

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**  
**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Trabajo Fin de Máster*

TÍTULO:

**Análisis cuantitativo de compuestos de fósforo mediante HPLC capilar  
y espectrometría de masas elemental**

AUTOR:

**Hugo Amor Álvarez**

TUTOR:

**Jorge Ruiz Encinar**

FECHA:

**Julio 2012, Oviedo**

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

**Certifica:**

Que el presente trabajo bajo su tutoría, titulado **“Análisis cuantitativo de modificaciones post-traduccionales en proteínas mediante HPLC acoplado a ICP-MS”** ha sido realizado en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, por el **alumno del Máster Universitario en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas, Hugo Amor Álvarez**, constituyendo el **Trabajo de Fin de Máster** del interesado, cuya presentación se autoriza.

Oviedo, 18 de Julio de 2012.

Firmado: Jorge Ruiz Encinar

Me gustaría agradecer este trabajo a las siguientes personas:

A mi tutor de proyecto Jorge Ruiz Encinar, por toda la orientación ofrecida para la realización de este trabajo.

A mis padres por haberme dado de nuevo la oportunidad de realizar este año de estudios en Oviedo.

A todos mis compañeros del máster por el buen rollo que manteníamos en clase, las cenas y todas las risas que nos echamos.

A todos los compañeros del laboratorio del Grupo de Espectrometría Analítica por el buen ambiente que me ofrecieron durante el periodo experimental, por los cafés y por las pachangas de fútbol.

Y un agradecimiento muy especial a Silvia, que estuvo conmigo durante todo el periodo experimental ayudándome, orientándome y “echándome broncas desproporcionadas cuando era necesario”, incluso sacrificando algún fin de semana para que yo pudiera terminar el trabajo. Muchas gracias, admiro mucho tu perseverancia y las ganas que le pones a las cosas, espero que te vaya todo muy bien durante la tesis doctoral, ¡mucho suerte!

**¡Gracias a todos!**

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1. LA PROTEÓMICA.....	8
1.1.1. El proteoma .....	8
1.1.2. Proteómica cuantitativa .....	9
1.1.2.1. Cuantificación relativa de proteínas .....	9
1.1.2.2. Cuantificación absoluta de proteínas.....	10
1.1.3. Las modificaciones post-traduccionales en proteínas .....	13
1.2. LA FOSFORILACIÓN EN PROTEÍNAS .....	14
1.2.1. La fosforilación en células eucariotas.....	14
1.2.2. Importancia y retos de la fosforilación.....	15
1.3. LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE ICP.....	16
1.3.1. Descripción general de la espectrometría de masas ICP .....	16
1.3.1.1. El nebulizador y la cámara de nebulización .....	17
1.3.1.2. La antorcha .....	19
1.3.1.3. La interfase .....	20
1.3.1.4. Lentes de enfoque.....	20
1.3.1.5. Celda de colisión/reacción .....	21
1.3.1.6. Cuadrupolo .....	21
1.3.1.7. El detector .....	21
1.3.2. Características analíticas del ICP-MS.....	22
1.3.3. Determinación de <sup>31</sup> P por ICP-MS .....	23
1.3.4. Acoplamiento de HPLC al ICP-MS.....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3. TRABAJO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>28</b>
3.1. EQUIPOS UTILIZADOS .....	28
3.1.1. Espectrómetro de masas ICP.....	28
3.2. REACTIVOS UTILIZADOS .....	30
3.3. EXPERIMENTOS REALIZADOS .....	31
3.3.1. Optimización del gas opcional ArO <sub>2</sub> .....	31
3.3.2. Desarrollo y caracterización del sistema μFIA-ICP-MS.....	36

3.3.3.	Caracterización analítica del método para la medida de especies de fósforo. ....	37
3.3.4.	Análisis de mezclas de especies de fósforo con capHPLC-ICP-MS.....	40
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1: Proceso de fosforilación / desfosforilación en células eucariota.

Figura 2: Aminoácidos fosforilados.

Figura 3: esquema de un equipo comercial ICP-MS.

Figura 4: esquema de la cámara de nebulización convencional con nebulizador Babington.

Figura 5: Esquema de funcionamiento de la antorcha de un equipo ICP-MS.

Figura 6: Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo.

Figura 7: Esquema de funcionamiento de un electrón multiplicador.

Figura 8: Esquema de un equipo de doble enfoque de ICP-MS.

Figura 9: Esquema de funcionamiento de un equipo con celda de reacción dinámica operando en tándem.

Figura 10: Espectrómetro de masas ICP utilizado, Agilent 7700.

Figura 11: Nebulizador de microflujos de consumo total.

Figura 12: A la derecha bomba de jeringa digital World Precision Instruments SP 100i. A la izquierda válvula de inyección Rheodyne 7520

Figura 13: Gráficas de la señal de medida del blanco para la optimización del flujo de Ar/O<sub>2</sub> en función de flujo del carrier gas.

Figura 14: Gráficas de la señal bruta del análisis para la optimización del flujo de Ar/O<sub>2</sub> en función de flujo del carrier gas.

Figura 15: Gráficas de la señal neta del análisis para la optimización del flujo de Ar/O<sub>2</sub> en función de flujo del carrier gas.

Figura 16: Esquema de montaje del sistema FIA

Figura 17: Cromatograma de reproducibilidad del sistema  $\mu$ FIA.

Figura 18: Cromatograma de calibrado de BNPP

Figura 19: Recta de calibrado a través de las áreas de pico de BNPP

Figura 20: Recta de calibrado a través de las alturas de pico de BNPP.

Figura 21: Cromatograma de BNPP+DBP

Figura 22: Cromatograma de BNPP+DBP+TEP+TMP sin utilización de flujo postcolumna

Figura 23: Cromatograma de BNPP+DBP+TEP+TMP con utilización de flujo postcolumna

# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1: Modificaciones post-traduccionales más comunes e importantes.

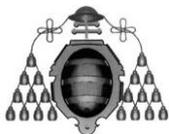
Tabla 2: Estructuras químicas de los compuestos de fósforo utilizados

Tabla 3: Propiedades de los compuestos fosforados utilizados.

Tabla 4: Condiciones experimentales del ICP-MS para la optimización del gas opcional.

Tabla 5: Resultado de reproducibilidad del sistema

Tabla 6: Gradiente cromatográfico empleado



# 1. INTRODUCCIÓN

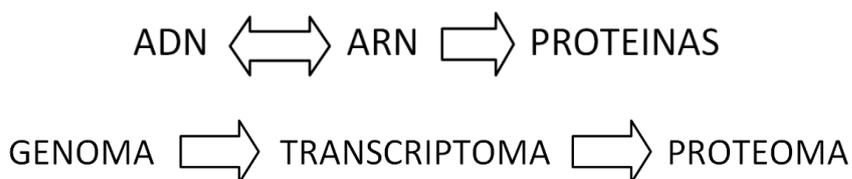
Actualmente existe un gran interés en la mejora y desarrollo de estrategias que faciliten el estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas para comprender en su totalidad los procesos biológicos que tienen lugar en una célula o tejido, que están implicadas en el desarrollo de muchas enfermedades o fenómenos tan importantes como el del envejecimiento. Además, casi todos los medicamentos o son proteínas o ejercen sus acciones a través de las mismas.

## 1.1. LA PROTEÓMICA

La proteómica consiste en el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma, célula o tejido mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. La proteómica puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias biológicas y su comportamiento biológico.<sup>1</sup>

### 1.1.1. El proteoma

La secuenciación del genoma humano ha sido concluida recientemente y se estima que de los aproximadamente 30000 genes del genoma humano pueden dar lugar a más de un millón de proteínas,<sup>4</sup> surge entonces la necesidad de conocer la función biológica de los productos génicos, las proteínas. Las proteínas son macromoléculas complejas constituidas por pequeñas subunidades denominadas aminoácidos, que realmente desarrollan las funciones vitales y forman la mayoría de los procesos celulares.<sup>3</sup>



- El genoma proporciona la información genética común a todas las células de un organismo.
- El transcriptoma es la parte del genoma que se expresa en una célula en una etapa específica de su desarrollo.
- El proteoma es el conjunto de proteínas codificadas por un genoma, una célula o un tejido. El proteoma de una célula es el reflejo del medio ambiente en que es estudiado.

