



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

*ESTRATEGIAS PARA LA CORRECCIÓN DE LOS CAMBIOS DE  
SENSIBILIDAD EN HPLC-ICP-MS*

Natalia del Val de la Fuente

Julio 2015, Oviedo

Jorge Ruiz Encinar, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

**CERTIFICA:**

Que el presente Trabajo, titulado **“Estrategias para la corrección de los cambios de sensibilidad en HPLC-ICP-MS.”** ha sido realizado por el alumno **Natalia del Val de la Fuente** bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-2015, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 15 de Julio de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jorge Ruiz Encinar', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo: Jorge Ruiz Encinar

# ***AGRADECIMIENTOS***

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Jorge Ruiz Encinar, por darme la oportunidad de elaborar el proyecto dentro de su grupo de investigación.

Gracias, también a Fran Calderón Celis, estudiante de Doctorado en Química Analítica en el grupo de investigación de “Espectrometría Analítica”, por su asesoramiento y dedicación durante el desarrollo del presente proyecto.

Finalmente, agradecer a mis padres el haberme dado la posibilidad de hacer un máster en Oviedo.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. <i>La proteómica</i>	1
1.2. <i>Cuantificación relativa</i>	1
1.2.1. <i>Cuantificación relativa de proteínas con técnicas de espectrometría de masas molecular</i>	1
1.3. <i>Cuantificación absoluta</i>	2
1.4. <i>Cuantificación de proteínas por espectrometría de masas elemental: detección de heteroátomos por ICP-MS</i>	2
1.4.1. <i>Importancia del azufre como marca para la cuantificación de proteínas por ICP-MS.</i>	2
1.4.2. <i>Eliminación de interferencias empleando ICP-QQQ</i>	3
1.4.3. <i>Separación previa de proteínas por fase reversa: HPLC capilar</i>	3
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>3. EXPERIMENTAL</b>	<b>5</b>
3.1. <i>Instrumentación y reactivos</i>	5
3.1.1. <i>Reactivos</i>	5
3.1.2. <i>Instrumentación</i>	5
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>7</b>
4.1. <i>Optimización de las condiciones de celda.</i>	7
4.2. <i>Elección del patrón interno</i>	7
4.3. <i>Recuperación de la columna</i>	8
4.4. <i>Corrección de las variaciones en la sensibilidad durante la cuantificación absoluta de proteínas por cap-HPLC-ICP-MS.</i>	9
4.4.1. <i>Determinación del ratio de concentración BSA/BOC.</i>	9
4.4.2. <i>Corrección de los cambios de sensibilidad.</i>	10



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La proteómica

La proteómica es una ciencia que tiene como objeto el estudio del proteoma o conjunto de todas las proteínas de una célula, tejido o en general, un sistema biológico, en un momento concreto. El proteoma está formado por un gran número de proteínas, que se encuentran sujetas a una gran variabilidad fruto de factores externos que explican variaciones en la abundancia y estructura de las proteínas, en sus interacciones o modificaciones producidas tras la traducción; además, el amplio rango de abundancias y de solubilidades de las proteínas de un sistema hacen que abordar el análisis del proteoma sea una tarea realmente compleja por lo que es necesario el empleo de técnicas de separación de alta resolución (electroforesis en gel bidimensional, electroforesis capilar o HPLC multidimensional en sus modalidades de exclusión por tamaños, fase reversa o intercambio iónico); técnicas de detección basadas en la espectrometría de masas molecular, altamente sensibles y que emplean fuentes de ionización blandas (ESI o MALDI) que permiten identificar/cuantificar la proteína a través de su peso molecular o través de sus fragmentos (acoplando una fuente de ESI a un espectrómetro de MS/MS).

A continuación se hablará de las principales técnicas de determinación cuantitativa, tanto relativa como absoluta.

## 1.2. Cuantificación relativa

### 1.2.1. Cuantificación relativa de proteínas con técnicas de espectrometría de masas molecular

Las técnicas basadas en la espectrometría de masas molecular, que emplean fuentes de ionización como MALDI o ESI, se han venido empleando frecuentemente para efectuar cuantitativos de mezclas de proteínas<sup>1-5</sup>, sin embargo, presentan la limitación de que la ionización depende fuertemente del péptido o proteína analizado y de la matriz en la que se encuentra o el disolvente empleado en la separación lo que se refleja en una falta de linealidad entre la señal obtenida en el espectrómetro de masas y la concentración de la proteína/péptido de interés en la muestra. Además, esto no puede ser corregido con el empleo de patrones internos debido al alto número de proteínas/péptidos presentes en la muestra.

