vector F es:  $F = q . v . B . \text{sen } \varphi$

siendo  $\varphi$  el ángulo que forman los vectores entre sí.

En el caso del espectrómetro de masa,  $v$  y  $B$  son perpendiculares y  $\sin \phi = 1$

Por definición de producto vectorial, la dirección del vector  $F$  es perpendicular al plano que determinan  $v$  y  $B$ .



El sentido de  $F$  queda determinado al operar matemáticamente. Asignando a cada uno de los vectores  $v$  y  $B$  los sentidos de los ejes coordenados cartesianos  $+x$  e  $+y$ , respectivamente, resulta para  $F$  el sentido  $+z$ .

En forma práctica el sentido de  $F$  queda determinado por una regla denominada “de la mano derecha”.

El vector  $B$  “sale” de la palma de la mano derecha, los dedos (menos el pulgar) deben apuntarse en el sentido de la velocidad. Separando el pulgar en ángulo recto con el resto de los dedos, el mismo apunta en el sentido de la fuerza si el ión es positivo. Si en cambio la carga fuese negativa el sentido de la fuerza será opuesto al que apunta el pulgar.

Hay otras formas “más familiares”. Si se vuelca (gira)  $v$  sobre  $B$  (en un ángulo menor que  $90^\circ$ ), el sentido en que avanzaría un sacacorchos o un tornillo de rosca derecha daría el sentido de  $F$ .

De todo esto resulta que en el momento en el que un ión penetra en un campo magnético en forma perpendicular al mismo, comienza a actuar una fuerza perpendicular a la velocidad que hace que cambie su dirección de forma tal que describe una trayectoria circular.

Cuando el ión abandona el imán cesa la fuerza magnética y entonces el ión sigue con una trayectoria rectilínea llegando a la zona de recolección de los iones.

El módulo de la fuerza es  $F = q \cdot v \cdot B$

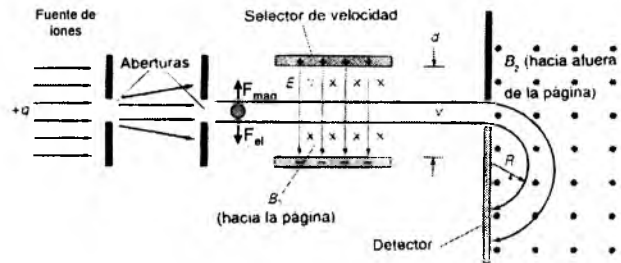
También  $F = m \cdot a \Rightarrow m \cdot a = q \cdot v \cdot B$  y como en este caso la fuerza es la fuerza centrípeta, la aceleración es la centrípeta.

De acuerdo a (2)  $a = v^2 / R$

$$\text{resulta } \frac{m \cdot v^2}{R} = q \cdot v \cdot B \Rightarrow \frac{m \cdot v}{q \cdot B} = R \Rightarrow R = \frac{v}{q \cdot B} m$$

¿Cómo se lee esta ecuación? El radio que describe el ión en un campo magnético depende de cuatro variables: la velocidad ( $v$ ), la carga ( $q$ ), la inducción magnética  $B$  del campo magnético y la masa ( $m$ ) del ión.

Dos de estas variables, la carga ( $q$ ) y la inducción magnética ( $B$ ) son similares para todos los iones. La Figura muestra un esquema de un espectrómetro de masa que cuenta con un **selector de velocidad**. Este dispositivo permite que ingresen a la zona de acción del imán del espectrómetro sólo los iones que poseen determinado valor de velocidad.



Los iones producidos en la fuente de iones, son acelerados y penetran a una zona donde interactúan, un campo eléctrico ( $E$ ), que ejerce una fuerza eléctrica ( $F_{el}$ ) sobre el ión en un sentido (hacia abajo), y un campo magnético, perpendicular al campo eléctrico y a la velocidad del ión, que ejerce una fuerza magnética ( $F_{mag}$ ) en sentido opuesto a la anterior. El campo eléctrico  $E$  es producido por dos placas conductoras sometidas a una diferencia de potencial  $V$  y separadas por una distancia  $d$ .

Escribamos las ecuaciones correspondientes:

$$\left. \begin{aligned} F_{el} &= q \cdot E \Rightarrow F_{el} = q \cdot V/d \\ F_{mag} &= q \cdot v \cdot B \end{aligned} \right\} v = V / B \cdot d$$

Debido a que estas fuerzas  $F_{el}$  y  $F_{mag}$  son opuestas, si sus módulos fuesen iguales los iones con velocidad  $v$  tendrían un movimiento rectilíneo uniforme.

Los iones con velocidad mayor que  $V/B \cdot d$  se desplazarán según el sentido de la fuerza magnética y si la velocidad fuese menor que ese valor lo harán en el sentido de la fuerza eléctrica. En estos dos casos no pasarán por un diafragma ubicado geoméricamente en la trayectoria de los iones que poseen velocidad  $v$ .

Dado que los compuestos isotópicos sólo difieren en su masa nuclear, una mezcla de isótopos que poseen la misma carga eléctrica, la misma velocidad y se mueven en una zona de igual inducción magnética describirán trayectorias circulares de diferente radio.

Esta es la razón que hace a la espectrometría de masas el método de elección para determinar la composición isotópica de un elemento en una muestra.

**ANEXO 2**

La energía de los iones puede calcularse considerando que la carga eléctrica de los iones se debe a la pérdida de un electrón y siendo la carga del electrón de  $-1.601864 \cdot 10^{-19}$  coulomb, resulta:

$$\text{energía} = q \cdot V \Rightarrow \text{energía} = 1.601864 \cdot 10^{-19} \text{ C} \cdot 3000 \text{ V}$$

$$\text{energía} = 4.805592 \cdot 10^{-16} \text{ J}$$

Esta energía se transfiere como energía cinética a los iones producidos en la fuente de iones.

Calcularemos las velocidades que alcanzan los diferentes isótopos  $\text{CO}_2^+$ :

En general:  $E_{\text{cin}} = m \cdot v^2 / 2$

$$v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2 \cdot 4.805592 \cdot 10^{-16} \text{ J}}{N \cdot 1.67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}}} \Rightarrow v = \frac{758067.677 \text{ m}}{\sqrt{N} \text{ s}}$$

Reemplazando N por los valores de masa 44, 45 y 46 (expresan el número de nucleones) resultan los siguientes valores de velocidad:

$$V_{44} = 114.283,0023 \text{ m/sec}; V_{45} = 113.006,0572 \text{ m/sec} \text{ y } V_{46} = 111.770,982 \text{ m/sec}$$

Los cálculos fueron realizados asignando el valor de  $1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$  a la masa del nucleón (protones y neutrones). Estrictamente existe una diferencia a favor del protón pero la misma no fue considerada en este caso.

Tampoco fue considerado el aporte de la masa de los electrones de los iones debido a que se estimó que no afectaba a los resultados.

Los valores de velocidad se encuentran alrededor de los 400.000 km/h.

**ANEXO 3**

Para calcular los radios, primero deducimos una ecuación general y luego la aplicaremos a cada isótopo.

$$E_{\text{cin}} = \frac{1}{2} m v^2 \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \text{ y como } R = \frac{m v}{q B}$$

resulta

$$R = \frac{m}{q B} \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{m^2 2 q V}{q^2 m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2 m V}{q}}$$

$$\Rightarrow R = \frac{1}{0,47 \text{ Tesla}} \sqrt{\frac{2 \cdot N \cdot 1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg} \cdot 3000 \text{ V}}{1,601864 \cdot 10^{-19} \text{ C}}}$$

donde: Tesla: es la unidad de medida de la intensidad de campo magnético

N: número de nucleones

masa de 1 (un) nucleón:  $1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

diferencia de potencial de aceleración de los iones:

$V = 3000 \text{ V}$

intensidad del campo magnético:

$B = 4700 \text{ Gauss} = 0,47 \text{ Tesla}$

carga elemental:  $q = 1,601864 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

realizando las operaciones nos queda:

$$\Rightarrow R = \frac{7,9148606 \cdot 10^{-3} \text{ m}}{0,47} \cdot \sqrt{N}$$

Ahora resta simplemente reemplazar a N por los valores 44, 45 y 46.

$$R_{44} = 0,1117 \text{ m} \quad R_{45} = 0,1130 \text{ m} \quad R_{46} = 0,1142 \text{ m}$$

Estos valores son coherentes con la geometría del imán que posee el espectrómetro.

Todo el desarrollo anterior puede resumirse a través de la ecuación:

$$\frac{m}{q} = \frac{B^2 \cdot R^2}{2 \cdot V}$$

que expresa adecuadamente las condiciones del espectrómetro.

En esta expresión los valores de la carga eléctrica de los iones q, el potencial acelerador V y la inducción magnética B son los mismos para todos los isótopos. Por ello los radios R de las trayectorias, dependerán de la masa m del ión (que puede calcularse como el valor de la masa de un nucleón multiplicada por el número de nucleones). Además el valor de B es fijo y V resulta de la selección del voltaje pico.



## PROLOGUE

This report seeks to answer some of the questions raised during the practical training course organized within the framework of ARCAL-RLA-6042-IAEA project "Early diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of nuclear techniques" undertaken in Hermosillo, México, during the first week of November 2003. We include some general aspects of *Helicobacter pylori* infection as well as the current method for the determination of  $^{13}/^{12}\text{CO}_2$  ratio in exhaled air to detect the presence of this bacterium in the gastric mucosa, the Urea Breath Test ( $^{13}\text{C}$ -UBT). We hope that this manual will be useful and understandable for the interested reader. Any doubts suggestions, corrections and questions will be welcomed and answered with pleasure.

The authors



## The usefulness of stable isotopes in nutrition and human health: the application of mass spectrometry and <sup>13</sup>C-breath tests to detect *Helicobacter pylori* infection

Barrado A.<sup>1</sup>, Preston T.<sup>2</sup>, Slater C.<sup>3</sup>, Zubillaga M.<sup>1</sup>, Miranda-da-Cruz B.<sup>4</sup>, Mokhtar N.<sup>4</sup>, Zednik M.<sup>5</sup>,  
Valencia M.E.<sup>6</sup> and Boccio J.<sup>1</sup>

**SUMMARY.** The interest in *Helicobacter pylori* has escalated in recent years. *H. pylori* may produce a chronic gastric infection which is usually life-long and many epidemiological studies have shown that this is the most common bacterial infection throughout the world involving 50% of the world population. Thus, it is clear that the diagnosis of *H. pylori* infection represents at least a key step in the management of many of the patients referred to the gastroenterologist. Additionally, due to the wide range and relevance of pathologies possibly related to this infection, from micronutrient malnutrition and co-infections to malignancies, there is the potential for *H. pylori* to be a major health problem. Improved methods for the diagnosis and follow up treatment of the infection have been developed. Use of stable isotopes as non-invasive and safe diagnostic methods, namely (<sup>13</sup>C) breath tests, has been the key to a new era of research in *H. pylori* epidemiology and diagnosis as well as the establishment of eradication therapies. This non-invasive nuclear technique, that is considered the gold standard for the diagnosis of this bacterial infection, has successfully been standardized and implemented along Latin America. Taking into account the high prevalence of this bacterial infection, the impact of this technique in the whole region is very high. In this article we discuss several aspects of this methodology in order to harmonize the application of this method in developing regions.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, UBT, diagnosis, stable isotope, mass spectrometry.