El estudio del proteoma supera en envergadura y complejidad al del genoma. Un solo gen puede dar lugar a varias proteínas durante la transcripción génica, las cuales a su vez pueden sufrir modificaciones post-traduccionales (PTMs).<sup>4</sup> Además mientras que el



genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de la vida el proteoma tiene un carácter fuertemente dinámico debido a cambios en la abundancia y estructura de las proteínas, modificaciones producidas después de su traducción (PTMs) y localización subcelular.<sup>5</sup> Todo ello sucede como consecuencia directa de cambios en el entorno, estrés, administración de drogas, estado fisiológico, etc. Conocer el proteoma de un organismo implica tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por ese organismo, en un momento dado y en un contexto concreto de entorno y tiempo. Otra dificultad en el estudio del proteoma es el amplio rango de concentraciones que pueden presentar las diferentes proteínas en una muestra compleja. Por ejemplo en el suero humano las concentraciones varían del orden de los mg/ ml, como es el caso de la albumina, hasta concentraciones tan bajas del orden de los pg/ ml, como es el caso de algunas proteínas minoritarias con funciones importantes.<sup>2</sup>

### ***1.1.2. Proteómica cuantitativa***

El campo de la proteómica engloba un conjunto de metodologías destinadas al análisis de un gran número de proteínas, idealmente el estudio de proteomas completos, en un solo experimento,<sup>38</sup> a pesar de que este análisis global presenta muchas dificultades. Por otro lado las herramientas de MS han contribuido al gran avance actual en la caracterización de proteínas presentes en la muestra. Sin embargo, la determinación (o análisis cuantitativo) de proteínas es cada vez más importante para el estudio de los sistemas biológicos. De hecho, la mayor parte de los cambios producidos en un sistema biológico a causa de factores naturales, drogas o enfermedades se deben a cambios en los niveles de expresión de las proteínas (concentración) y, dicha información se obtiene solo gracias al análisis cuantitativo de esas proteínas.<sup>38</sup> Por ello, no es de extrañar que hoy en día la proteómica cuantitativa esté siendo cada vez más utilizada con fines de diagnóstico y pronóstico (determinación de biomarcadores) de patologías que sean clave para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.<sup>39</sup>

La cuantificación de proteínas se puede llevar a cabo por dos procedimientos básicos diferentes: (I) la determinación de la cantidad de una proteína en una muestra de forma absoluta, proporcionando la cantidad total de esa especie de interés y (II) la más empleada, la determinación relativa de la cantidad de una proteína dada comparando, al menos, dos estados celulares.<sup>38</sup> Obviamente la cuantificación absoluta permite fácilmente la cuantificación relativa, ya que conocidas las cantidades absolutas de las concentraciones de la proteína, el cálculo de la relación es inmediato.

#### ***1.1.2.1. Cuantificación relativa de proteínas***

##### **Métodos tradicionales**

Dentro de este grupo de técnicas la más utilizada es la electroforesis en gel 2D-PAGE. Para la cuantificación se marcan previamente las muestras con diferentes fluoróforos para



su posterior mezclado. Finalmente se lleva a cabo su análisis en el mismo gel (electroforesis diferencial en gel, DIGE) y se comparan las intensidades de emisión de las imágenes obtenidas. La relación entre las intensidades obtenidas en los distintos “spots” conduce directamente a la expresión diferencial de esa proteína en las diferentes muestras analizadas.<sup>1</sup>

### **Métodos con MS molecular**

La intensidad de la señal obtenida con MS molecular no es directamente proporcional a la concentración del péptido o proteína en la muestra ya que el proceso de ionización en esta metodología depende del péptido y de la presencia de otros componentes como sales, coelución con otros péptidos, disolvente, etc. Por ello, las metodologías desarrolladas en este campo son mayoritariamente relativas y son las siguientes:

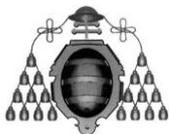
A) Comparación de los perfiles de intensidad de péptidos (PIP): se miden las intensidades de los péptidos de la proteína a estudiar en distintas muestras y se comparan tras su previa normalización.

B) Marcaje con isótopos estables (SIL): a la muestra que contiene los péptidos de estudio se le introducen los mismos péptidos pero marcados con isótopos estables que tienen las mismas propiedades químicas que los péptidos sin marcar y por tanto se ionizan igual pero poseen masas ligeramente diferentes y distinguibles por MS. Los espectros de masas obtenidos para la mezcla proporcionan un doblete de picos espectrales para cada péptido en estudio. La determinación de la intensidad relativa de esos dos picos permite comparar la abundancia del péptido natural con la muestra marcada. Sin embargo la mayoría de las veces la muestra de referencia es una muestra paralela (es decir otra muestra a la que no se le ha producido ninguna perturbación) en la que se puede introducir marcaje isotópico en diferentes momentos, antes de mezclarla con la muestra en estudio. Por lo que los datos cuantitativos se refieren a la abundancia de la proteína en los diferentes estados de estudio con respecto al de referencia. Según como se realice el marcaje existen dos estrategias: el marcaje “In Vivo” que consiste en introducir aminoácidos marcados con isótopos estables en los cultivos celulares (dentro de este grupo de técnicas se encuentra el método SILAC y de cultivo con <sup>15</sup>N) y el marcaje “In Vitro” que consiste en introducir isótopos marcados a través de reacciones químicas antes o después de la digestión proteolítica (dentro de este grupo de técnicas están: el marcaje con aminoácidos específicos ICAT y PhiAT, el marcaje de los grupos amino primarios iTRAQ, y el marcaje del extremo C terminal).<sup>1</sup>

#### **1.1.2.2. Cuantificación absoluta de proteínas**

### **Método de inmunoensayo ELISA**

La técnica ELISA es un inmunoensayo enzimático heterogéneo que se basa en la detección de conjugados de un antígeno o anticuerpo con un encima inmovilizados sobre



una fase sólida. Al añadir el sustrato de la encima, se obtiene un producto coloreado que se determina cuantitativamente con un espectrofotómetro.<sup>2</sup>

### **Métodos con MS molecular**

Una de las maneras de llevar a cabo la cuantificación absoluta mediante MS molecular es sintetizando un péptido de referencia con distintas marcas isotópicas (<sup>2</sup>D, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N), homólogo a uno de los péptido que forma parte de la proteína de interés y cuya secuencia tiene que ser conocida de antemano. Así se garantiza que su eficacia de ionización será la misma que la del péptido de interés. El péptido marcado se añade a la muestra, en cantidad conocida, justo antes de la digestión proteolítica de la proteína de interés. Al analizarlo por MS, se obtiene un espectro con doblete de picos espectrales, separados por la m/z correspondientes al marcaje. La síntesis de este péptido se lleva a cabo a través de la tecnología denominada AQUA.<sup>1</sup>

Otra manera similar es la conocida como QconCAT que se basa en la síntesis artificial mediante ingeniería genética de una cierta proteína marcada isotópicamente. Esta proteína está formada por la unión de vario péptidos trípticos marcados isotópicamente, correspondiendo cada uno de ellos a cada una de las proteínas que se quiere cuantificar. Esta proteína se mezcla con la muestra a analizar y se procede, al igual que en el caso anterior, a su digestión y análisis por MS molecular.<sup>1</sup>

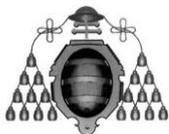
### **Métodos con MS elemental**

Mediante el ICP-MS acoplado a alguna de las técnicas de separación más comunes (CE y HPLC) se pueden cuantificar proteínas que contengan de una forma natural heteroátomos detectables por ICP-MS como es el caso de P, S, Se, I y metales.