Por este motivo, se han desarrollado métodos de cuantificación relativos basados en el marcaje con isótopos estables, donde se comparan dos muestras que contienen un elemento marcado isotópicamente y sin marcar, respectivamente<sup>6</sup>; teniendo en cuenta que el proceso de ionización es idéntico para ambas (los isótopos tienen las mismas propiedades físico-químicas, sólo se diferencian en la masa), al mezclar ambas muestras se obtendrá un espectro de masas formado por un doblete para cada péptido, donde las señales están separadas por la diferencia de masa entre ambos isótopos; la medida de la relación de intensidades entre ambos grupos de señales permite comparar la muestra no marcada o de estudio con la de referencia, marcada isotópicamente realizando así una cuantificación relativa.

Las marcas se pueden clasificar en dos grandes grupos: *in vivo* (marcaje metabólico) e *in vitro* (marcaje químico). Dentro del primer grupo destaca la técnica SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell*

*culture*)<sup>7-9</sup>, mientras que en el segundo existen dos estrategias principales: el marcaje isotópico y el marcaje isobárico; dentro del primero destaca la técnica ICAT (marcaje isotópico diferencial de afinidad), mientras que la técnica iTRAQ<sup>10-13</sup> es representativa del marcaje isobárico.

### **1.3. Cuantificación absoluta**

Predomina el inmunoensayo enzimático heterogéneo (ELISA) y las técnicas de espectrometría de masas molecular: AQUA (emplea un patrón interno idéntico a la proteína a cuantificar pero marcado isotópicamente) y QconCAT (el patrón interno es una proteína formada por los péptidos a cuantificar marcados isotópicamente).

### **1.4. Cuantificación de proteínas por espectrometría de masas elemental: detección de heteroátomos por ICP-MS**

El análisis de proteínas con detección de heteroátomos por ICP-MS ha sido una de las alternativas más atractivas a las técnicas de MS moleculares debido a su simplicidad y las numerosas ventajas que proporciona un equipo de ICP-MS desde el punto de vista analítico<sup>14-15</sup>: determinaciones rápidas, LOD muy bajos para la mayoría de los elementos, efectos de matriz débiles, espectros de masas simples y fáciles de interpretar, rangos lineales dinámicos de gran amplitud (por encima de 9 órdenes de magnitud<sup>16</sup>), posibilidad de medir radios isotópicos, y fácil acoplamiento a técnicas de separación como CE o HPLC.

Además como es una técnica elemental, la sensibilidad es independiente del entorno molecular en el que se encuentra el heteroátomo, permitiendo el uso de patrones genéricos que contengan dicho elemento<sup>14</sup>, salvando así las dificultades para encontrar el patrón específico (enriquecido o no) correspondiente a la proteína/péptido a cuantificar o evitar el tedioso procedimiento de sintetizado del mismo.

#### **1.4.1. Importancia del azufre como marca para la cuantificación de proteínas por ICP-MS.**

Uno de los heteroátomos más empleados como marca es el azufre, presente en los aminoácidos cisteína y metionina. Este elemento se encuentra en el 98% del proteoma<sup>15,17</sup> permitiendo así la cuantificación de casi cualquier proteína, además como se presenta covalentemente<sup>18</sup> unido a ellas es una marca de alta estabilidad, lo que evita errores en la cuantificación.

El potencial de la cuantificación de azufre por acoplamiento HPLC-ICP-MS radica en la posibilidad de calcular la cantidad de proteína de forma directa, sin embargo, el empleo de azufre exhibe dos limitaciones importantes:

- Experimentalmente se ha observado que la eficiencia de ionización del azufre ronda el 10% debido a su alto primer potencial de ionización (10,36 eV), lo que proporciona una baja sensibilidad<sup>15</sup>.
- La presencia de interferencias, aumenta los límites de detección para este elemento y limita de forma severa la determinación precisa y exacta de radios isotópicos. Este problema puede ser resuelto empleando un triple cuadrupolo, como se describe en el apartado 1.4.2.

### 1.4.2. Eliminación de interferencias empleando ICP-QQQ

Se han desarrollado distintas tecnologías centradas el analizador cuadrupolar, que fueron evolucionando al acoplar una celda de reacción hasta llegar finalmente al analizador de triple cuadrupolo dotado de dos cuadrupolos entre los que se intercala una celda de colisión/reacción.