**RESUMEN.** Utilidad de los isótopos estables en salud humana y nutrición: espectrometría de masas y test de aliento con <sup>13</sup>C-urea aplicados a la detección de infección por *Helicobacter pylori*. El interés en investigación en el área de *Helicobacter pylori* se ha incrementado en los últimos años. La infección por *H. pylori* puede producir gastritis crónica a lo largo de toda la vida. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que esta infección bacteriana es la de mayor prevalencia en el mundo, afectando el 50% de la población mundial. Así, es claro que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* representa un paso clave en el manejo de los pacientes que acuden al gastroenterólogo. Así mismo, debido al amplio rango de patologías relacionadas con la infección por esta bacteria que van desde la deficiencia de micronutrientes a procesos neoproliferativos, demuestran el potencial efecto nocivo que puede provocar la infección por *H. pylori* en la salud humana. En los últimos años se han mejorado significativamente los métodos de diagnóstico. El uso de isótopos estables, especialmente los denominados prueba del aire exhalado, como métodos seguros y no invasivos, han sido un paso clave en una nueva era de investigación dedicada al diagnóstico como así también en la elección de las terapias de erradicación para *H. pylori*. Esta técnica nuclear no invasiva, que actualmente es considerada método de referencia para la determinación de la infección por *H. pylori*, ha sido exitosamente implementada en América Latina. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la infección por *H. pylori*, el impacto de la implementación de esta metodología en la región es muy alto. En este artículo se discute en forma detallada los aspectos de esta metodología para armonizar la aplicación de este método diagnóstico en las regiones en vías de desarrollo.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, UBT, diagnóstico, isótopos estables, espectrometría de masas.

### INTRODUCTION

The interest in *Helicobacter pylori* has escalated in recent years. *H. pylori* may produce a chronic gastric infection which is usually life-long and many epidemiological studies have shown that this is probably one of the most common bacterial infections throughout the world involving 50% of the world population. Thus, it is clear that the diagnosis of *H. pylori* infection represents at least a key step in the management of many of the patients referred to the gastroenterologist.

<sup>1</sup>Stable Isotope Laboratory Applied to Biology and Medicine. Physics Department. School of Pharmacy and Biochemistry. University of Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Stable Isotope Biochemistry Laboratory. Scottish Universities Environmental Research Centre. East Kilbride. Glasgow. United Kingdom.

<sup>3</sup>University of Glasgow. Division of Developmental Medicine. Yorkhill Hospitals. Glasgow. United Kingdom.

<sup>4</sup>Section of Nutritional and Health-Related Environmental Studies. Division of Human Health. International Atomic Energy Agency. Vienna. Austria.

<sup>5</sup>Latin-American Section. Department of Technical Cooperation. International Atomic Energy Agency. Vienna. Austria.

<sup>6</sup>Research Center for Food and Development. Hermosillo. Mexico.

Additionally, due to the wide range and relevance of pathologies possibly related to this infection, from micronutrient malnutrition and co-infections to malignancies, there is the potential for *H. pylori* to be a major health problem. Improved methods for the diagnosis and follow up treatment of the infection have been developed. Use of stable isotopes as non-invasive and safe diagnostic methods, namely [<sup>13</sup>C] breath tests, has been the key to a new era of research in *H. pylori* epidemiology and diagnosis as well as the establishment of eradication therapies.

### ***Helicobacter pylori***

*H. pylori* is a Gram-negative, spiral shaped, microaerophilic bacterium isolated from human gastric mucosa that produces large amounts of urease, an enzyme that hydrolyses urea into carbon dioxide and ammonia.

There are two identified patterns of infection for *H. pylori*. In the first instance, developing countries have a large proportion of children infected during early life and almost all adults are colonised. Studies showed a prevalence of approximately 13-70% in subjects between 0-20 years of age and 70-94% in those older than 30. The second pattern is characterized by the increase in the prevalence of *H. pylori* infection from 20 years onwards, and it is typical of developed countries with values of 5-15% prevalence in children and 20-60% in individuals between 30-75 years of age. Thus, it is accepted that *H. pylori* infection is disseminated worldwide, with an average prevalence of 50%. There is also an inverse relationship between the prevalence of the infection and the socioeconomic status of the population concerned.

This bacterium may produce chronic antral gastritis, peptic ulcer and is associated with stomach cancer. *H. pylori* carriers are up to 15 times more likely to develop duodenal ulcers than *H. pylori* negative individuals. The predominant infections and concomitant inflammation in duodenal and gastric ulcers tend to occur in the antrum and corpus, respectively. The most convincing evidence that *H. pylori* is a key pathogen in peptic ulcer disease is the observation that its eradication dramatically reduces the ulcer recurrence rate. The hypothetical cascade of events in the pathogenesis of duodenal ulcer initiates with the infection causing inflammation in the mucosa. This leads to alterations of regulatory hormones with the net effect of acid hypersecretion. The duodenal mucosa reacts to acid hypersecretion with the formation of gastric metaplasia, which in turn allows *H. pylori* to colonize the duodenum. The final event of mucosal breakdown is caused by several facultative factors. In the long time interval between initial infection and the occurrence of intestinal-type gastric carcinoma, data suggest that *H. pylori*-associated chronic gastritis evolves through atrophy, intestinal metaplasia and dysplasia. Many factors involved in *H. pylori* virulence have been studied in

detail, including urease, the vacuolating cytotoxin (Vac A), the product of cytotoxin-associated gene A (Cag A), the neutrophil-activating protein (NapA) and lipopolysaccharide. Bacterial adhesion to the mucosal surface is an initial important step for colonization and infection. On the other hand, it is widely accepted that *H. pylori* adheres to receptors in the gastric epithelium by means of specific adhesins. This is a topic worthy of further investigation to clarify mechanisms of *H. pylori* colonization and the possibility of developing new strategies for treatment.

*H. pylori* has also been linked to micronutrient malnutrition. Even though nutrient absorption does not take place in the stomach, this organ contributes to the process by means of the secretion of hydrochloric acid and enzymes, which during the digestive process, help not only to release the micronutrients from the food matrix but also, in the case of the essential minerals, to render them soluble. Achlorhydria (a decrease of hydrochloric acid secretion) occurs in 40-50% *H. pylori* infected patients. A consequence of which is poor absorption of micronutrients, which may compromise the nutritional status of infected individuals provoking the appearance of deficiency symptoms.

### **Stables isotopes in nutrition and metabolic research**

Nuclear techniques have been used to determine dynamic aspects of metabolism in both animals and humans. Isotopes can be radioactive or stable, and the latter allows the use of them in vulnerable groups, such as pregnant women and children where radioactive isotopes may have an unacceptable medical risk. The global nutrition community has recognized the significance of isotope techniques, especially utilizing stable isotopes, as providing accurate and non-invasive methods for measuring nutrient assimilation, nutrient status and related metabolism. As investigative tools, stable isotopes are now seen to be invaluable, since there is virtually no health risk involved in their use. They are therefore preferred for work in humans, especially infants and pregnant women. They can be administered either orally or intravenously and when incorporated into metabolic products, such as body water, urea or CO<sub>2</sub>, they can be easily sampled in saliva, milk, breath, urine and stool.

<sup>13</sup>C breath tests are based on the delivery of a <sup>13</sup>C-labelled substrate into the body by oral ingestion or by injection. A specific enzyme in the target tissue then selectively metabolizes the substrate such that the tracer is irreversibly released as <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> into the body's bicarbonate pool. The tracer is then transported by the circulation and exhaled in the breath. The pattern of breath <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> enrichment over time can be measured. The isotope analysis can be performed by isotope-ratio mass spectrometry (IRMS).

$^{13}\text{C}$ -breath tests are mainly used as research tools, but they can be applied successfully in less privileged countries, as they are simple to perform and can be reliably used to evaluate gastrointestinal function. The test can be presented in a kit, which can be used in all members of the population. Breath samples can be stored unaltered in economical collection tubes (e.g., Exetainers) for up to six months before being sent to a centralized analytical laboratory by standard mail.

The urea breath test to detect the presence of *H. pylori* in the stomach is the simplest breath test. The high urease activity by *H. pylori* has facilitated the development of diagnostic methods using either  $^{14}\text{C}$ -urea or  $^{13}\text{C}$ -urea, which are hydrolysed to labelled  $\text{CO}_2$  and exhaled. These methodologies have the advantage of representing the whole stomach surface and of being non-invasive. Until now, several invasive endoscopic methods have been used in the diagnosis of the gastric infection by *H. pylori* including histology, culture, rapid urease test and polymerase chain reaction. None of these can be considered a reference method since samples obtained by endoscopy are focal in nature and do not represent the whole stomach surface.

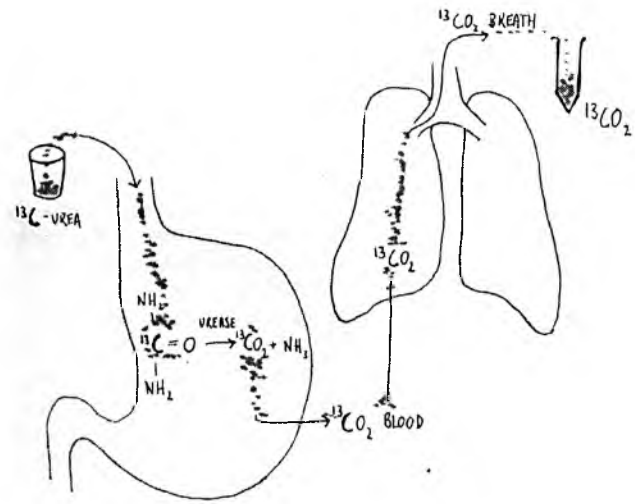
In this report, we will describe and discuss some methodological aspects related to the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by mass spectrometric analysis of the  $^{13}/^{12}\text{CO}_2$  ratio in exhaled breath.