Si los heteroátomos no están presentes en la proteína, se pueden introducir artificialmente antes del análisis por ICP-MS. Sin embargo, los estudios cuantitativos que existen basados en el marcaje con heteroátomos y su detección por ICP-MS son escasos.<sup>1</sup>

#### *Heteroátomos presentes de forma natural*

Como se viene comentando el ICP-MS se ha convertido en la herramienta analítica más importante y recomendada para los estudios de especiación elemental en material biológico. Un amplio número de proteínas contiene metales o semimetales de forma natural como grupos funcionales o estructurales. Sin embargo, estos heteroátomos están normalmente formando complejos de coordinación con las biomoléculas, que son uniones relativamente fáciles de romper y dependientes de la conformación espacial de las proteínas. En general, dichos enlaces se mantienen en condiciones suaves. La presencia de disolventes orgánicos, las condiciones de desnaturalización de proteínas, los pHs extremos o la posible presencia de encimas en las muestras producen la técnica de la estructura cuaternaria provocando la ruptura del complejo metal proteína y liberando al metal. Por todo eso los elementos más interesantes para la cuantificación de proteínas son los no metales y semimetales como el P, S, Se e I, ya que están unidos por un enlace covalente



puro a un único aminoácido de la estructura primaria de las proteínas. Además estadísticamente la probabilidad de que uno de esos heteroátomos esté presente en la proteína es casi del 100%.<sup>2</sup>

*Heteroátomos introducidos artificialmente "labelling"*

Existen principalmente tres estrategias para llevar a cabo el marcaje de las biomoléculas y la posterior cuantificación absoluta por MS elemental:

- Marcaje químico con reactivos quelantes de las tierras raras: Un ejemplo de esto es el quelante DOTA (ácido 1, 4, 7, 10 – tetraazaciclododecano-N,N', N'',N''' tetraácetico) que se une a las cisteínas y que puede contener diferentes lantánidos (Lu, Ho, Tb y Tm).
- Marcaje químico con nanopartículas metálicas: Un ejemplo de ello es el uso de anticuerpos marcados con oro que posibilitó la medida de inmunoglobulinas.
- Marcaje directo con heteroátomos: En la bibliografía solo existen 4 trabajos respecto a esta estrategia y en dos de ellas se marca a las proteínas en sitios sulfonados como son la cisteína y la metionina con un compuesto de Hg. Pero la cuantificación se realizó solamente con ESI-MS y el ICP-MS jugó un papel de detección de S y Hg y confirmación de la selectividad. Otros estudios intentaron el marcaje directo con compuestos iodados pero las medidas en ICP-MS demostraron que el proceso no tenía lugar de forma completa, ni en sitios específicos. Otro trabajo desarrollado en el grupo por Navaza y cols. Consistía en la cuantificación de péptidos que contenían tirosina mediante el marcaje directo con dos yodos en el anillo aromático de la tirosina.

*Estrategias para la cuantificación absoluta por MS elemental*

Existen principalmente tres estrategias para llevar a cuantificación absoluta por MS elemental:

- Calibración externa y/o adiciones estándar: se basa en la determinación de curvas de respuesta creadas a partir de patrones inorgánicos de los heteroátomos. O de la propia especie de interés, sintetizada previamente. Se calcula el factor de respuesta que sirve para el análisis cuantitativo de la proteína. Es necesario conocer la estequiometría heteroátomo-proteína que se puede determinar mediante MS molecular complementariamente.
- Calibración con patrones internos: se adiciona a la muestra un patrón interno que contiene el heteroátomo de interés. Esto minimiza los problemas asociados a variaciones de la señal a lo largo del análisis por cromatografía en HPLC-ICP-MS debido a la deriva de la señal entre muestras y patrones o a la propia inyección.
- Dilución isotópica: se está usando frecuentemente en el análisis mediante HPLC-ICP-MS. Consiste en la adición post-columna del isótopo enriquecido del elemento de interés, lo que se llama dilución isotópica inespecífica o la adición a la muestra de la



misma proteína a analizar pero enriquecida isotópicamente antes del proceso de separación cromatográfico, lo que se conoce como dilución isotópica específica.<sup>1</sup>

### 1.1.3. Las modificaciones post-traduccionales en proteínas

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) son una de las principales causas de la variabilidad del proteoma y por tanto de su complejidad. Las PTMs son procesos covalentes que cambian las propiedades de una proteína, ya sea procesándola proteolíticamente o modificando químicamente residuos de aminoácidos, o de ambas maneras. Estas PTMs provocan que una determinada proteína pueda dar lugar a diferentes versiones de la misma con funciones diferentes, determinando su actividad, localización, recambio o degradación y posibles interacciones con otras proteínas.<sup>6</sup>

Tabla 1: Modificaciones post-traduccionales más comunes e importantes.<sup>6</sup>

TIPO DE PTM	FUNCIÓNES BIOLÓGICAS
Fosforilación (pTyr, pSer, pThr)	Reversible Activación/desactivación de la actividad enzimática Control de interacciones moleculares Señalización
Acetilación	Estabilidad de la proteína, protección del N-terminal. Regulación de las interacciones proteína-ADN.
Acilación (Farnesil, Miristol, Palmitoil)	Localización celular Transmisión de señales Anclaje celular Regulación interacciones proteína-proteína
Glicosilación (N-Unión, O-Unión)	Reversible Proteínas excretadas Reconocimiento/señalización célula-célula O-GlcNAc
Sulfonación (sTyr)	Regulación interacciones proteína- proteína Regulación interacciones receptor ligando
Formación de enlaces disulfuro	Cruce intra e intermolecular Estabilidad de proteínas



Deamidación	Regulación interacciones proteína-ligando Regulación interacciones proteína- proteína
Metilación	Regulación de la expresión génica
Ubiquitinación	Destrucción señal Se modifica en la digestión tróptica con el dipéptido Gly-Gly

La cantidad y tipo de PTMs presentes en una proteína concreta como consecuencia de las condiciones ambientales constituye un tipo de “lenguaje molecular” que controla los aspectos esenciales de las funciones de las proteínas.<sup>7</sup> Se estima que alrededor de la decima parte del total de los genes de mamíferos codifican proteínas cuya función a es modificar a su vez otras proteínas, generando más de 200 tipos diferentes de PTMs.<sup>8</sup> En la tabla 1 se pueden apreciar algunas de las PTMs más comunes e importantes.<sup>6</sup>

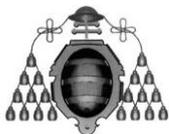
A pesar de la gran importancia de las PTMs en las funciones biológicas, todavía nos encontramos muy lejos de conocer su extensión e importancia concreta dentro de las células, debido a que su estudio a gran escala es muy complejo y también a la falta de métodos adecuados para ello.<sup>6</sup>

## 1.2. LA FOSFORILACIÓN EN PROTEÍNAS

La fosforilación es una de las PTMs más importantes, está implicada directamente en la regulación de diversos procesos incluyendo metabolismo, transcripción, degradación, homeostasis, señalización y comunicación celular, proliferación diferenciación y supervivencia celular.<sup>9</sup> Además se sabe que la fosforilación está directamente implicada en el desarrollo de enfermedades como el cáncer<sup>10</sup> y el alzhéimer<sup>11</sup>, esto despierta un gran interés en la mejora y desarrollo de estrategias para el estudio completo de las fosfoproteínas, es decir el análisis del fosfoproteoma.<sup>2</sup>

### 1.2.1. La fosforilación en células eucariotas

La fosforilación es un proceso dinámico y reversible controlado estrictamente por la acción equilibrada de las enzimas (proteínas) fosfatasas y quinasas, que catalizan la eliminación e incorporación de un grupo fosfato a las proteínas, respectivamente, en respuesta a estímulos de tipo celular o medioambiental.<sup>12</sup> En células eucariotas la fosforilación tiene lugar a través de la unión de un grupo fosfato, donado por una molécula de alta energía como es el adenosín trifosfato (ATP) al grupo hidroxilo presente



en sus cadenas laterales de serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr).<sup>13</sup> En la siguiente figura se esquematiza el proceso reversible de fosforilación en células de tipo eucariota.