Este sistema posee dos características fundamentales que garantizan su eficacia, la formación de los correspondientes monóxidos de azufre por reacción con oxígeno en la celda y la realización de un doble filtrado eliminando tanto las interferencias de los isótopos como las de sus monóxidos obteniéndose unos límites de detección extraordinariamente bajos y unos radios isotópicos muy precisos. Esta instrumentación es muy útil en el análisis de muestras complejas de proteínas/péptidos o muestras con matrices muy complicadas<sup>17</sup>.

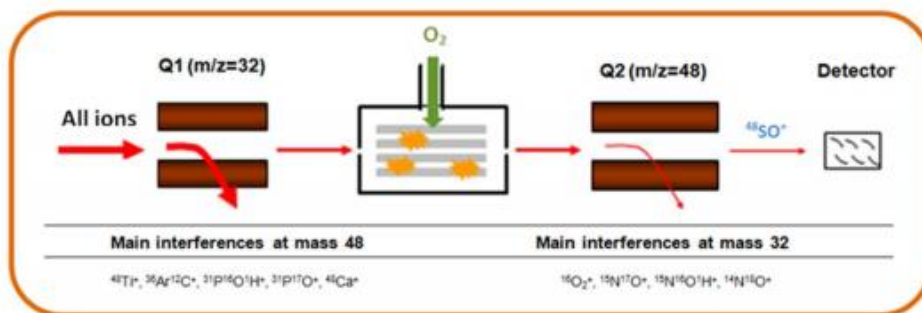


Figura 1. Esquema del funcionamiento del triple cuadrupolo en la determinación de  $^{32}\text{S}$ <sup>(17)</sup>.

### 1.4.3. Separación previa de proteínas por fase reversa: HPLC capilar

La introducción de modificadores orgánicos durante la separación cromatográfica por fase reversa en el equipo de ICP-MS provoca inestabilidades en el plasma, o incluso su extinción<sup>19</sup>. Este efecto es más notable en la determinación de elementos con altos potenciales de ionización (9-11 eV) como el azufre. Además favorece el depósito de carbono elemental en los conos introduciendo contaminación o provocando la obturación de los mismos<sup>19</sup>. Este efecto puede reducirse empleando flujos capilares, de forma que reduzca la cantidad de modificador orgánico que llega al plasma.

El acoplamiento de estas técnicas al ICP-MS debe realizarse con micronebulizadores de alta eficacia, evitando así pérdidas de resolución cromatográfica debida a la existencia de volúmenes muertos, lo que conduce a límites de detección más bajos<sup>16</sup>, y reduce al mínimo la influencia de la estructura química de las especies en la nebulización<sup>20-21</sup>.

Sin embargo, a pesar de estas mejoras, la experiencia ha demostrado que porcentajes altos de acetonitrilo, entre el 30 y 60%<sup>19</sup> inducen cambios significativos en la sensibilidad, por lo que es indispensable aplicar otras medidas correctoras, como el empleo de un flujo post-columna.



## 2. OBJETIVOS

- a) El objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar el empleo de la dilución isotópica post-columna como corrección de las variaciones de sensibilidad, analizando detalladamente los resultados obtenidos y discutiendo los puntos fuertes e inconvenientes de la técnica.
- b) Familiarizarse con técnicas más sofisticadas como el HPLC capilar o la detección por plasma por acoplamiento inductivo acoplado a masas.
- c) Perfeccionamiento del manejo de las técnicas instrumentales y adquisición de autonomía en el laboratorio.
- d) Mejorar la capacidad para la resolución de problemas.
- e) Ser capaz de trabajar en equipo, aspecto fundamental en cualquier grupo de investigación.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1. Instrumentación y reactivos

#### 3.1.1. Reactivos

- Patrón certificado de S para ICP con una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> [Merck KGaA (Alemania)], agua milli-Q [ChemLabor Millipore (EE.UU.)], AcN [Optima® LC/MS, Fisher Scientific (EE.UU.)], ácido fórmico [Merck KGaA (Alemania)].
- Proteína de estudio: Seroalbúmina Bovina (BSA).
- Patrones internos: BOC-Metionina-OH (BOC), N-Acetil-DL-Metionina (NAc) y BAX suministrados por Sigma-Aldrich (Suiza).
- Dilución isotópica post-columna: Patrón enriquecido (98,80%) de <sup>34</sup>S [ISOFLEX USA (EE.UU.)].
- Gases: Ar, gas de reacción O<sub>2</sub> (Alphagaz™ O<sub>2</sub>), y mezcla Ar/O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><21%), todos de Air Liquide (España).

Todos los reactivos fueron pesados una balanza Mettler Toledo NewClassic MS balance (Suiza).