### $^{13}\text{C}$ -urea breath test ( $^{13}\text{C}$ -UBT)

The  $^{13}\text{C}$ -urea breath test is used to diagnose *H. pylori* infection. In this test,  $^{13}\text{C}$ -urea is administered orally in a test meal (commonly natural orange juice), and urease secreted by *H. pylori* in the stomach acts hydrolyses urea to release  $^{13}\text{CO}_2$ .  $^{13}\text{CO}_2$  then enters into the body's bicarbonate pool and is excreted in breath. Breath  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment can be measured by IRMS. An increase in breath enrichment of  $^{13}\text{CO}_2$  within 45 minutes of the ingestion of  $^{13}\text{C}$ -urea is indicative of the presence of *H. pylori* in the gastric mucosa.

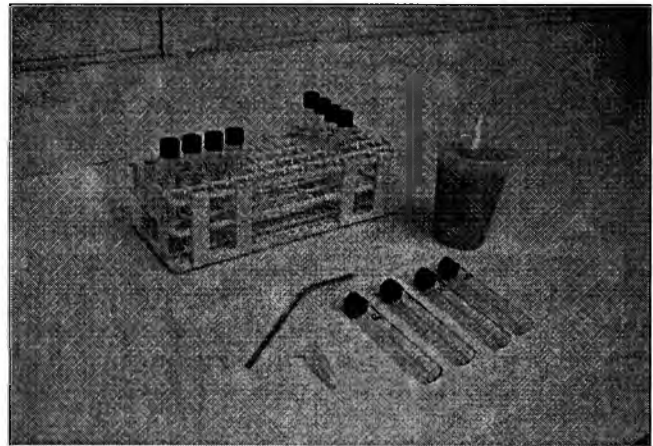
### Methodology as performed in Latin America

- Fasting for 6 hours.
- Basal samples in duplicate.
- Intake of 50-100 mg of  $^{13}\text{C}$ -urea in test meal (natural orange juice).
- Breath samples at 30 and 45 min after  $^{13}\text{C}$ -Urea intake.
- Measurement of the breath samples by IRMS.



**Materials:** (Fig. 1) A few materials are needed to perform the test, they are:

- 50-100 mg of  $^{13}\text{C}$ -urea.
- Test meal: natural orange juice.
- Straw
- Four Exetainers: two for the basal samples (red cap) and two for 30 and 45 minutes post  $^{13}\text{C}$ -urea intake (blue cap).



**FIGURE 1**

**Addition of the  $^{13}\text{C}$ -urea into the test meal (Fig. 2).**

The  $^{13}\text{C}$ -urea is easily dissolved in the test meal by stirring. It does not alter the taste of the meal.



FIGURE 2

**Teeth brushing (Fig. 3).**

Teeth should be cleaned before ingestion of the  $^{13}\text{C}$ -urea test meal to decrease the potential interference of bacteria in dental plaque.

It should be done without toothpaste, using only water.



FIGURE 3

**Basal breath samples (Fig. 4),**

Basal breath samples should be taken in duplicate to determine the basal  $^{13}/^{12}\text{CO}_2$  ratio using the Exetainer with red cap.

Breath should be sampled by blowing through a straw into the Exetainer



FIGURE 4

 **$^{13}\text{C}$ -urea- test meal intake (Fig. 5).**

The whole test meal containing the  $^{13}\text{C}$ -urea dose must be taken.



FIGURE 5

**Teeth brushing (Fig. 6).**

Teeth should be brushed after consumption of the  $^{13}\text{C}$ -urea test meal to wash out any residual  $^{13}\text{C}$ -urea in the oral cavity where bacteria may show urease activity, which would interfere with the test. Clean teeth without using toothpaste. Use only water.



FIGURE 6

**30 minute breath sample (Fig. 7).**

Use the Exeteiner with the blue cap.

Breath should be sampled by normal-deep breath blowing into the Exeteiner through the straw.



FIGURE 7

**45 minute breath sample (Fig. 8).**

Use the Exeteiner with the blue cap.

Breath should be sampled by normal-deep breath blowing into the Exeteiner through the straw.



FIGURE 8

**Breath samples for measuring (Fig. 9),**

Each breath sample is identified by means of a bar-code label. Samples can be kept at room temperature for up to 6 months. They could be submitted to a central laboratory by standard mail.



FIGURE 9

The basal value is determined in duplicate and then samples are collected 30 and 45 minutes after the ingestion of approximately 250 cm<sup>3</sup> of natural orange juice to which 50 mg of urea enriched with <sup>13</sup>C are added. This form of administration delays gastric emptying of the labelled urea and favors contact with the whole gastric mucosa. This is important for the sensitivity of the method since *Helicobacter pylori* does not colonize the whole gastric mucosa but only patches.

## Mass spectrometry

The mass spectrometer, the cyclotron and the J.J. Thompson device are based on the interaction of electric and magnetic fields with ions, i.e., electrically charged atoms or molecules. In 1887 J.J. Thompson at Cambridge (England) measured for the first time the electron charge/mass ratio using a vacuum glass tube in which a bundle of electrons is pulled out of the cathode and accelerated to a screen covered with a fluorescent substance that indicates the impact site. Lawrence and Stanley Livingston of California University discovered the cyclotron in 1931. This consists of two metallic chambers in the shape of the letter D, in which it is possible to produce a pulse of atomic particles with high speed.

Conceptually, mass spectrometry is the separation of ions, which are produced and separated or filtered according to their mass/charge ratio ( $m/z$ ) and finally detected. Many different instruments have been developed using this principle. Breath  $^{13}\text{C}$  enrichment is measured using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS). The first gas source IRMS was designed by Alfred Nier in 1947 (1).

Recent advances, especially in sample introduction technology, have increased the efficiency, sensitivity and specificity of this technique through the introduction of continuous-flow IRMS by Preston and co-workers (2,3,4). In continuous flow instruments,  $\text{CO}_2$  is separated from the other components of breath, in a helium stream, by gas chromatography. Water is removed and the pure  $\text{CO}_2$  is carried into the IRMS, eliminating the need for off-line sample preparation. The addition of an autosampler and computer controlled instrumentation lead to the first fully automated system for analysis of breath  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment (5). Other advances include introduction of user-friendly software, allowing the spread of IRMS instrumentation to many laboratories around the world.

## Isotopes

Isotopes are forms of an element of differing mass that have the same number of protons (and therefore electrons), the difference being the number of neutrons.

Electrons are responsible for their chemical behavior and therefore isotopes cannot be differentiated by chemical reactions, but as the number of neutrons is different their mass will be different.

The accepted nomenclature to designate a nuclide is



**X:** nuclide; **A:** mass number ( $A = Z + N$ ); **Z:** atomic number, i.e., the number of protons; **N:** number of neutrons.

Isotopes of the same chemical element have the same  $Z$  and differ in  $A$ . In  $^{13}\text{C}$  breath tests, we need to consider the isotopes present in  $\text{CO}_2$  in the breath sample.

Table 1 shows the percent composition of C and O of their stable species, i.e., their **isotopic abundance**.

Table 1

Atom	Isotope	Isotopic abundance (%)
C	$^{12}\text{C}$	98.89
	$^{13}\text{C}$	1.108
	$^{14}\text{C}$	Very low
O	$^{16}\text{O}$	99.76
	$^{17}\text{O}$	0.04
	$^{18}\text{O}$	0.2

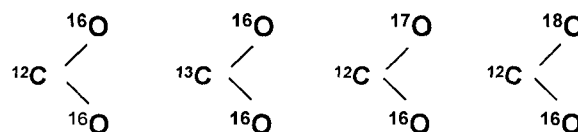
The elements contain **stable** or **radioactive isotopes**.

In the case of carbon, we find two stable isotopes,  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  and one radioactive isotope,  $^{14}\text{C}$ . The three isotopes of oxygen shown in the table are stable.

It should be noted that the quantity of  $^{13}\text{C}$  naturally present in a human being weighing 70 kg is approximately 120 g. Thus, if 50 mg  $^{13}\text{C}$ -urea ( $\sim 11\text{mg } ^{13}\text{C}$ ) is given for a breath test, this is scarcely 0.01 per cent of the total.

Several molecular species of  $\text{CO}_2$  can be formed by combining different isotopes.

These molecules of  $\text{CO}_2$  correspond respectively to masses 44, 45, 45 and 46.



The probability of finding these ions among those formed in exhaled breath depends upon the isotopic abundance of the elements. Other  $\text{CO}_2$  molecules, which could be formed by combining two or more minor isotopes, have a very low probability of being formed. The intensity of ions at mass 44 will be some 90-fold greater than that of other masses, due to the contribution of  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$  formed by the most abundant isotopes.

## Isotope Ratio Mass Spectrometry

A number of IRMS designed specially for automated analysis of  $^{13}\text{C}$  breath tests are commercially available. The photograph (Fig. 10) shows the equipment installed at the Laboratory of Stable Isotopes applied to Biology and Medicine, School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, which is a Finnigan BreathMAT (Thermo Electron Corporation, Tel: Africa +27 11 570 1840, UK +44 1442 233555; www.thermo.com). Although this instrument is no longer commercially available, in principle, its design and operation are similar to other instruments.

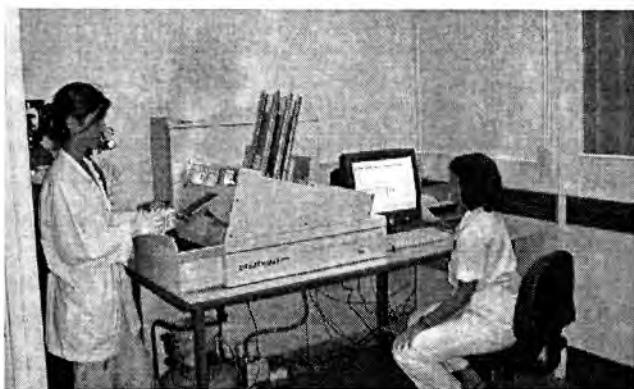


FIGURE 10

The components of the BreathMAT can be seen (from left to right) in Figure 10.

1. He and CO<sub>2</sub> cylinders (partially obscured by an operator).
2. On the table: the mass spectrometer, the autosampler, the monitor and the printer.
3. Under the table: compressor, rotary vacuum pump and computer CPU (partially obscured).