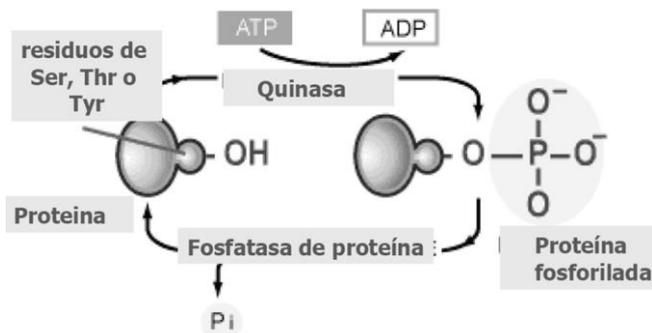


Figura 1: Proceso de fosforilación / desfosforilación en células eucariota.<sup>13</sup>

La fosforilación en los residuos serina y treonina es mucho más común que la fosforilación en tirosina, que es muy poco frecuente. En vertebrados la relación de fosforilación entre Ser/Thr/Tyr es de 1800/200/1, este fenómeno pone de manifiesto que la fosforilación en tirosina está fuertemente regulada y por tanto se encontrará en menor concentración en las muestras biológicas a analizar.<sup>13</sup> En la siguiente figura se muestran las moléculas fosforiladas de los aminoácidos citados anteriormente.

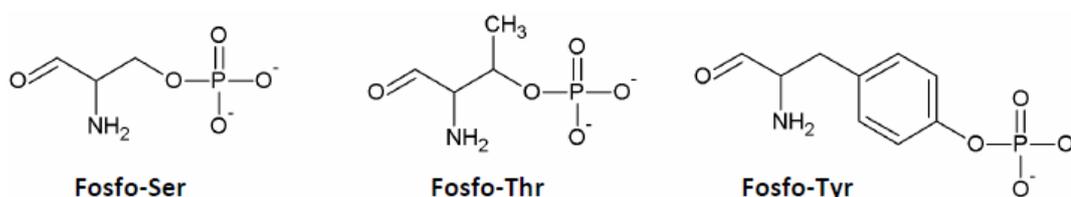
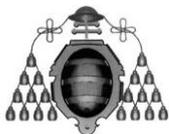


Figura 2: Aminoácidos fosforilados.<sup>16</sup>

### 1.2.2. Importancia y retos de la fosforilación

La importancia funcional de la fosforilación a nivel celular está claramente reflejada en el ser humano, hay aproximadamente unas 500 encimas quinasas y unas 100 fosfatasa, lo que representa un 2 % del total del genoma humano.<sup>4 y 14</sup> El conjunto de las quinasas forma una de las mayores familias de encimas en eucariotas y controlan la actividad de un 30 % de las proteínas celulares. Se estima que un tercio de todas las proteínas en las células eucariotas han sido están o serán fosforiladas en algún momento.<sup>15</sup>

Es ampliamente reconocido que las proteínas están involucradas en la mayoría de las funciones biológicas celulares. Por lo tanto, el reto fundamental de comprender como trabajan las células requerirá información sobre que proteínas están presentes, cómo, por



qué y cuando están presentes. En este contexto la proteómica puede definirse como el análisis sistemático de proteínas para comprender los procesos biológicos que ocurren en una célula o tejido.<sup>37</sup>

Sin embargo, mientras las funciones biológicas básicas de las proteínas son fundamentalmente codificadas, el control dinámico de la conformación y la función de las proteínas en cada instante, está fuertemente regulado por modificaciones post-traduccionales específicas (PTMs). Además, los tipos y cantidad de PTMs presentes en una proteína en concreto, son consecuencia de las condiciones de su entorno, constituyendo un “lenguaje molecular” que domina las funciones de la proteína. Han sido descritas más de 200 tipos de PTMs diferentes. De todas ellas, la fosforilación de proteínas ha sido estudiada con más detenimiento porque está directamente implicada en la modulación de la actividad de las proteínas y son vías para la transducción de señales con células.<sup>37</sup>

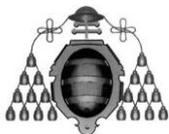
Desafortunadamente, el análisis de fosfoproteínas está muy lejos de ser sencillo por muchas razones. Primero, las fosfoproteínas tienen un papel de regulación y señalización y por lo tanto están presentes a un nivel de concentración muy bajo dentro de las células. Segundo, la fosforilación normalmente ocurre a niveles subestequiométricos. Tercero una sola proteína puede ser fosforilada y desfosforilada por diferentes quinasas y fosfatasa, respectivamente, en diferentes sitios (fosforilación multi-sitio) en diferentes momentos en un proceso dinámico.<sup>37</sup>

### **1.3. LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE ICP**

La espectrometría de masas elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del nombre en inglés Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) se introdujo a principios de los años 80 y se convirtió en una de las técnicas más versátiles y poderosas para la determinación elemental a niveles de traza y ultratrazas en muestras biológicas.<sup>29</sup>

#### ***1.3.1. Descripción general de la espectrometría de masas ICP***

La técnica ICP-MS se basa en la formación de un plasma de Ar por radiofrecuencia que tiene lugar en una antorcha (véase figura 3) que opera a una temperatura de entre 6000 y 10000 K.<sup>32</sup> A continuación, los iones formados en el canal central del ICP pasan a una interfase de extracción, que se encuentra a vacío moderado (Aprox. 1-2 torr), a través de los orificios de aproximadamente 1mm de dos conos de metal, el sampler y el skimmer. Posteriormente, el sistema de iones pasa a dos zonas de alto vacío en donde se encuentra el sistema de lentes de extracción (extraction lenses) cuya misión es enfocar el haz de iones que entrará a la celda de colisión en caso de que exista, que precede al analizador de masas, normalmente un cuadrupolo. Finalmente el detector convierte el haz de iones



en una señal eléctrica que es procesada.<sup>2</sup> El alto vacío es proporcionado por bombas turbomoleculares, en la primera zona de vacío se encuentran las lentes de enfoque a unos  $10^{-5}$  torr y en una segunda zona de vacío (separada de la anterior por una válvula de aislamiento) se encuentran la celda de colisión, el cuadrupolo y el detector a  $10^{-7}$  torr.

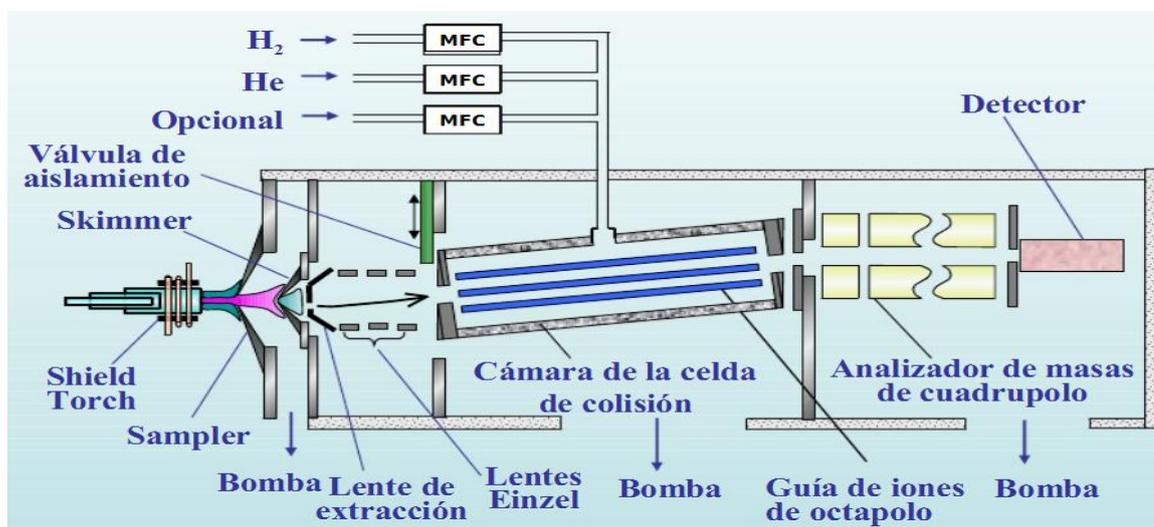


Figura 3: esquema de un equipo comercial ICP-MS.<sup>30</sup>

### 1.3.1.1. El nebulizador y la cámara de nebulización

La introducción de la muestra en el ICP es un proceso crítico en esta técnica. La gran mayoría de los análisis de ICP-MS se realizan sobre muestras líquidas, siendo necesaria una corriente de gas para que la muestra alcance el plasma. La forma más fácil de que la muestra líquida sea introducida en la corriente de gas es en forma de aerosol originado en un nebulizador. Después del nebulizador existe una cámara de nebulización, cuya función es la de separar y desechar las gotas grandes de la solución que se hayan formado en el proceso de pulverización.<sup>34</sup>