#### 3.1.2. Instrumentación

##### 3.1.3.1. Cromatógrafo de líquidos HPLC capilar

Para realizar las separaciones cromatográficas se empleó un equipo de cromatografía capilar cap HPLC 1200 ((Agilent Technologies, Alemania), columna modelo BIOshell™ A400 Protein C4 (15 cm x 300 μm x 3.4 μm)[Sigma Aldrich] y horno Spark Holland (Mistral, Países Bajos).

##### 3.1.3.2. Espectrómetro de masas ICP-QQQ

Las medidas se llevaron a cabo con un equipo Agilent 8800 Triple Quad ICP-MS (Agilent Technologies, Japón).

Como sistema de introducción de muestra se utilizó el kit de interfase capilar G3680A (Agilent Technologies, Japón), compuesto de un nebulizador y una cámara de consumo total de cuarzo.

##### 3.1.3.3. Montaje post-columna

La pieza clave en la conexión post-columna es un conector T de 1/32" con volumen muerto nulo. En este punto se mezcla la corriente proveniente de la columna y el patrón enriquecido en azufre <sup>34</sup>S; el flujo resultante se introduce en el ICP a través de la cámara de consumo total.

El flujo post-columna es introducido en el sistema gracias a una jeringa Hamilton de 1 mL accionada por una bomba de jeringa digital KDS 410 (KD Scientific, EE.UU.).

Las conexiones empleadas para conectar la columna al equipo y el montaje post-columna, se realizaron con cables de sílice fundida (Agilent, Alemania) de 200 mm de longitud y de diámetros de 100  $\mu\text{m}$  para la conexión con el ICP y la jeringa, y 50  $\mu\text{m}$  en el caso de la columna.

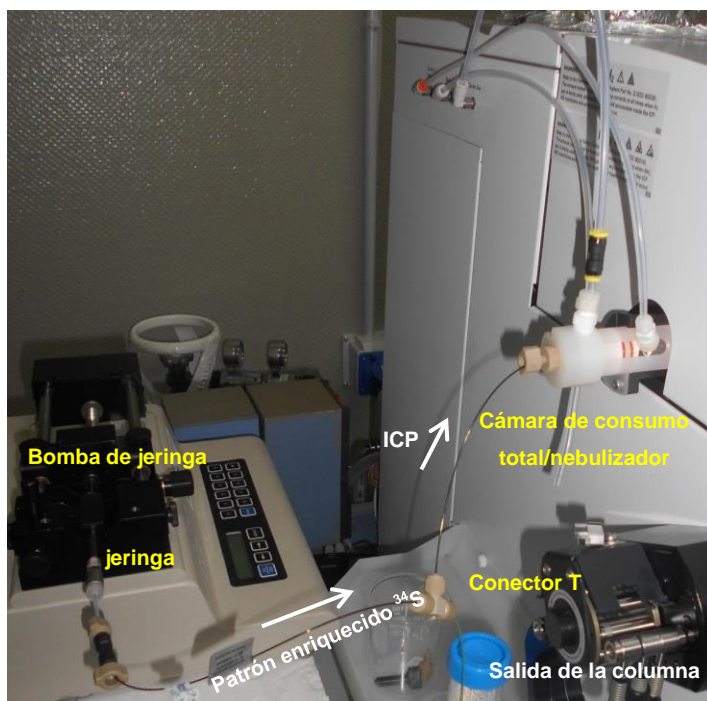


Figura 2. Montaje post-columna empleado en los ensayos de corrección de la sensibilidad.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Optimización de las condiciones de celda.

La determinación de azufre vía ICP-MS está limitada por la presencia de interferencias poliatómicas, que conducen a cuantificaciones erróneas y limitan la determinación de relaciones isotópicas en la cuantificación de proteínas usando dilución isotópica para la corrección de los cambios de sensibilidad, como ya se comentó en el apartado 1.4.2.

Estudiando la variación de la respuesta de un patrón de azufre de 50 ppb a distintos flujos de oxígeno se puede determinar que flujo óptimo de reacción. Se monitoriza el isótopo de azufre más abundante,  $^{32}\text{S}$ .

En abscisas se muestra el flujo de oxígeno introducido en el equipo y en ordenadas tres tipos de señales: la verde (*Std*) que representa al respuesta de la muestra (número de cuentas) para cada flujo de oxígeno, en azul el *BEC* o *Background Equivalent Concentration* o respuesta del blanco teórico que representa como concentración la intensidad de señal obtenida para el fondo y la roja (*Blk*) es la respuesta del blanco en número de cuentas por segundo (*CPS*).