The procedure for the diagnosis of infection by *H pylori* using the <sup>13</sup>C-urea breath test is described step-by-step (pag. 29-31).

Following sample collection as described above, the analytical procedure begins with **identification** by affixing self-adhesive labels with a bar code on the tubes and the location of the tube into the autosampler magazine (Fig. 11). In each batch, up to 10 magazines with 20 tubes each may be located.

Once the bar code has been read by the **laser reader**, the autosampler makes the maneuvers destined to that the tube is punctured by the **needle** (Fig. 11).

The breath sample is displaced of the tube by means of a helium current that enters by the needle. The needle has two concentric routes. The helium is introduced through the central route, and the breathed air sample enters the needle by a lateral orifice and is carried to the IRMS by the same helium flow. Once extracted the sample, the tube is pushed towards a box but if for some reason, the laser reader cannot read the bar code, it is derived to a **sorter ramp** (Fig. 11) where is ordered according to the sequence of measurement of the samples.

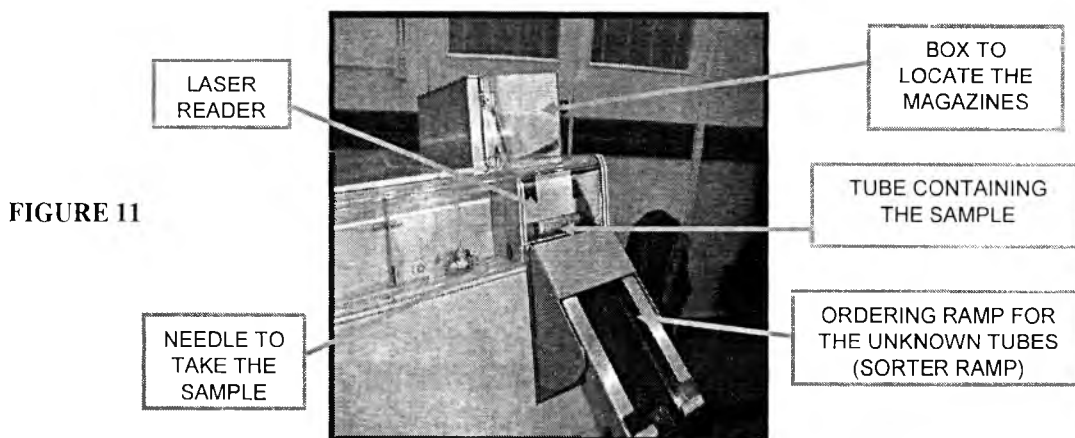


FIGURE 11

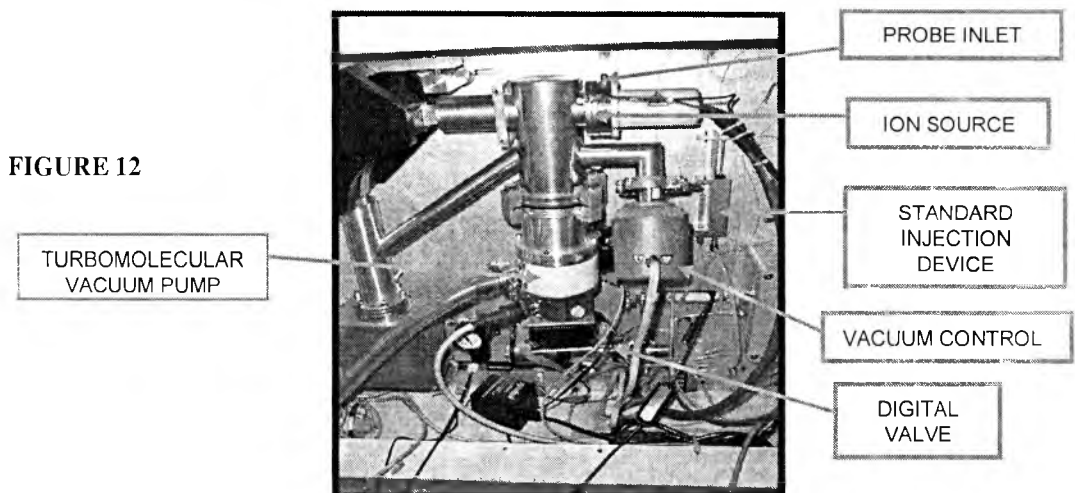


FIGURE 12

The breath sample is transported in a stream of helium to an eight-way **VALCO digital valve** (Fig. 12). This valve has two positions: "load" and "Inject". In the Load position, the sample fills a 2 mL **loop**. A turn of the valve to the Inject position causes the loop contents to flow towards the **gas chromatograph** (GC) (Fig. 13). A new turn brings the valve back to the Load position and, while the loop is filled, the flow is maintained through the GC. The valve turns are controlled by the computer software at predetermined times.

The breath sample mainly contains: oxygen, nitrogen, water vapor and carbon dioxide.

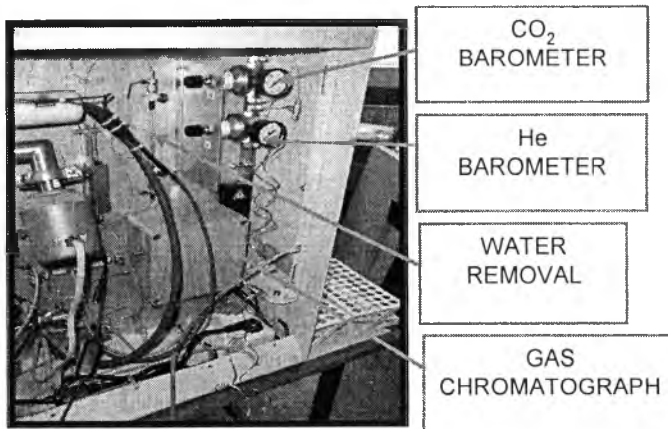


FIGURE 13

Gases entering the GC are separated. **Water removal** (Fig. 13) is accomplished by a permeable membrane. The flow now passes through an element called the **Standard Injection Device** (Fig. 12), the function of which is to alternate pulses of sample and reference gas.

Gases enter the **ion source** (Fig. 12), in which high vacuum conditions prevail, produced by the **turbomolecular vacuum pump** (Fig. 14) backed by the rotary pump.

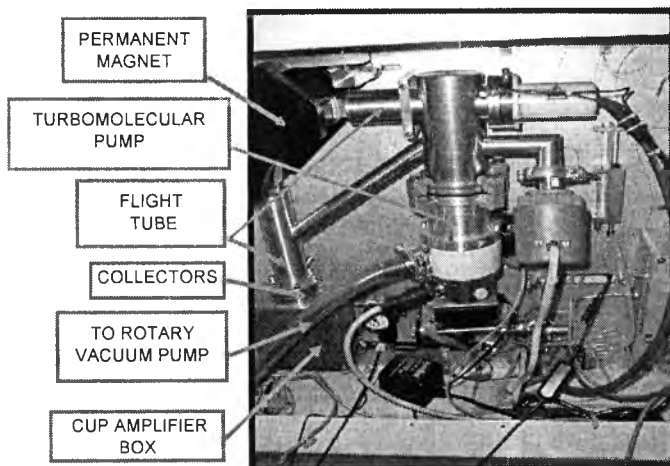
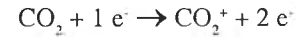


FIGURE14

In the ion source there is a **tungsten filament** that emits electrons, which ionize a small portion of the  $\text{CO}_2$  transforming it into a positive ion,  $\text{CO}_2^+$ .



Ions are formed following thermionic emission of electrons from the filament and their collision with gas molecules. Two small permanent magnets within the ion source increase the probability of collision with a  $\text{CO}_2$  molecule as they cause the electrons to describe a spiral from the filament. The **emission** of electrons is under strict electronic control to maintain constant ionization efficiency.

In the ion source there is a **high vacuum**,  $10^{-6}$  mbar (the atmospheric pressure is almost 1,000,000,000 times higher!!!), which is produced by two vacuum pumps, a mechanical rotary backing pump and a turbomolecular (high vacuum) pump connected in series. In this way the necessary high mean free path for the ions is achieved.

The  $\text{CO}_2^+$  ions produced are accelerated through a potential difference of approximately 3000 Volts (accelerating potential). The energy of the electric field produced by this potential difference is transferred to the ions and its value can be calculated easily (see Appendix 2).

The Finnigan BreathMAT spectrometer is an IRMS, which is a low resolution magnetic sector MS, and so has no velocity selector as it will be described in Appendix 1. Ions with different mass enter the magnetic field, where they describe different radii.

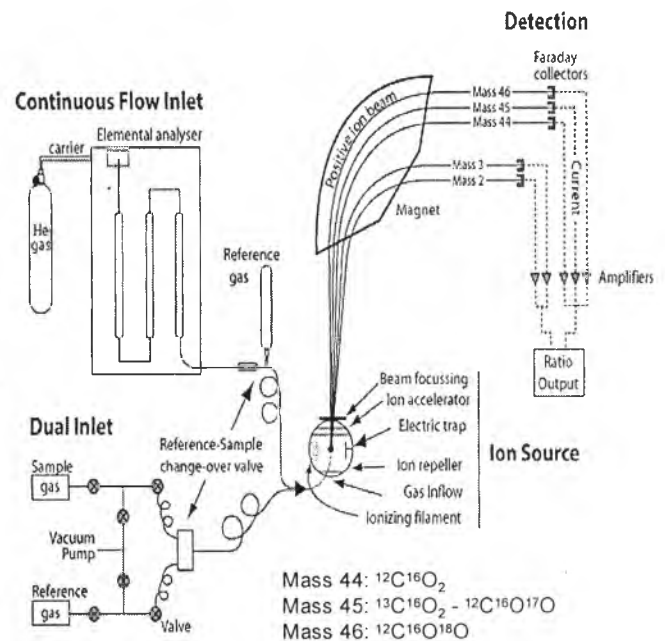


FIGURE 15

The IRMS is designed to monitor ions of mass-to-charge-ratio 44, 45 and 46. The detectors are ion collectors called **Faraday cups** (Fig. 15). The different isotopic abundances produce currents with different intensities in each detector (**cup1**, **cup2** and **cup3**). Therefore, each amplifier gain is optimised (by the value of the resistor installed) so that those receiving the less abundant ions (corresponding to masses 45 and 46) have ~100-fold more gain than that corresponding to mass 44 (**cup 1**).