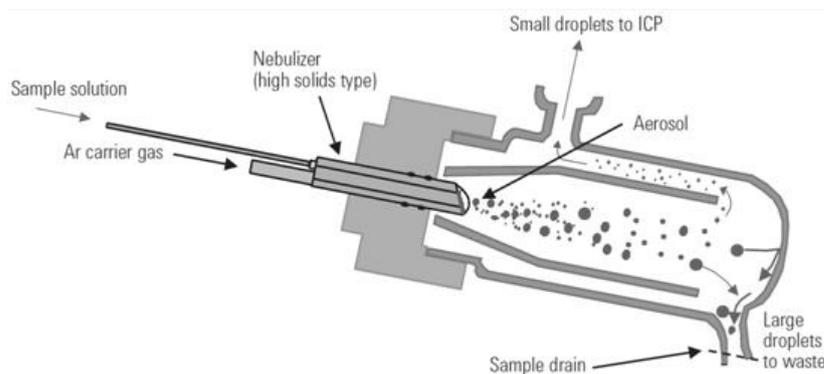
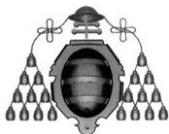


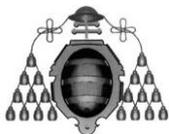
Figura 4: esquema de la cámara de nebulización convencional con nebulizador Babington.<sup>33</sup>



La eficiencia del transporte del aerosol se define como el porcentaje de masa de solución nebulizada que llega al plasma. Para que este porcentaje sea alto es necesario que el nebulizador produzca gotas inferiores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Generalmente la mayoría de los nebulizadores producen aerosoles con una amplia distribución de gotas de diámetros superiores a 100  $\mu\text{m}$ . El primer objetivo de la cámara de nebulización es separar las gotas grandes (superiores a 10  $\mu\text{m}$ ) del gas y desecharlas. Cuando el flujo de gas con el aerosol entra en la cámara de nebulización, sufre cambios profundos en su dirección de modo que las gotas grandes se estrellan sobre las paredes. Estas gotas que chocan con las paredes se desechan mediante drenaje. La cámara de nebulización asegura que solamente las gotas pequeñas permanecen en suspensión en el flujo de gas que llega al plasma. Con esto se pierde un 99 % de muestra en solución.<sup>34</sup> La cámara de nebulización es refrigerada por medio de un sistema Peltier que la mantiene a unos 2 °C para muestras acuosas.<sup>33</sup>

Existen diversos tipos de nebulizadores, cada uno de ellos con sus ventajas y sus inconvenientes, a continuación se comentan los principales:<sup>34</sup>

- **Nebulizador Cross-Flow (Flujo cruzado):** Estos nebulizadores son menos susceptibles al bloqueo que cualquier otro, aunque también puede ocurrir. Se basa en un spray ascendente donde un chorro horizontal de gas pasa o cruza la parte superior del tubo por donde se inyecta la muestra, rompiéndose en una nube de pequeñas gotas. Esto permite que funcione con bomba peristáltica, que es la encargada de mantener un caudal de entrada al nebulizador constante. Sus ventajas son que es bueno para todos los propósitos analíticos, resistente al ácido fluorhídrico (HF), económico y difícilmente obturable, está indicado para propósitos generales.
- **Nebulizador Concéntrico o Meinhard:** Existen de diversos tipos. Están basados en la pulverización de la muestra líquida introducida a través de un tubo central por medio de un flujo de Ar que viaja en un tubo externo y concéntrico al de la muestra. Sus principales ventajas son que mejora considerablemente la relación señal/ruido y minimiza el gasto de Ar; sin embargo presentan el inconveniente de que se obturan fácilmente por acumulación de micropartículas o sólidos disueltos, además están contruidos de vidrio por lo que no son resistentes al HF y son relativamente caros.
- **Nebulizador Microconcentrico:** Es del tipo Meinhard pero con una apertura del tubo de muestra mucho más pequeña. Es perfecto para la inyección de volúmenes de muestra pequeños (40-100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) pero se obtura con partículas en suspensión de tamaño superior a 10 micras.
- **Nebulizador Babington:** La característica esencial de este tipo de nebulizador es que el líquido fluye libremente sobre una apertura pequeña mejor que pasando a través de un capilar fino y esto presenta una gran tolerancia a los sólidos disueltos.
- Existen otros tipos de nebulizadores que son utilizados para usos muy específicos y emplean cámaras de nebulización especiales. Algunos de estos nebulizadores utilizados en proteómica se describen en el apartado 1.3.4.

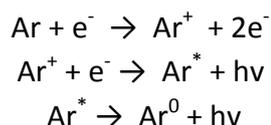


### 1.3.1.2. La antorcha

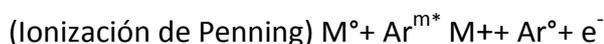
La antorcha consiste en tres tubos concéntricos, el central para el flujo laminar de Ar portador (carrier gas) que arrastra a la muestra, el concéntrico a este para el Ar auxiliar (auxiliary gas) que hace una acción de refrigeración y el exterior para el Ar plasmógeno (plasma gas), siendo estos dos últimos flujos introducidos de forma tangencial. La antorcha está rodeada por una bobina de cobre de 2-4 vueltas que es la que genera la radiofrecuencia (de 27 a 40 MHz), producida en un sistema generador de radiofrecuencias externo, y por su interior circula agua con objeto de refrigerarla.<sup>2</sup>

Podemos definir el plasma como cualquier volumen de gas con parte de sus moléculas o átomos ionizados y coexistiendo a alta temperatura (8000 K) en una masa de iones, electrones, átomos neutros ó átomos excitados.<sup>34</sup> Debido a las altas temperaturas del plasma la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada.

En el proceso de generación del plasma, los iones de Ar y los electrones libres presentes son acelerados siguiendo trayectorias anulares, debido a la alternancia del campo magnético presente generado por el generador de radiofrecuencia. Por efecto Joule, en este caso de fricción iónica y electrónica, se consiguen energías altísimas, llegando a obtener temperaturas de hasta 10000 K en las zonas de máxima intensidad de campo. Coexistiendo con el plasma encontramos al menos las siguientes especies iónicas: electrones ( $e^-$ ), iones de argón ( $Ar^+$ ), átomos de argón en estado fundamental ( $Ar^0$ ), átomos de argón excitados ( $Ar^*$ ), moléculas de argón ionizadas ( $Ar^{2+}$ ), neutras ( $Ar_2^0$ ) y excitadas ( $Ar_2^*$ ). Con este batiburrillo de especies, es de esperar que se produzcan procesos de recombinación radiante del tipo:<sup>34</sup>



En el núcleo del plasma se alcanzan temperaturas de hasta 10000 K. El nebulizador perfora el plasma y las moléculas de muestra son calentadas por conducción y radiación cuando atraviesan el plasma anular. En el centro del canal se alcanzan temperaturas de 6000 a 7000K. Los iones generados son generalmente monoatómicos y monopositivos. Conociendo la temperatura en el canal central y los valores de las primeras energías de ionización, se sabe que la mayoría de los elementos se ionizarán y aquellos átomos con valores inferiores a 10 eV lo harán en más de un 50%.<sup>34</sup> Los principales mecanismos de ionización de la muestra son la ionización de impacto electrónico y la ionización de Penning:



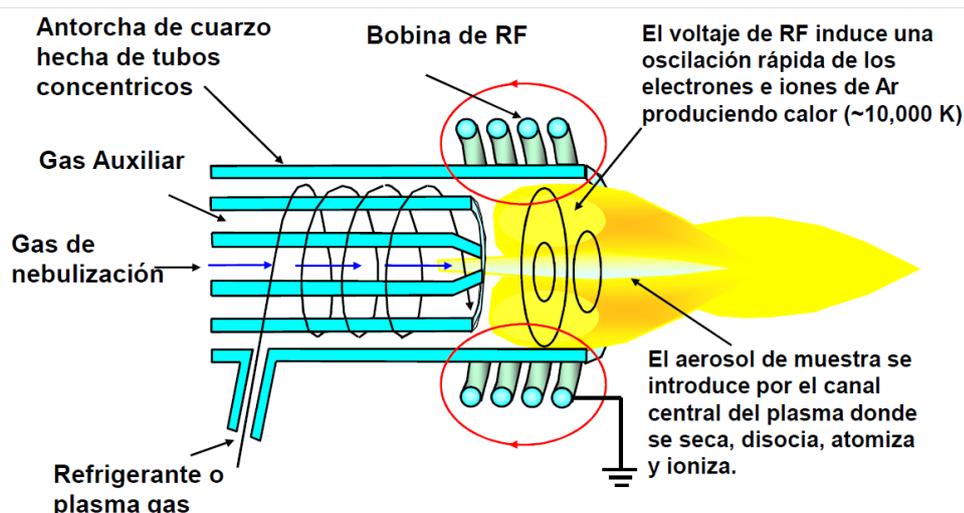
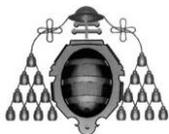


Figura 5: Esquema de funcionamiento de la antorcha de un equipo ICP-MS.<sup>33</sup>

Es una fuente de ionización que opera a presión atmosférica y que permite la introducción en continuo de muestras sólidas mediante ablación láser (LA), líquidas mediante nebulización y gaseosas a través del acoplamiento con cromatografía de gases (GC).<sup>2</sup>

#### 1.3.1.3. La interfase

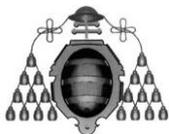
La función de la interfase es extraer el gas del plasma que es representativo de la muestra original. La interfase está compuesta por dos conos, el Sampler y el skimmer que inyectan el flujo del plasma en la zona de vacío por medio de un vacío diferencial, de presión atmosférica (760 Torr) donde se encuentra el plasma, hasta unos 2 Torr que existe en la zona entre conos. Este vacío es generado por medio de una bomba rotatoria.<sup>34</sup>

El sampler suele estar hecho de Ni o Pt. Aunque el Ni es el mejor en la relación calidad/precio, si se introducen materiales orgánicos se debe utilizar conos de Pt ya que es menos susceptible de degradación que el Ni, en el caso de que se inyecte agua regia no se deben de utilizar los conos de Pt ya que esta es la única mezcla ácida que ataca al Pt.<sup>34</sup>

El skimmer es más pequeño y menos robusto que el sampler, sobre todo en la punta, la cual es mucho más aguda y regular. Los conos skimmer se colocan generalmente entre 6 a 7 mm de distancia del de muestreo y también se fabrica con Ni o Pt. La punta de este cono tiene una repercusión directa sobre la sensibilidad y el nivel de interferencias poliatómicas.<sup>34</sup>

#### 1.3.1.4. Lentes de enfoque

La función de las lentes de enfoque es transportar los iones procedentes del skimmer al espectrómetro de masas. Cada lente incorpora un disco central para prevenir que los fotones del plasma puedan llegar al detector, que se denomina photon stop.<sup>34</sup>



#### 1.3.1.5. Celda de colisión/reacción

La función principal de la celda de colisión/reacción es la eliminación de interferencias. Suele ser un octapolo o exapolo. Este elemento del equipo es explicado con mayor detalle en el apartado 1.3.3.

#### 1.3.1.6. Cuadrupolo

La función del espectrómetro de masas cuadrupolar consiste en separar los iones en función de su relación carga masa. Consiste en cuatro barras de metal que se encuentran paralelas y equidistantes al eje. Idealmente estas barras tienen una forma hiperbólica. La tolerancia en cuanto a las dimensiones de construcción es de 10  $\mu\text{m}$  o menos. Las barras opuestas están unidas. Voltajes DC y RF de amplitud  $U$  y  $V$  respectivamente se aplican a cada par. El voltaje DC es positivo para una parte del par y es negativo para el otro. El voltaje RF de cada par tiene la misma amplitud pero tienen signo opuesto. La figura siguiente nos muestra como se aplican estos potenciales sobre los polos.<sup>34</sup>

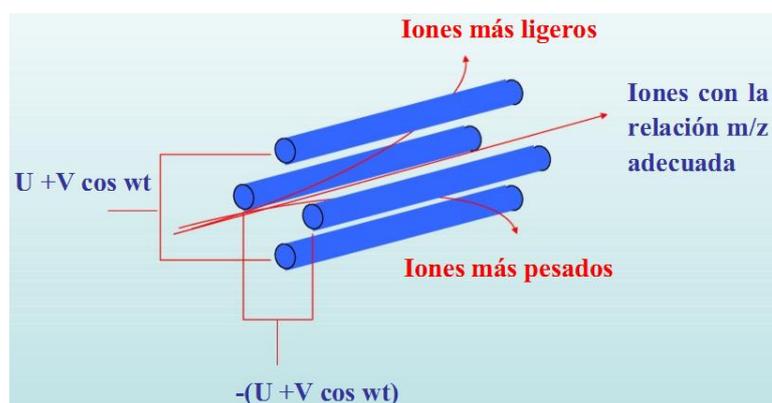
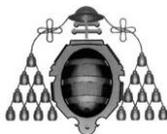


Figura 6: Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo.<sup>30</sup>

Las trayectorias de los iones están determinadas por  $U$ ,  $V$ ,  $m/z$  y otros parámetros fijos tales como el radio de las barras y la frecuencia RF. Para la mayoría de los valores de  $a$  y  $q$ , los campos  $R_f$  y  $D_c$  se desplazan fuera de las barras. Tales trayectorias se las denomina inestables ya que los iones tienen caminos inestables. Los iones con caminos estables son aquellos que se encuentran dentro de las barras.<sup>34</sup>

#### 1.3.1.7. El detector

El más utilizado es el electrón multiplicador (Channeltron electron multiplier). Es un tubo de vidrio abierto con un cono en una terminación recubierto de un material semiconductor. Para la detección de iones positivos, el cono es sometido a un alto potencial negativo (aproximadamente  $-3\text{kV}$ ), cuando los iones salen del analizador de masas, son atraídos por el potencial negativo del cono. Cuando los iones chocan con su



superficie, se originan uno o más electrones secundarios. El potencial dentro del tubo varía continuamente con la posición, tal que los electrones secundarios se mueven hasta llegar a otra zona donde se originan otros electrones secundarios, y así sucesivamente, generándose una señal eléctrica (analógica o digital) que es procesada por un software.<sup>34</sup>

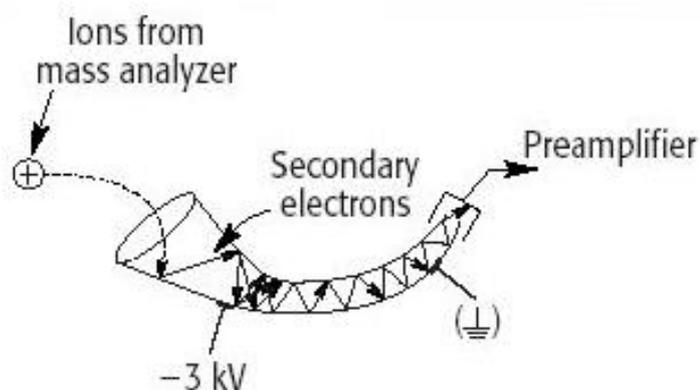


Figura 7: Esquema de funcionamiento de un electrón multiplicador.<sup>34</sup>

### 1.3.2. Características analíticas del ICP-MS

Las principales características analíticas de esta técnica, que la convierten en el complemento ideal de las técnicas espectrometría de masas moleculares, utilizadas principalmente para la identificación y caracterización de especies en muestras complejas, se pueden resumir en:

- Sencillez, rapidez, robustez respecto a la matriz analizada, especificidad y extremada sensibilidad en la determinación de elementos traza y ultratrazo (límites de detección del rango de los ppb y ppt para la mayoría de los elementos).<sup>2</sup>
- Capacidad multi-elemental y multi-isotópica.<sup>2</sup>
- Rango dinámico muy amplio (6-8 órdenes de magnitud).<sup>2</sup>
- La señal obtenida es independiente de la estructura de la especie, de la matriz en la que se encuentre y del disolvente utilizado en la disolución, siendo directamente proporcional a la masa del elemento. Esto implica que, en condiciones adecuadas, es posible emplear el ICP-MS para cuantificar de forma absoluta los heteroátomos presentes en una muestra biológica cualquiera.<sup>2</sup>

Esta última característica citada responde al objeto del título del presente trabajo, ya que se pretende en definitiva elaborar un método de cuantificación absoluta para el fósforo (heteroátomo en muestra biológica proteica).