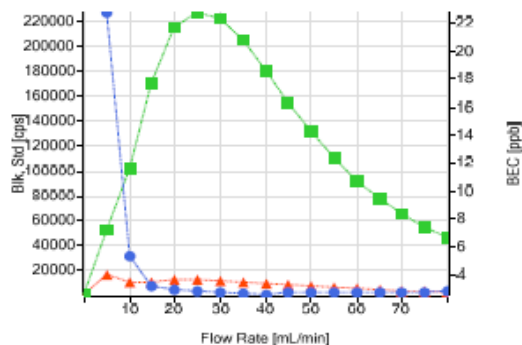


Figura 3. Variación de la intensidad de señal con el flujo de oxígeno (gas de reacción) introducido en el equipo.

El flujo óptimo de gas de reacción será el que proporcione la mayor señal para una misma cantidad de azufre medida, siempre y cuando el ruido generado sea mínimo (BEC), por lo tanto el flujo de interés es dado por el máximo de la señal verde y unos valores de BEC pequeños (línea azul).

De aquí en adelante se empleará un flujo de  $25 \text{ mL min}^{-1}$  de oxígeno comprimido en la celda de reacción.

### 4.2. Elección del patrón interno

El empleo de un patrón interno tiene como función anular la variabilidad asociada al volumen de inyección y corrige los errores al estimar los parámetros  $C_p$ ,  $f_p$  y  $d_p$  de la ecuación de flujo másico.

$$M_m = C_p d_p f_p \frac{A_s A_p^b}{A_p A_m^a} \frac{R_m - R_p}{1 - R_m R_n}$$

Criterios para la elección del patrón interno:

- La proteína a cuantificar y el patrón no deben coeluir.
- La resolución entre ambas señales debe ser la adecuada, como mínimo 1,5 (picos separados hasta línea de base).
- Buena forma de pico: pico gaussiano, simétrico.
- Elución en un tiempo razonable,  $k'$  entre 2 y 10. Valores inferiores a dos indican que eluye cercano al volumen muerto, por el contrario valores superiores a 10, revelan una retención excesiva.

A continuación se adjuntan los cromatogramas obtenidos para cada uno de los patrones estudiados: NAc, BOC y BAX y para la proteína (BSA):

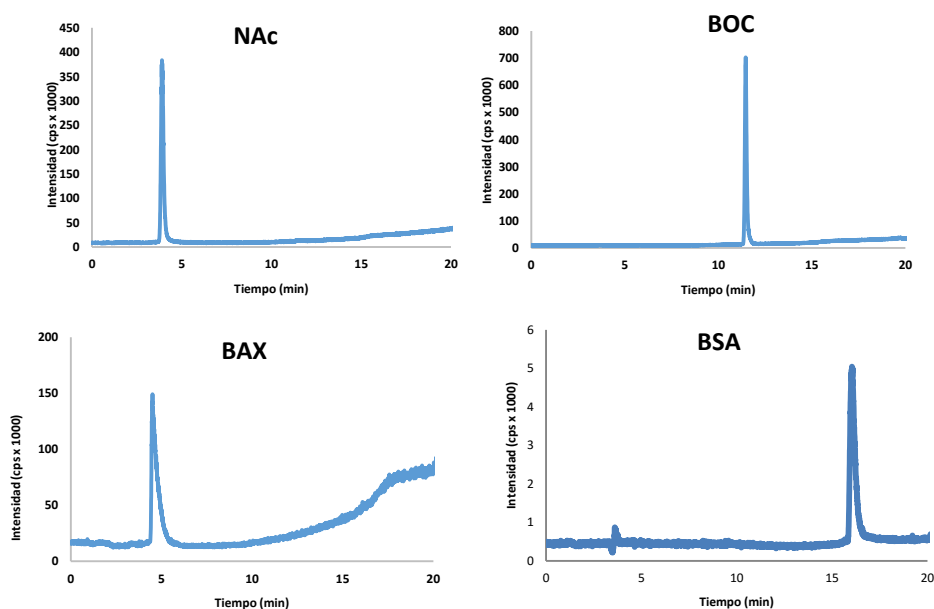


Figura 4. Cromatogramas obtenido para los tres patrones internos y la proteína de estudio, respectivamente.

El patrón BOC se perfila como el más adecuado para llevar a cabo una cuantificación absoluta de BSA, pues presenta una retención suficiente y adecuada (2,11); de los tres patrones es el que eluye en una región más cercana a la proteína de estudio disminuyendo así los cambios de sensibilidad entre ambas proteínas, la resolución es excelente y la forma de pico gaussiana.