### Data Analysis

IRMS results are expressed as current intensity ratios (the  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  ratio is termed ratio 45 in the Breath MAT software). Simultaneous collection of the isotopic species cannot be affected by variations of the total ion amounts arriving at the collectors, since intensity ratios and not their absolute values are determined. Processing includes comparison of the ratio 45 (actually 45/44) of the sample with the ratio 45 of the  $\text{CO}_2$  reference gas, which has a known carbon isotopic composition relative to the international standard for carbon isotopic composition (notation  $\delta^{13}\text{C}$ ; units ‰, per mil). The original international standard, a limestone called **Pee Dee Belemnite (PDB)** has been exhausted, but a new primary standard

has been produced (6). This new standard is known as Vienna PDB (VPDB).

The delta value of the reference gas has been entered into the software, which now automatically undertakes a series of corrections to account for the contribution of  $^{17}\text{O}$  to mass 45 in the calculation of R45/44 (the Craig correction, see scheme below). The result is now calculated as  $\delta^{13}\text{C}$  relative to the reference gas (**Del 13**), which is then converted to  $\delta^{13}\text{C}$  relative to PDB (**Del 13 PDB**). The final result of every sample is determined by the difference between the **Del 13 PDB of the sample** after the ingestion of  $^{13}\text{C}$ -UREA and the **basal Del 13 PDB**. The difference is called **DOB (Delta Over Baseline,  $\Delta$ )**. The results of  $^{13}\text{C}$  breath tests can also be expressed in units of part per million (ppm)  $^{13}\text{C}$  and ppm  $^{13}\text{C}$  excess (7).

The precision of analysis becomes poorer at lower than desirable  $\text{CO}_2$  concentration. When the ion current falls below a pre-determined minimal value the software produces a "low signal" message. In these cases the DOB data that the sheet gives automatically should be neglected. Low  $\text{CO}_2$  concentration is usually the result poor sample collection, which may be due to failure to replace the cap on the Exetainer correctly

The results of the determinations appear on a sheet similar to that shown here (Table 2).

Table 2

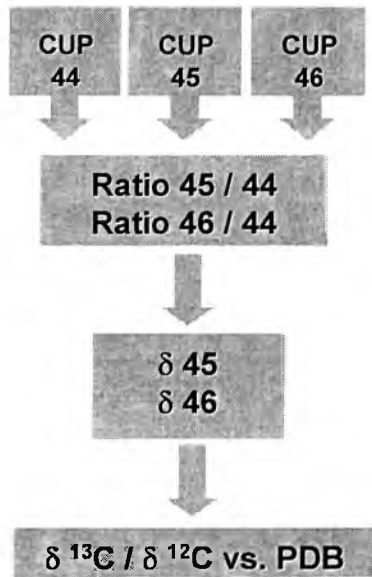
Sample	Barcode	Name	Remarks	DOB	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
Basal	52100	NICOLAS		0.0	5.1	-1.6	1.2	0.4	5.5	-22.6	2398
30 min	52100		Positive	47.3	50.7	1.3	1.2	0.4	54.1	24.7	1980
Basal	52130			0.0	4.8	-0.8	1.2	0.4	5.2	-22.9	2478
45 min	52130		Positive	31.3	35.1	4.3	1.2	0.4	37.3	8.4	1664
Basal	52200	ULISES		0.0	7.1	-4.3	1.2	0.4	7.7	-20.5	2502
30 min	52200		Positive	57.2	62.5	8.3	1.3	0.4	66.4	36.7	604
Basal	52230			0.0	7.0	-4.6	1.2	0.4	7.6	-20.5	2414
45 min	52230		Positive	41.6	47.3	-0.7	1.2	0.4	50.5	21.2	2634
Basal	52300	MARCOS		0.0	9.0	-2.1	1.2	0.4	9.7	-18.5	2477
30 min	52300		Negative	1.5	10.5	-1.8	1.2	0.4	11.3	-17.0	2317
Basal	52330			0.0	6.9	-6.9	1.2	0.4	7.6	-20.5	2922
45 min	52330		Negative	2.2	9.2	-2.6	1.2	0.4	9.9	-18.3	2643

The value of the cut-off point of the test is a DOB higher than 3.5, i.e., once the DOB of a sample is higher than 3.5 the result will be POSITIVE (8).

Several columns are not shown and the values have been rounded to one decimal place to show those of most interest. In the second column the number, which identifies each pa-

tient, is indicated. A signal indicates when a bar code reading has been carried out and the system inscribes the number in this column. If the signal from the bar code reader is not received, the Exetainer will be put on the ordering ramp once the sample has been analysed. The legend "Unknown" will appear in the output followed by the number indicating the

sequence order. When this occurs for the tenth time, the batch will be terminated since the ordering ramp will be full. In this eventuality sample identities are entered into the spreadsheet manually in the order indicated by the position of the tube on the ramp and the number. The column "mV" contains the values corresponding to a signal generated in the detector of the ions of mass 44 (of the isotope  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ), the most abundant. These values act as a quality control because the signal measured should be higher than the predetermined threshold value.



The schematic diagram shows the series of steps that together comprise the measurement of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio in the sample and in the reference gas.

**Ratio 45 and 46:** The ratios established between the signal intensities

$$R_{45/44} = \frac{{}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2 + {}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2} = {}^{13}\text{R}_{45/44} + 2 \cdot {}^{17}\text{R}_{45/44}$$

The data appearing with the notation  $\delta$  (delta), are generally results of a relationship with the reference gas:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[ \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{reference}}} \right) - 1 \right] \cdot 10^3$$

$$\text{Del 45: } \delta_{45} = \frac{(\text{ratio } 45/44_{\text{sample}} - \text{ratio } 45/44_{\text{ref}})}{\text{ratio } 45/44_{\text{ref}}} \cdot 1000 (\text{‰})$$

$$\text{Del 46: } \delta_{46} = \frac{(\text{ratio } 46/44_{\text{sample}} - \text{ratio } 46/44_{\text{ref}})}{\text{ratio } 46/44_{\text{ref}}} \cdot 1000 (\text{‰})$$

**Del 13:** The result of correction for the  $^{17}\text{O}$  contribution to mass 45 in the calculation of  $R_{45/44}$ . The correction proposed by Craig includes two constants (Craig A and Craig B), determined experimentally (9).

$$\delta^{13}\text{C} = \text{Craig A} \cdot \delta_{45} - \text{Craig B} \cdot \delta_{46}$$

$$\delta^{13}\text{C} = 1.0676758 \cdot \delta_{45} - 0.0338362 \cdot \delta_{46}$$

#### Routine quality control checks

In all routine IRMS operations, regular QC checks are undertaken. Peak centering is undertaken to ensure that the high voltage is adjusted to optimize ion beam focus; a stability test is undertaken to ensure that any variation of isotope ratio with time is within acceptable limits; a reproducibility or analytical precision test is undertaken to ensure precision is acceptable and that 'zero enrichment' criteria are met. Somewhat less frequently, an abundance sensitivity test (sometimes called amount dependence or linearity) is performed to ensure that any variation of measured ratio with sample size is within accepted limits.

In the Finnigan BreathMAT, routine QC tests are known as:

- 1) High voltage; 2) Time scan; 3)  $\text{CO}_2$ zero\_20

#### 1- High Voltage Scan (Fig. 16).

A reference gas peak is scanned over a 10 V range in HT to find the optimal accelerating voltage. Once automatically selected it should prove stable for the ratio 45/44 (<1 V per kV) in a constant temperature environment (18°C).

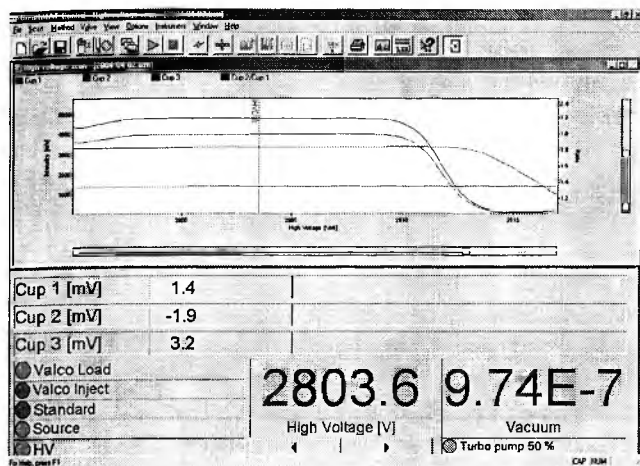


FIGURE 16

2- Time scan (Fig. 17).

A reference gas peak is monitored over 10 minutes, at the previously selected accelerating voltage. A variation of <1 per thousand in ratio 45/44 over 10 minutes is acceptable.

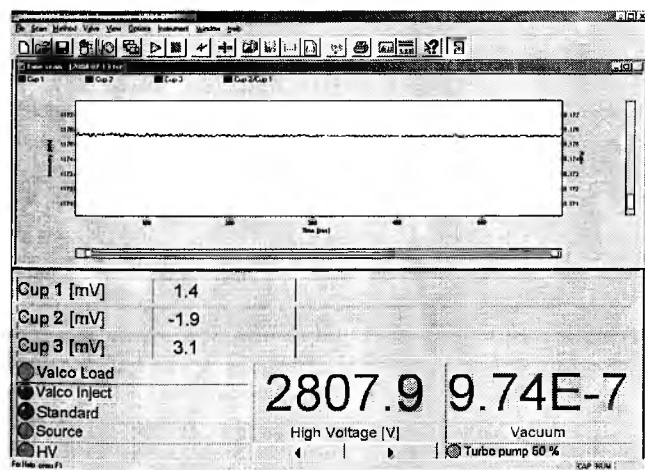


FIGURE 17

3- CO<sub>2</sub> zero<sub>20</sub>

This test is performed by undertaking 20 measurements of reference gas. The standard deviation of the Del 13 PDB values is calculated by means of an Excel sheet. The result should not be greater than 0.07 per mil. The purpose of this control is to check the reproducibility of the determinations. The data from this test are transferred automatically to a sheet which can be exported to Excel (Table 3).

Table 3

No.	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
1	-0.16	-0.05	1.18	0.42	-0.17	-28.06	3108.20
2	-0.12	-0.08	1.18	0.42	-0.13	-28.03	3105.40
...							
19	0.00	0.01	1.18	0.42	0.00	-27.90	3076.50
20	0.02	-0.07	1.18	0.42	0.02	-27.88	3143.90
							<b>0.05</b>

The value of 0.05 ‰<sup>13</sup>C, at the end of the Del13PDB column corresponds to the standard deviation of the 20 preceding values. The test is satisfactory.