En el contexto del presente trabajo es importante resaltar las posibilidades de acoplamiento del ICP-MS con técnicas de separación poderosas (HPLC, 2D-PAGE, CE, GC,



etc.), lo que se conoce como técnicas híbridas. La especiación elemental se ha convertido de esta manera en una técnica habitual en los estudios de biomoléculas que contengan elementos o heteroátomos detectables por ICP (entendiendo como tal todos los elementos de importancia biológica de la tabla periódica, excepto C, N, H y O). Los heteroátomos pueden estar presentes en las biomoléculas de forma natural o haber sido introducidos intencionadamente como marcajes para la determinación.<sup>2</sup>

### 1.3.3. Determinación de <sup>31</sup>P por ICP-MS

La cuantificación del grado de fosforilación de cada sitio dentro de una proteína es crítica para la interpretación de los procesos celulares, no obstante, la identificación de los sitios de fosforilación de las proteínas también es importante para conocer las funciones biológicas de estas fosfoproteínas, como se ha comentado en el apartado 1.1.3.

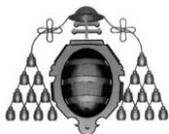
Los instrumentos ICP-MS más empleados son los que tienen como analizador de masas un cuadrupolo (Q) ya que presentan el precio más asequible y con alta sensibilidad para la mayoría de los elementos. La medida de <sup>31</sup>P mediante ICP-MS con analizador convencional de cuadrupolo, presenta algunas limitaciones. Aparte de su carácter monoisotópico y de que su potencial de ionización es elevado (10.484 eV), el problema más serio es la presencia de severas interferencias poliatómicas a  $m/z \sim 31$  (<sup>14</sup>N<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>15</sup>N<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>14</sup>N<sup>17</sup>O<sup>+</sup>, <sup>62</sup>Ni<sup>2+</sup>, <sup>12</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub><sup>16</sup>O<sup>+</sup>, etc., siendo las dos primeras especies las más comunes en darse) que solapan la señal la señal analítica en los ICP-MS con cudrupolos convencionales. Sin embargo, estos problemas se pueden corregir con el empleo de equipos ICP-MS con características más especiales que permiten la minimización o eliminación de dichas interferencias manteniendo una sensibilidad elevada, como equipos con analizadores de doble enfoque (alta resolución), celas de colisión/reacción o de reacción dinámica.<sup>17</sup>

- ICP-MS de doble enfoque o alta resolución: se basa en el empleo de un analizador de masas de sector magnético seguido de un analizador de sector electrostático o viceversa, de modo que controlando la anchura de las rendijas de entrada y salida del sector magnético es posible separar el <sup>31</sup>P de las interferencias poliatómicas. Estos equipos pueden operar con un poder de resolución\* (R) bajo (Aprox. 300), medio (Aprox. 4000) o alto (Aprox. 10000). Trabajando con un poder de resolución medio ya se podría conseguir la separación espectral necesaria para la detección de <sup>31</sup>P. El gran inconveniente de estos equipos es su elevado coste.<sup>1</sup>

\*El poder de resolución R, es la capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre masas próximas entre sí, y se define como:

$$R = m/\Delta m$$

En donde  $\Delta m$  es la diferencia entre masas de dos picos adyacentes y  $m$  la masa media de los dos. Los dos picos se consideran separados si la altura del valle entre los dos no



es superior a un cierto porcentaje (normalmente un 10 %) de la altura media de los mismos.

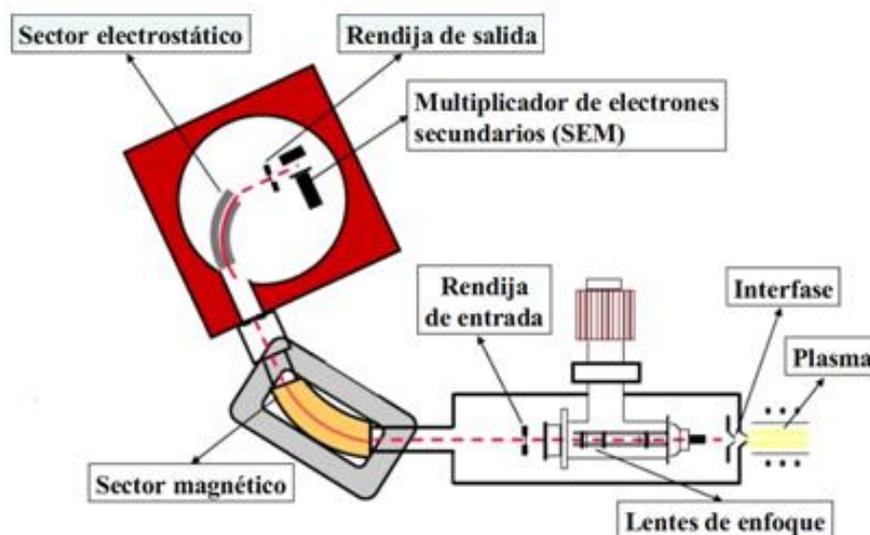


Figura 8: Esquema de un equipo de doble enfoque de ICP-MS.<sup>30</sup>

- ICP-MS con celda de colisión/reacción: mediante el empleo de un gas de colisión/reacción (He, Xe, H<sub>2</sub> o mezclas de ellos) que se introduce en una celda presurizada, situada justo antes del analizador cuadrupolo, es posible eliminar las interferencias poliatómicas que afectan a un determinado elemento, la elección del gas de colisión/reacción depende del tipo de interferencia que se pretenda eliminar. Para eliminar las interferencias de <sup>31</sup>P se suele utilizar He.<sup>17</sup> En la parte experimental del presente trabajo se ha utilizado un equipo con este sistema de eliminación de interferencias ya que proporciona buenos resultados en relación al coste. El esquema de un equipo ICP-MS que utiliza esta tecnología (que es la más común) se puede observar en la figura 3.
- ICP-MS con celda de reacción dinámica: permite la oxidación del P al reaccionar con oxígeno introducido en la celda de reacción dinámica, situada justo antes de la entrada al cuadrupolo analizador, dando lugar a <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup>. De este modo se detecta el óxido formado a m/z ~ 47, en donde la señal de fondo debida a interferencias poliatómicas es mucho más baja que a m/z ~ 31.<sup>1</sup> Además estos equipos con celda de reacción dinámica suelen ir acompañados de dos cuadrupolos pudiendo realizar análisis en tándem lo que mejora muy considerablemente la relación señal ruido. Recientemente Silvia Diez y cols. han publicado una investigación a cerca del análisis de <sup>31</sup>P y el <sup>32</sup>S en fosfopéptidos con un equipo de estas características obteniendo excelentes resultados.<sup>31</sup>

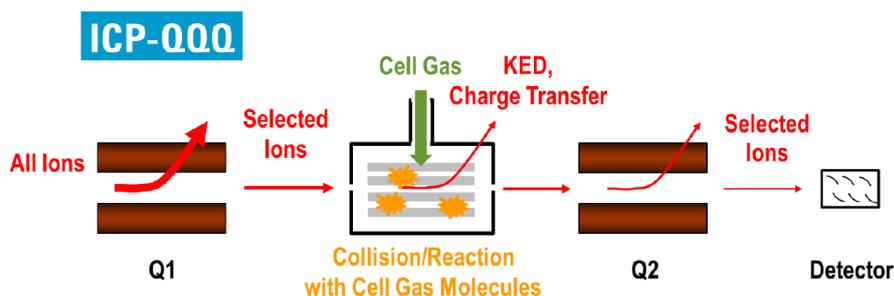


Figura 9: Esquema de funcionamiento de un equipo con celda de reacción dinámica operando en tandem.<sup>31</sup>