Para realizar un estudio cromatográfico más completo se determinó la eficacia de la columna para cada uno de los cuatro compuestos, obteniéndose resultados muy buenos con eficacias  $> 20000$  para los dos compuestos de estudio, BOC y BSA.

### 4.3. Recuperación de la columna

El hecho de utilizar una técnica de separación cromatográfica previa en la cuantificación de un compuesto, implica tener en cuenta que no toda la cantidad de analito introducida en la columna cromatográfica va a eluir, existe un pequeño porcentaje que queda retenido dentro de la misma.

Para tener en cuenta este fenómeno se estima un parámetro denominado recuperación de la columna, generalmente se expresa en porcentaje o en tanto por uno.

La relación de áreas (cromatografía/FIA) permite determinar qué proporción de compuesto eluye de la columna. Los valores obtenidos para BOC y BSA fueron altos, lo que garantiza la recuperación de la mayor parte de los compuestos tras la separación:

$$\% \text{ Recuperación}_{BOC} = 92,02 \pm 2,52$$

$$\% \text{ Recuperación}_{BSA} = 98,14 \pm 2,74$$

Estos valores deben utilizarse como factores correctores sobre las áreas de proteína y patrón en la cuantificación.

#### ***4.4. Corrección de las variaciones en la sensibilidad durante la cuantificación absoluta de proteínas por cap-HPLC-ICP-MS.***

La dilución isotópica post-columna compensa los cambios de sensibilidad añadiendo un flujo constante de patrón enriquecido antes de entrar en el equipo de ICP-MS. La corrección se lleva a cabo calculando el ratio entre la señal de  $^{32}\text{S}$  (isótopo mayoritario en la proteína) y  $^{34}\text{S}$  (predominante en el patrón enriquecido).

Previamente se realizará una medida no corregida empleando un flujo post-columna de agua milli-Q de forma que permita ver claramente el poder correctivo de cada una de las distintas estrategias expuestas en este trabajo.

En todos los ensayos se midió un blanco (simplemente introduciendo las fases móviles en el ICP), y una mezcla de proteína y patrón interno.

##### ***4.4.1. Determinación del ratio de concentración BSA/BOC.***

Para evaluar la bondad de la corrección ha de tomarse un valor como referencia, para ello se calcula el cociente entre las concentraciones de BSA y BOC, corregido con la pureza de cada uno de los compuestos (93% para la BSA y 99% para BOC):

$$\left( \frac{C_{BSA}}{C_{BOC}} \right)_{\text{corregido}} = 0,89 \pm 0,05$$

#### 4.4.2. Corrección de los cambios de sensibilidad.

A continuación se adjuntan los cromatogramas obtenidos para el blanco y la mezcla BSA/BOC para cada una de las correcciones:

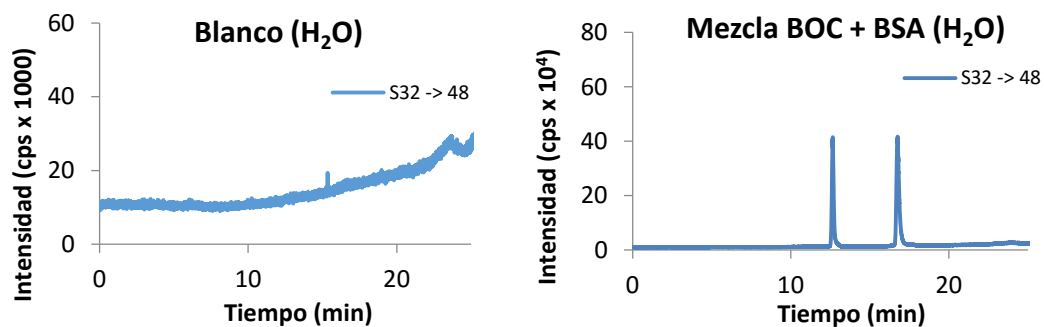


Figura 5. Cromatogramas registrados con un flujo post-columna de agua milli-Q, no corregidos. Blanco y mezcla proteína/patrón interno representados a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