### Other breath tests in human health

#### The 1-<sup>13</sup>C-octanoic acid breath test for solid phase gastric emptying

This test of solid phase gastric emptying is described in

$$\text{PDR h}^{-1} = \frac{\text{VCO}_2 \text{ (mmol h}^{-1}) \times \text{breath } ^{13}\text{CO}_2 \text{ enrichment (ppm excess)} \times 100}{\text{amount substrate taken (mmol)} \times \text{substrate enrichment (atom \% excess} \times 10^4)}$$

Note that many IRMS data systems only yield data in  $\delta^{13}\text{C}$  units (7). As it is more convenient to deal with tracer dose in units derived from atom fraction (atom % excess, or ppm excess), it may be necessary to interconvert units of enrichment (7).

A modest dose (typically 100  $\mu\text{l}$ ) of 1-<sup>13</sup>C-labelled octanoic acid is incorporated into the test meal (usually within egg yolk) and cooked. The subject remains seated and at rest. They give a baseline breath sample and take the test meal. A series of breath samples are given over a 6 hour period. The full protocol is available on the SIGN website ([www.med.rug.nl/sign](http://www.med.rug.nl/sign)).

The Figure 18 shows the output from a solid phase gastric emptying test. Use of the curve fitting procedure advocated by Ghooos and co-workers (10,11) revealed in this case a gastric emptying half time of 2.8 hours. Calculations such as these that may involve data manipulation and curve fitting are greatly facilitated by use of spreadsheets. All the IRMS manufacturers provide data outputs that can be readily imported into proprietary spreadsheets, such as Microsoft Excel.

#### <sup>13</sup>C-octanoic acid breath test

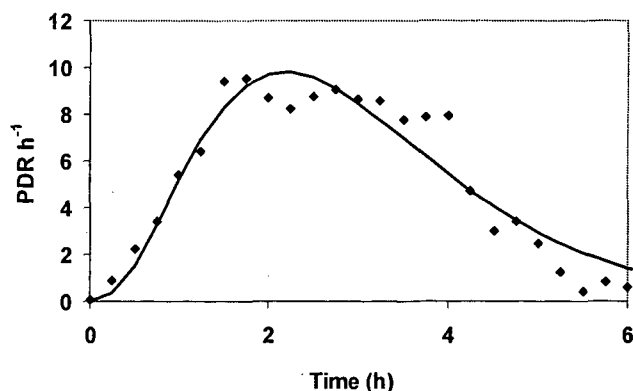


FIGURE 18

The main outcome of the octanoic acid breath test is a kinetic measurement, typically gastric emptying half time. Strictly speaking, this information could have been calculated from the plot of tracer enrichment with time, without having to convert it to PDR. However it is essential to express the outcome in PDR units in certain breath tests (see below).

full by Ghooos and co-workers (10,11). Unlike the case with the UBT, where data is expressed in units of enrichment, the convention has been to convert the IRMS data from the octanoic acid breath test into units of percentage dose recovered (PDR), where,

The study above was performed using an AP2003 isotope ratio mass spectrometer system designed for automatic analysis of <sup>13</sup>C breath tests. This IRMS is currently manufactured by: GV Instruments, Crewe Road, Wythenshawe, Manchester M23 9BE, UK (tel: +44 (0) 161 9022100; fax: +44 (0) 161 9022198; <http://www.gvinstruments.co.uk>).

#### The <sup>13</sup>C-mixed triacylglycerol breath test for pancreatic lipase sufficiency

Here a novel molecule, the mixed triacylglycerol (1,3 distearyl 2-[1-<sup>13</sup>C]octanoyl-glycerol), was designed and developed by Ghooos and co-workers (12,13), to detect maldigestion due to insufficient secretion of pancreatic lipase. This is now available commercially ([www.isotope.com](http://www.isotope.com)). The triacylglycerol is incorporated into a test meal and consumed. A series of breath samples taken, as in the octanoic acid breath test. When the tracer is fully digested, the unlabelled stearic acid moieties are removed from the *sn*-1 and *sn*-2 positions by pancreatic lipase. The resulting monoacylglycerol or nonesterified fatty acid is readily absorbed and transported to the liver where it is oxidised, releasing <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, which is exhaled in breath. Subjects with insufficient pancreatic lipase secretion give low recovery of <sup>13</sup>C in breath CO<sub>2</sub> (14).

#### Mixed triacylglycerol breath test

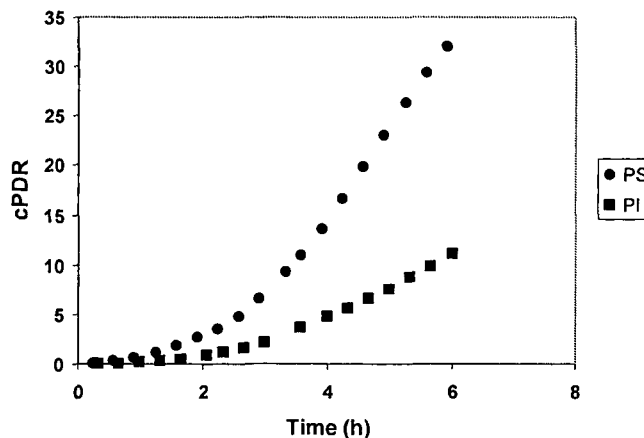


FIGURE 19

The Figure 19 shows the cumulative PDR (cPDR) in breath  $\text{CO}_2$  following a mixed triacylglycerol breath test in children with cystic fibrosis (● pancreatic sufficient, PS; ■ pancreatic insufficient, PI). This test has been successfully applied to assess the need for digestive enzyme supplementation in children with cystic fibrosis (15-17). Here, accurate measures of PDR are essential (18).

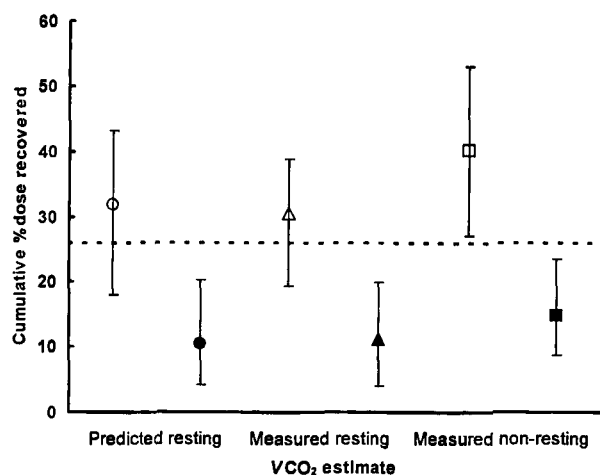


FIGURE 20

This Figure 20 illustrates the importance of obtaining accurate estimates of  $\text{CO}_2$  production to yield accurate cPDR data. Non-resting  $\text{VCO}_2$  estimates, from heart rate, were used to calculate cPDR over 6 h during the mixed triacylglycerol breath test. Open symbols are the median cPDR from pancreatic sufficient subjects ( $n = 19$ , shown with range). Closed symbols are the median cPDR from children with cystic fibrosis, who have been prescribed pancreatic enzyme replacement therapy, but did not take PERT with the test meal ( $n = 5$ , shown with range).

These studies were performed using a Europa ABCA isotope ratio mass spectrometer system designed for automatic analysis of  $^{13}\text{C}$  breath tests. This IRMS is currently manufactured by: SerCon Ltd, Wistaston Road Business Centre, Wistaston Road, Crewe, Cheshire CW2 7RP, UK (Tel: +44-(0)1270-580008; Fax: +44-(0)1270-252310; http://www.sercongroup.com)

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would also like to thank the IAEA for supporting the Hermosillo training course and for giving us the opportunity to participate and the motivation for this work. Finally we would like to express our appreciation to our host, the Research Centre for Food and Development.

#### REFERENCES

- Nier AO. A mass spectrometer for routine isotope abundance measurements. *Review of Scientific Instruments* 1940;11,212-216.
- Preston T & Owens NJP. Interfacing an automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and nitrogen-15 analysis. *Analyst* 1983;108, 971-977.
- Preston T & Owens NJP. Preliminary  $^{13}\text{C}$  measurements using a gas chromatograph interfaced to an isotope ratio mass spectrometer. *Biomedical Mass Spectrometry* 1985;12, 510-513.
- Preston T & McMillan DC. Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1988;16, 229-235.
- Prosser SJ, Brookes ST, Linton A & Preston T. Rapid, automated analysis of  $^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  of  $\text{CO}_2$  in gas samples by continuous-flow, isotope ratio mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 1991;20,724-730.
- Coplen TB. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1996;60, 3359-3360.
- Slater C, Preston T & Weaver LT. Stable isotopes and the International System of Units. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001;15, 1270-1273.
- Slater C, Preston T, Weaver LT. Is there an advantage in normalising the results of the *Helicobacter pylori* [ $^{13}\text{C}$ ]urea breath test for  $\text{CO}_2$  production rate in children? *Isotopes in Environmental and Health Studies* 2004;40, 89-98.
- Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1957;12, 133-149.
- Maes BD, Ghoois YF, Rutgeerts PJ, Hiele MI, Geypens BJ & Vantrappen G. [ $^{14}\text{C}$ ]octanoic acid breath test to measure gastric emptying rate of solids. *Digestive Diseases and Sciences* 1994;39, 104S-106S.
- Maes BD, Mys G, Geypens BJ, Evenepoel P, Ghoois YF & Rutgeerts PJ. Gastric emptying flow curves separated from carbon-labeled octanoic acid breath test results. *American Journal of Physiology* 1998;275, G169-G175.
- Ghoois YF, Vantrappen G, Rutgeerts PJ & Schurmans PC. A mixed-triglyceride breath test for intraluminal fat digestive activity. *Digestion* 1981;22, 239-247.
- Vantrappen GR, Rutgeerts PJ, Ghoois YF & Hiele MI. Mixed triglyceride breath test: a noninvasive test of pancreatic lipase activity in the duodenum. *Gastroenterology* 1989;96, 1126-1134.
- Amarri S & Weaver LT.  $^{13}\text{C}$ -breath tests to measure fat and carbohydrate digestion in clinical practice. *Clinical Nutrition* 1995;14,149-154.
- Amarri S, Harding M, Coward WA, Evans TJ & Weaver LT.  $^{13}\text{C}$ Carbon mixed triglyceride breath test and pancreatic enzyme supplementation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 1997;76, 349-351.
- de Boeck K, Delbeke I, Eggermont E, Veereman-Wauters G & Ghoois Y. Lipid digestion in cystic fibrosis: comparison of conventional and high lipase enzyme therapy using the mixed-triglyceride breath test. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1998;26, 408-411.
- van Dijk-van Aalst K, Van Den Driessche ML, van der Schoor S, Schiffelers S, Van't Westeinde T, Ghoois Y & Veereman-Wauters G.  $^{13}\text{C}$  mixed triglyceride breath test: a noninvasive method to assess lipase activity in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2001;32, 579-585.
- Slater C, Preston T, & Weaver LT. Use of calibrated heart rate monitors to estimate  $\text{CO}_2$  production rate during the  $^{13}\text{C}$ -mixed triacylglycerol (MTG) breath test. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 9A. 2003.

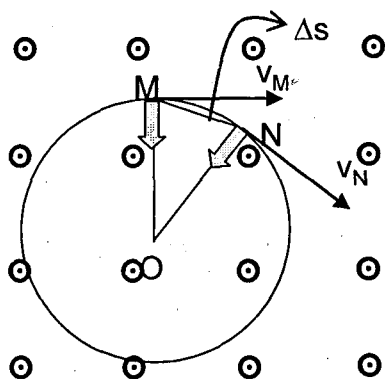
## APPENDIX 1

A short introduction to a few basic physical concepts such as circular motion and magnetic fields will help to understand the reasons for the separation of isotopes in a sample of exhaled breath to quantify the isotope ratio.

### 1. Circular motion

When an ion moves in a magnetic field in such a way that the direction of the **velocity** vector is perpendicular to the **magnetic induction** vector, its trajectory is a circumference.

FIGURE 21



In the Figure 21 we consider a moving positive charge at two points M and N of its trajectory. The magnetic field is perpendicular to the paper and comes out of the paper sheet.

The grey vector represents the **force**, which the magnetic induction **B** exerts on the electric charge moving with a velocity **v**. The direction of the velocity is **tangent** to the trajectory at every point. The vectors entering into the paper may be represented by  $\otimes$  (the tail of the arrow), and those coming out by  $\odot$  (the head of the arrow)

When the label appears in **bold script** it refers to a vector; in normal script it refers to its velocity and direction.

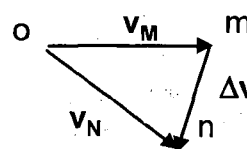
This situation may be compared to that of a stone attached to a rope. The stone remains in a circular trajectory as long as the tension of the rope is maintained. If the rope is broken, the stone will move with a rectilinear trajectory with a direction coincident to that of the velocity vector at the moment of the break of the rope. In the case of the stone the involved forces are **contact forces** since they are transmitted by the rope; in the mass spectrometer the forces are transmitted by a field through a **distance**.

In the Figure 21 the vectors  $\mathbf{v}_M$  and  $\mathbf{v}_N$  represent tangential instantaneous velocities at M and N respectively.

**Tangential velocity** is defined as the quotient between the traveled arc and the time employed for the travel; in a more rigorous way it should be defined as the limit of the quotient between  $\Delta s$  and  $\Delta t$  when  $\Delta t$  tends to zero. Under these circumstance the arc may be taken as having the same length as  $\Delta s$ ; therefore the first definition makes sense. The Greek letter  $\Delta$  is used to symbolize change, in this case the “increase of” the variable which follows. It replaces the difference between the final and the initial values of the variable during the considered interval.

If we move the vectors representing the speeds to a common origin we can find the difference vector ( $\Delta \mathbf{v}$ ) between  $\mathbf{v}_M$  and  $\mathbf{v}_N$  (Figure 22).

FIGURE 22



In order to understand these considerations, we may represent the difference between two vectors as the sum of  $\mathbf{v}_M$  and  $\Delta \mathbf{v}$ . Then:

$$\mathbf{v}_M + \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N \quad \text{resulting} \quad \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N - \mathbf{v}_M$$

Conceptually the velocity change ( $\Delta \mathbf{v}$ ) as a function of time is the acceleration. If we take the point N closer and closer to M, with time tending to zero, it will be:

$$d\mathbf{v}/dt = \mathbf{a} \quad \text{the direction and sense of } \mathbf{a} \text{ will be equal to that of } d\mathbf{v}$$

As points M and N are sufficiently close,  $\Delta \mathbf{v}$  becomes perpendicular to  $\mathbf{v}$  and consequently the acceleration  $\mathbf{a}$  as well. Therefore the acceleration at each point of the trajectory has a direction coincident to the radius and the sense is to the center. For this reason it is called **centripetal acceleration** and since the relationship with the force is the mass of the body (with positive sign), obviously the force producing this acceleration is coincident in sense and direction to that of the acceleration; we symbolize it in grey in Figure 21 and it is called **centripetal force**. This force is responsible for the change of direction of the tangential velocity.

We note that the effects of the forces may produce changes of the velocity which do not affect its modulo. If this is not so, it is required that the force has a component in the direction of the velocity and this is not the case in uniform circular motion.

The tangential velocity is a property that characterizes circular motion. It is very simple to infer that this tangential velocity is strongly dependent on the radius (distance at which the moving body is found with regard to the center of the circumference of the trajectory which it is describing). It is necessary to find a mathematical relationship between these variables.

When a body turns around a point it will "sweep" an angle. In a circular motion, angles are measured in "radians". An angle of 1 radian is defined when it subtends an arc equal to the length of the radius. Thus, an angle of  $360^\circ$  corresponds to an arc equal to the length of the circumference.

If we want to establish the equivalence between the hexadecimal system and the radian, we can take into account this relationship and since a **measurement is a comparison with the unit**, we should refer the arc (the length of the circumference) to the value of the radius.

$$360^\circ \text{ is equivalent to } \frac{2 * \pi * R}{R} = 2 * \pi$$

Since the ratio between a length and another length has no unit, the radian is actually dimensionless, even though sometimes it is referred to by the word "radian" in order to have a reference to the system in which we are working.

For example an angle of  $45^\circ$  is equal to  $\pi/4$  radians.

Another property that characterizes the circular motion is the **angular velocity**, which is represented by  $\omega$ .

It is defined by the "swept" angle (given in radians) during a certain time.

Let us suppose that the "swept" angle between M and N of Figure 21 is  $\theta$ . Then:

$\omega = \theta/t$  the unit of  $\omega$  will be  $s^{-1}$ , provided  $\theta$  is given in radians

The angular velocity  $\omega$  is a vector. The foregoing expression allows the calculation of the module of the vector. The direction will be perpendicular to the plane of the trajectory, it passes through its center and its sense is given by the rules of the vector calculus. Later, as we are going to analyze magnetic fields, we shall develop in detail the manner by which we can determine the sense in these cases.

It is doubtless that the angular velocity and the tangential velocity ( $v$ ) are related.

The tangential velocity is nothing but a certain length, in this case an arc, swept during a certain time.

$$v = \text{arco} / t \quad (1)$$

In order to measure the length of this arc it should be taken into account that a certain angle measured in radians belongs to this arc.

If the angle is  $\theta$  we can establish this proportionality:

$$\frac{\text{arco}}{\theta} = \frac{2 * \pi * R}{2 * \pi}$$

Simplifying:  $\text{arco} / \theta = R \Rightarrow \text{arco} = \theta * R$

$$\text{Replacing in (1): } v = \frac{\theta * R}{t}$$

$$\text{Since } \theta / t = \omega \quad v = \omega * R$$

This equation shows that the tangential velocity is directly proportional to the radius of the trajectory. Thus, for example, if a row of soldiers turns, those who are at the center practically remain at the same place (tangential velocity nearly zero) but those marching at the distal extreme have to move very quickly in order to not break the line. Notwithstanding, the angle described by all of them is the same, i.e., they have the same angular velocity.

In the Figures 21 and 22 the triangles OMN and omn are resembling because they are isosceles and the angles formed by equal sides are equal between them (two isosceles triangles are resembling if the angles are equal and the homologous sides are proportional).

$$\text{Thus: } \frac{\Delta s}{R} = \frac{\Delta v}{v} \Rightarrow \Delta v = \frac{v * \Delta s}{R}$$

$$a = \Delta v / t \Rightarrow a = \frac{v * \Delta s}{R * t} \quad \text{but } \Delta s / t = v$$

$$\text{It results: } a = \frac{v * v}{R} \quad \text{and} \quad a = v^2 / R \quad (2)$$

The expression (2) will be used in the forthcoming analysis.

## 2.- Magnetic Field

The force of magnetic ( $F$ ) origin is directly proportional to the charge ( $q$ ) of the ion, to its velocity ( $v$ ) and to the magnetic field of magnetic induction ( $B$ ).

The mathematical expression by which it is possible to calculate the force is:

$$F = q \cdot (v \times B)$$

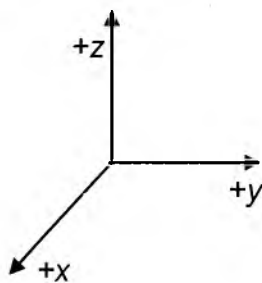
$\mathbf{v} \times \mathbf{B}$  being the vector product of both vectors; for this reason the result is also a vector.

The module of the vector  $\mathbf{F}$  is:  $F = q \times v \times B \times \sin \varphi$ ;

$\varphi$  being the angle between both vectors.

In the case of the mass spectrometer,  $\mathbf{v}$  and  $\mathbf{B}$  are perpendicular and therefore  $\sin \varphi = 1$ .

By definition of the vector product, the direction of the vector  $\mathbf{F}$  is perpendicular to the plane determined by  $\mathbf{v}$  and  $\mathbf{B}$ .



The sense of  $\mathbf{F}$  will be determined operating mathematically. Assigning to each of the vectors  $\mathbf{v}$  and  $\mathbf{B}$  the senses of the cartesian coordinate axes  $+x$  and  $+y$ , respectively, the result for  $\mathbf{F}$  is the sense  $+z$ .

In a practical way, the sense of  $\mathbf{F}$  will be determined by the so called “right hand rule”. The vector  $\mathbf{B}$  “comes out” of the palm of the right hand, the fingers with the exception of the thumb should be pointed in the sense of the velocity. Separating the thumb at a right angle from the remaining fingers, the thumb will point in the sense of the force if the ion is positive. If the ion is negative the sense of the force will be opposite to that of the thumb.

There are more “familiar” ways to determine this result. If we overturn (“gyrate”)  $\mathbf{v}$  over  $\mathbf{B}$  (with an angle smaller than  $90^\circ$ ) the sense in which a corkscrew or a screw with a right coil would advance will give the sense of  $\mathbf{F}$ .

The foregoing analysis shows that at the moment in which an ion penetrates perpendicularly into a magnetic field, a perpendicular force will begin to act by which the direction of the movement of the ion will change; the ion will be describing a circular trajectory.