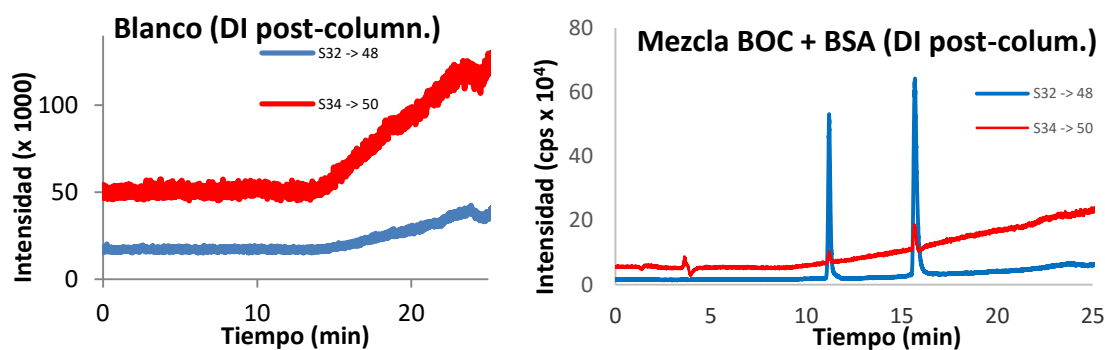


Figura 6. Cromatogramas registrados con un flujo post-columna de un patrón enriquecido en  $^{34}\text{S}$  (800 ppb). Blanco y mezcla proteína/patrón interno representados a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

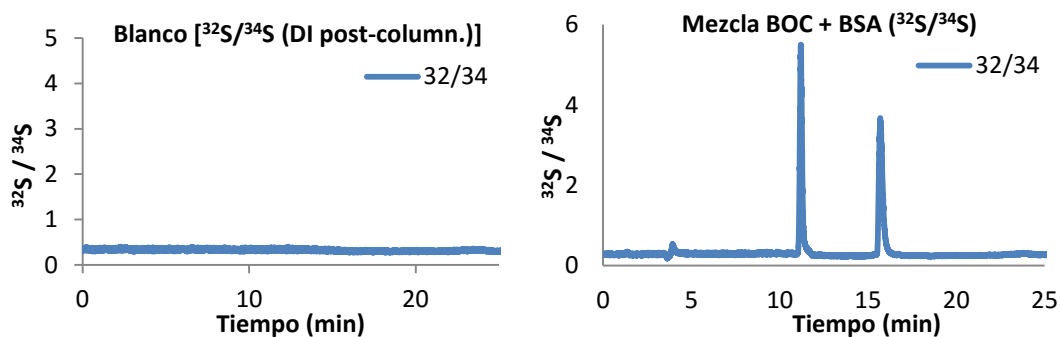


Figura 7. Cromatogramas registrados con un flujo post-columna de un patrón enriquecido en  $^{34}\text{S}$  (800 ppb). La señal ha sido corregida calculando el cociente  $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ , suprimiendo las variaciones en el factor de respuesta del azufre a lo largo del gradiente. Blanco y mezcla proteína/patrón interno representados a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

Si se calcula la razón de áreas entre la BSA y el BOC para cada experimento, teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación de la columna (apartado 4.3.) en tanto por uno (0,98 para la BSA y 0,92 para el patrón de BOC), se obtiene la relación de áreas corregida.

$$\left(\frac{A_{BSA}}{A_{BOC}}\right)_{\text{corregido}} = \frac{A_{BSA}}{A_{BOC}} * \frac{\frac{1}{\text{Recuperado}_{BSA}}}{\frac{1}{\text{Recuperado}_{BOC}}} = \frac{A_{BSA}}{A_{BOC}} * \frac{1}{0,98} / \frac{1}{0,92}$$

Teniendo esto en cuenta se obtiene el ratio de áreas con su incertidumbre, lo que se recoge en la tabla 1:

**Tabla 1. Relación de áreas y errores asociados para cada técnica de corrección de la sensibilidad.**

Corrección	$A_{BSA} / A_{BOC}$
teórico	0,89 ±0,05
H <sub>2</sub> O	1,32 ±0,06
Dilución isotópica post-columna	0,90 ± 0,05

El método de corrección por excelencia y que se ha empleado repetidas veces con este cometido es la dilución isotópica post-columna. El empleo del triple cuadrupolo permite llevar a cabo una medida (casi) libre de interferencias lo que repercute directamente en dos aspectos:

- Posibilita la determinación exacta y precisa de la relación isotópica de la muestra proporcionando una estimación exacta de la relación de áreas, de hecho se observa experimentalmente dicha relación toma un valor de 0,90, muy cercano al valor real proporcionado por la razón teórica de concentraciones (0,89).
- Garantiza que la variación en el factor de respuesta en ambos isótopos sea idéntica, compensando así las variaciones en la sensibilidad a lo largo de toda la línea de base ejerciendo un efecto corrector a cualquier porcentaje de modificador, de forma que se puede calcular la relación de áreas con total seguridad pues ambas áreas están corregidas. Esto se puede ver a través de los cromatogramas, si se observa el blanco de la figura 7 (ya corregido con la relación de isótopos), no existe ningún incremento en la línea de base durante el desarrollo del gradiente, sin embargo en el cromatograma homólogo sin corregir (blanco, señal <sup>32</sup>S, figura 6), la señal llega a duplicarse durante la separación.