When the ion leaves the magnet, the magnetic force will cease and therefore the ion will follow a straight trajectory, arriving to the zone of ion collection.

The module of the force is:  $F = q \times v \times B$

The force is also  $F = m \times a \Rightarrow m \times a = q \times v \times B$  ( $m = \text{mass}$ )

Since in this case the force is the centripetal force, the acceleration will be also centripetal.

According to equation (2)

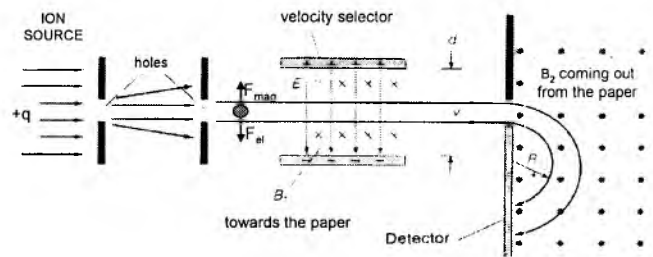
$$a = v^2 / R \quad \text{It results} \quad \frac{m \cdot v^2}{R} = q \cdot v \cdot B \Rightarrow$$

$$\frac{m \cdot v}{q \cdot B} = R \Rightarrow R = \frac{v}{q \cdot B} m$$

How can we read this equation? The radius described by an ion in a magnetic field depends on four variables: the velocity ( $\mathbf{v}$ ), the charge ( $\mathbf{q}$ ), the magnetic induction of the magnetic field ( $\mathbf{B}$ ) and the ion mass ( $\mathbf{m}$ ).

Two of these variables, the charge ( $\mathbf{q}$ ) and the magnetic induction ( $\mathbf{B}$ ) are similar for all the ions.

The Figure shows a scheme of a mass spectrometer, which has a **velocity selector**. This device allows the entrance into the zone of action of the spectrometer magnet of ions having only a determined value of its velocity.



The ions, accelerated in an ion source, enter into a zone in which they interact with an electric field ( $\mathbf{E}$ ), which exerts an electric force ( $\mathbf{F}_{el}$ ) on the ion in a sense downwards, and a magnetic field, perpendicular to the electric field and to the ion velocity, which exerts a magnetic force ( $\mathbf{F}_{mag}$ ) in an opposite sense to the electric field. The electric field  $\mathbf{E}$  is produced by two conducting plates submitted to difference of potential  $\mathbf{V}$  and separated by a distance  $\mathbf{d}$ .

The corresponding equations are:

$$\left. \begin{aligned} F_{el} &= q \cdot E \Rightarrow F_{el} = q \cdot V/d \\ F_{mag} &= q \cdot v \cdot B \end{aligned} \right\} v = V / B \cdot d$$

Since the forces  $\mathbf{F}_{el}$  and  $\mathbf{F}_{mag}$  are opposite, if their modules are equal, the ions with a velocity  $\mathbf{v}$  would have a rectilinear uniform movement.

The ions with a higher velocity than  $V/(B.d)$  would move according to the sense of the magnetic force, whereas if their velocity would be smaller than this value, they would move in the sense of the electric force. In both cases they would not pass through a diaphragm located geometrically in the trajectory of the ions having velocity  $v$ .

Since isotopic compounds only differ in their nuclear masses, a mixture of isotopes with the same electric charge, the same velocity and moving in a zone with the same magnetic induction, will describe circular trajectories with different radii.

This is the reason that renders mass spectrometry a method of choice to determine the isotopic composition of an element in a sample.

### APPENDIX 2

The energy of the ions can be calculated by taking into account that the electric charge of the ions is caused by the loss of one electron; since the charge of an electron is  $-1.601864 \times 10^{-19}$  coulombs, it results:

$$\text{energy} = q \times V \Rightarrow \text{energy} = 1.601864 \times 10^{-19} \text{ coulomb} \times 3000 \text{ volt}$$

$$\text{energy} = 4.805592 \times 10^{-16} \text{ joule}$$

This energy is transferred as kinetic energy to the produced ions in the ion source.

In order to calculate the velocities acquired by the different isotopes of  $\text{CO}_2^+$  taking into account that the kinetic energy,  $E_k$ , is equal to  $m.v^2/2$ .

$$v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2 * 4,805592 * 10^{-16} \text{ J}}{N * 1,67248 * 10^{-27} \text{ kg}}} \Rightarrow v = \frac{758067,677 \text{ m}}{\sqrt{N} \text{ s}}$$

Replacing  $N$  for the mass values **44, 45 and 46** (which give the nucleon number), the following values for the velocities result:

$$V_{44} = 114.283,0023 \text{ m/sec}; V_{45} = 113.006,0572 \text{ m/sec}; V_{46} = 111.770,982 \text{ m/sec}$$

The calculations were carried out assigning a value of  $1,67248 \times 10^{-27}$  kg to the nucleon mass (protons and neutrons). Strictly there is a mass difference between both nucleons but in this case this has been neglected. The mass of the electrons in each atom was also neglected since it can be estimated that the results are not changed. The velocity values are around 400.000 km/h.

### APPENDIX 3

To calculate their radii we must first deduce a general equation, and then apply it to each isotope.

$$E_{\text{cin}} = \frac{1}{2}mv^2 \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \text{ and since } R = \frac{mv}{qB} \text{ it results}$$

$$R = \frac{m}{qB} \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{m^2 2qV}{q^2 m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2mV}{q}} \Rightarrow$$

$$R = \frac{1}{0,47 \text{ Tesla}} \sqrt{\frac{2 * N * 1,67248 * 10^{-27} \text{ kg} * 3000 \text{ V}}{1,601864 * 10^{-19} \text{ C}}}$$

Where: Tesla is the unit of magnetic field intensity

$N$ : number of nucleons

Mass of 1 (one) nucleon:  $1,67248 * 10^{-27}$  kg

Acceleration potential difference of the ions:

$V=3000$  V

Intensity of the magnetic field:

$B=4700$  gauss =  $0.47$  tesla

Elemental charge:  $q=1,601864 * 10^{-19}$  coulomb

Performing the operations we obtain:

$$\Rightarrow R = \frac{7,9148606 * 10^{-3} \text{ m}}{0,47} * \sqrt{N}$$

Now we simply replace  $N$  for the values **44, 45 and 46**.

$$R_{44} = 0,1117 \text{ m} \quad R_{45} = 0,1130 \text{ m} \quad R_{46} = 0,1142 \text{ m}$$

These values are coherent with the geometry of the spectrometer magnet. All the previous development may be summarized by the equation:

$$\frac{m}{q} = \frac{B^2 * R^2}{2 * V} \text{ this expresses adequately the conditions of the spectrometer}$$

In this expression the values of electric charge of the ions,  $q$ , the accelerating potential,  $V$  and the magnetic induction,  $B$  are the same for all the isotopes. Therefore, the radii of the trajectories,  $R$ , depend on the ion mass,  $m$ , which may be calculated as the mass of one nucleon multiplied by the number of nucleons of the isotope. Furthermore,  $B$  is a fixed value and  $V$  results from the selection of the maximal voltage.

**Artes Finales:** Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 993.81.43

**Portada:** Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 285.55.29

**Impresión:** Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfonos: (02) 632.97.17 - 632.74.86

## LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION (SLAN)

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada el 10 de Noviembre de 1965 en ocasión de celebrarse el Primer Congreso de Nutrición del Hemisferio Occidental. El actual Consejo Directivo de la SLAN (2004-2006) está constituido por los siguientes miembros:

Presidente	Helio Vannucchi
Vicepresidente (Presidente Electo)	Eduardo Atalah S.
Secretario General	Julio Sergio Marchini
Tesorero	Pedro Eder Portari Filho
Presidente Saliente	Adolfo Chávez Villasana

## DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	José Félix Chávez Pérez
Editor Asociado	Maritza L. de Jiménez

## MIEMBROS DEL CUERPO EDITORIAL. PERIODO 2004-2006

Juan de Dios Alvarado	Ileana Holst Schumacher
Hugo Amigo A.	Franco M. Lajolo
Héctor Araya	Luis López Valladares
María Laura Arias E.	María L.P. Martín de Portela
Jaime Ariza M.	Lilia Masson Salaué
Guillermo Arroyave	Reynaldo Martorell
Denis Barclay	Josefina Morales de León
José María Bengoa	María del C. Morasso
Adriana Blanco M.	Rosa María Ortega A.
Odilia Bermudez	Saturnino de Pablo
Héctor Bourges R.	Ingrid R. de Paoli
Ricardo Bressani	Nelly Pak
Jesús Bulux	Emma W. de Penna
Benjamín Caballero	María Ester Río
Ana M. Calderón de la Barca	Delia Rodríguez-Amaya
Esther Casanueva	Manuel Ruz
Germán Camejo	María Elena Sambucetti
Eduardo S. Castro Montero	Elba Sangronis
Fanny Carrillo de Padilla	Teresa Shamah Levi
Sara J. Closa	Nilson E. de Sousa
Louella Cunningham	Nora Slobodianik
Elizabet Dini G.	Liseti Solano R.
Juan Ignacio Egaña	Noel W. Solomons
Patricia R. de Ferrer	Armando Tovar
María N. García Casal	Juscelino Tovar
Eglis González G.	Luiz C. Trugo
Marisa Guerra M.	Mirtha E. Valencia
Werner G. Jaffé	Mauro Valencia J.
Gladys Henriquez P.	Mario Villarroel T.
Pilar Hernández S.	Carolyn Jane Wyatt
Eva Hertrampf	Enrique Yáñez S.
Patricio Hevia Opazo	Liliana Zago

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Volumen 54. Suplemento N° 2, Diciembre 2004

## Contenido

	Páginas
<b>Prólogo</b> .....	3
<b>Utilidad de los isótopos estables en salud humana y nutrición: espectrometría de masas y test de aliento con <sup>13</sup>C-urea aplicados a la detección de infección por <i>Helicobacter pylori</i></b> Barrado A., Preston T., Slater C., Zubillaga M., Miranda-da-Cruz B., Mokhtar N., Zednik M., Valencia M.E. y Boccio J. ....	5
<b>Prologue</b> .....	25
<b>The usefulness of stable isotopes in nutrition and human health: the application of mass spectrometry and <sup>13</sup>C-breath tests to detect <i>Helicobacter pylori</i> infection</b> Barrado A., Preston T., Slater C., Zubillaga M., Miranda-da-Cruz B., Mokhtar N., Zednik M., Valencia M.E. and Boccio J. ....	27