En conclusión, la dilución isotópica post-columna se posiciona como la mejor solución para las variaciones de sensibilidad pues corrige dichos cambios en toda la separación y con una exactitud excelente.



## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfredo Sanz-Medel, *Heteroatom (isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications*, Analytical Bioanalytical Chemistry, Springer, 391 (2008) 885-894
2. Alfredo Sanz-Medel, María Montes-Bayón, Jörg Bettmer, M. Luisa Fernández-Sánchez, Jorge Ruiz Encinar, *ICP-MS for absolute quantification of proteins for heteroatom-tagged, targeted proteomics*, Trends in Analytical Chemistry, 40 (2012) 52-63
3. Alfredo Sanz-Medel, María Montes-Bayón, María del Rosario Fernández de la Campa, Jorge Ruiz Encinar y Jörg Bettmer, *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics* Analytical Bioanalytical Chemistry, Springer, 390 (2008) 3-16
4. Alfredo Sanz-Medel, *Heteroatom(isotope)-tagged genomics and proteomics*, Analytical Bioanalytical Chemistry, Springer, 390 (2008) 1-2
5. Jörg Bettmer, *Application of isotope dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics*, Analytical Bioanalytical Chemistry, Springer, 397 (2010) 3495-3502
6. Marcus Bantscheff, Markus Schirle, Gavain Sweetman, Jens Rick, Bernhard Kuster, *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*, Analytical Bioanalytical Chemistry, Springer, 389 (2007) 1017
7. S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*, Molecular and Cellular Proteomics, 1 (2002) 376-386.
8. R. Amanchy, D.E. Kalume, A. Iwahori, J. Zhong, A. Pandey, *Phosphoproteome analysis of HeLa cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)*, Journal of Proteome research, 4 (2005) 1661-1671.
9. S.E. Ong, L. J. Foster, M. Mann, *Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics*, Methods, 29 (2003), 124-130.
10. S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*, Nature Biotechnology, 17 (1999) 994-999.
11. L. DeSouza, G. Diehl, M.J. Rodrigues, J. Guo, A.D. Romaschin, T.J. Colgan, K.W. Siu, *Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and ICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, Journal of Proteome research, 4 (2005) 377-386
12. L. R. Zieske, *A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies*, Journal of Experimental Botany, 57, 7 (2006) 1501–1508
13. V.G. Keshamouni, G. Michailidis, C.S. Grasso, S. Anthwal, J.R. Strahler, A. Walker, D.A. Arenberg, R.C. Reddy, S. Akulapalli, V.J. Thannickal, T.J. Standiford, P.C. Andrews, G.S. Omenn, *Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung*

- cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype, *Journal of Proteome research*, 5 (2006) 1143-1154
14. Meng Wang, Weiyue Feng, Wenwei Lu, Bai Li, Bing Wang, Motao Zhu, Yun Wang, Hui Yuan, Yuliang Zhao y Zhifang Chai, Quantitative Analysis of Proteins via Sulfur Determination by HPLC Coupled to Isotope Dilution ICPMS with a Hexapole Collision Cell, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 9128-9134
  15. Christina Rappel, Dirk Schaumlöffel, The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, Springer, 390 (2008) 605-615
  16. Daniel Pröfrock, Andreas Prange, Compensation of gradient related effect when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6706-6715
  17. Silvia Diez Fernández, Naoki Sugishama, Jorge Ruiz Encinar y Alfredo Sanz-Medel, Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics, *Analytical Chemistry*, American Chemical Society, 84 (2012), 5851-5857
  18. Liuxing Feng, Dan Zhang, Jun Wang y Hongmei Li, Simultaneous quantification of proteins in human serum via sulfur and iron using HPLC coupled to post-column isotope dilution mass spectrometry, *Analytical Methods*, 6 (2014), 7655-7662
  19. Ana Pereira Navaza, Cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos mediante la integración de la espectrometría de masas elemental y molecular (2009)
  20. Dirk Schaumlöffel, Pierre Giusti, Hugues Preud'Homme, Joanna Szpunar y Ryszard Lobinski, Precolumn Isotope Dilution Analysis in nanoHPLC-ICPMS for Absolute Quantification of Sulfur-Containing Peptides, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 2859-2868.
  21. Pierre Giusti, Dirk Schaumlöffel, Jorge Ruiz Encinar y Joanna Szpunar, Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (2005) 1101-1107