### 1.3.4. Acoplamiento de HPLC al ICP-MS

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP)HPLC es la técnica de separación más empleada en la separación de péptidos y proteínas. Sin embargo, el análisis cromatográfico requiere el empleo de fases móviles con altos porcentajes de modificador orgánico (acetonitrilo o metanol). A pesar de que el acoplamiento entre la salida de la columna y la entrada del nebulizador es sencillo y directo, las condiciones cromatográficas de separación están limitadas por la utilización de altos contenidos de disolvente orgánico (a partir de 25 % de metanol y 10 % de acetonitrilo a 1 ml/min) afectan negativamente a la estabilidad del plasma, produciendo una marcada disminución de la señal (disminución de la sensibilidad) o incluso el apagado del plasma, además de la generación de depósitos de carbono en los conos de la interfase produciendo también una disminución de la sensibilidad pudiendo producirse la obturación del cono exterior como consecuencia extrema.<sup>17</sup>

Entre las posibles opciones para minimizar estos fenómenos no deseados están por un lado, el empleo de membranas de desolvatación, adición de oxígeno al plasma por medio de gas ArO<sub>2</sub> como gas opcional (para esta operación se necesitarían conos de interfase contruidos en Pt; en la parte experimental del presente trabajo se ha utilizado gas ArO<sub>2</sub> adicionado al plasma) o el enfriamiento de la cámara de nebulización a temperatura por debajo de 0 °C (normalmente -5 °C), pero estas alternativas no podrían solucionar el problema por si solas;<sup>17</sup> por otro lado existe otra alternativa muy prometedora en estudios bioanalíticos, consistente en el uso de cromatografía de líquidos capilar (capHPLC) que utiliza flujos de 2 a 20 µl.<sup>23</sup>

Una de las mayores ventajas del análisis de fosfopéptidos mediante capHPLC la alta eficacia de separación que presenta además del bajo consumo de muestra (la cantidad de muestra biológica en la mayoría de los casos es bastante limitada) y fases móviles. Otra gran ventaja es que el bajo flujo de fase móvil empleado, permite que las características del plasma obtenido sean muy similares a las del plasma seco. Esto se traduce en una drástica reducción en los iones poliatómicos (<sup>15</sup>N<sup>16</sup>O<sup>+</sup> y <sup>14</sup>N<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>) que interfieren en la

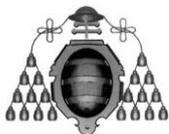


detección del  $^{31}\text{P}$ , lo que produce fondos más bajos y por tanto mayores límites de detección.<sup>23</sup>

Existe un problema con respecto al acoplamiento entre capHPLC e ICP-MS ya que los nebulizadores convencionales no son compatibles con los bajos flujos empleados en capHPLC y tampoco lo son las cámaras de nebulización porque se producen pérdidas de resolución cromatográfica a causa de sus volúmenes muertos. Se necesitan por lo tanto micronebulizadores de alta eficacia que trabajen de forma óptima con los microflujos empleados en la cromatografía.<sup>24</sup>

A partir de las primeras investigaciones aplicando capHPLC-ICP-MS en estudios de fosforilación<sup>25, 26 y 28</sup> se fueron desarrollando distintas interfaces con el fin de mejorar la eficacia en la nebulización.<sup>27</sup> En los distintos trabajos se utilizaron nebulizadores comerciales y comerciales modificados, y se compararon las propiedades de los diferentes nebulizadores para su uso en capHPLC-ICP-MS para la determinación del grado de fosforilación de las distintas proteínas a través de la comparación de las señales de  $^{31}\text{P}$  obtenidas para cada una de ellas. Los distintos nebulizadores fueron los siguientes:

- Nebulizador estándar de PFA con cámara de nebulización de bajo volumen.<sup>25 y 26</sup> El principal inconveniente que presenta este nebulizador es que los resultados obtenidos parecen no ser muy fiables porque al no ser un nebulizador de consumo total pueden existir especies de fósforo que no se nebulicen y por lo tanto no se detecten.<sup>17</sup>
- Nebulizador microconcéntrico con membrana de desolvatación para eliminación de fase orgánica.<sup>28</sup> Los principales inconvenientes son: las adsorciones inespecíficas de compuestos de fósforo en la membrana y la pérdida de resolución cromatográfica al obtener picos anchos debido a su gran volumen.<sup>17</sup>
- Nebulizador de alta eficacia de inyección directa (DIHEN) convencional y una modificación de éste con la introducción de un capilar (20  $\mu\text{m}$   $D_{\text{interno}}$ , 90  $\mu\text{m}$   $D_{\text{externo}}$  y 25 cm largo) en el interior del capilar de vidrio del nebulizador con el fin de minimizar el volumen muerto.<sup>28</sup> Este nebulizador modificado presenta la mejor resolución cromatográfica de todos los estudiados pero tiene el inconveniente de no poder trabajar con flujos superiores a 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  debido a la alta presión que ejerce el capilar interno al paso del flujo.<sup>17</sup>
- Nebulizador de consumo total (CE-100 de electroforesis capilar). Sobre este nebulizador se estudiaron dos variantes, por un lado el nebulizador comercial y por otro lado el nebulizador comercial modificado con un capilar de nebulización de menor diámetro interno, ambos nebulizadores son conectados a la antorcha a traves de una cámara de nebulización de volumen interno pequeño y de forma directa.<sup>27</sup> La sensibilidad y la estabilidad a flujos bajos obtenidas fueron buenas y fue mejor trabajando con el nebulizador modificado.<sup>17</sup> Este nebulizador ha sido el utilizado en la experimentación de este trabajo.

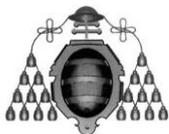


## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo ha sido el proporcionar al alumno unos conocimientos básicos dentro del ámbito de la cuantificación de especies elementales de fósforo mediante ICP-MS y su potencial aplicación a la cuantificación de fosfopéptidos sin necesidad de patrones específicos. Cabe destacar que se trata de un campo multidisciplinar que requiere y aporta conocimientos de bioquímica, química, biología etc.

El trabajo se ha desarrollado dentro de un grupo de investigación de prestigio internacional, lo que ha permitido también mejorar competencias como son el trabajo en grupo, que se ha desarrollado con estudiantes de doctorado (Silvia Díez) y la tutoría del personal docente (Jorge Ruiz).

En cuanto a los objetivos experimentales y técnicos, el trabajo ha permitido el acercamiento a técnicas actuales, especialmente en el sector de la investigación y el desarrollo, como son la cromatografía de líquidos capilar (HPLC), el análisis por inyección de flujo (FIA) y, sobre todo, la espectrometría de masas elemental con fuente de ionización de plasma (ICP-MS).



## 3. TRABAJO EXPERIMENTAL

### 3.1. EQUIPOS UTILIZADOS

#### 3.1.1. Espectrómetro de masas ICP

Para realizar todos los análisis se ha utilizado el equipo ICP-MS modelo 7700 de Agilent Technologies (Santa Clara, USA) de tipo cuadrupolo (véase figura 10). Está equipado con un detector electrón multiplicador digital/analógico con un tiempo de integración de hasta 100  $\mu\text{s}$ .<sup>35</sup> Los conos sampler y skimer están contruidos en platino (condición necesaria para trabajar con  $\text{ArO}_2$ , como se ha comentado en el apartado 1.3.4). Las características más llamativas de este equipo son: la novedosa celda de colisión/reacción que posee, una celda de colisión de octapolo (ORS, Sistema de Reacción en Octapolo) que permite la aplicación de mayores presiones y mayores potenciales de radiofrecuencia; y un nuevo sistema patentado de inyección de muestra (HMI) que confiere mayor robustez al plasma. La nueva celda permite una mayor sensibilidad y eliminación de interferencias (tan problemáticas para la detección de fósforo como se ha comentado en la introducción) con respecto al modelo antecesor, el Agilent 7500.<sup>35</sup>

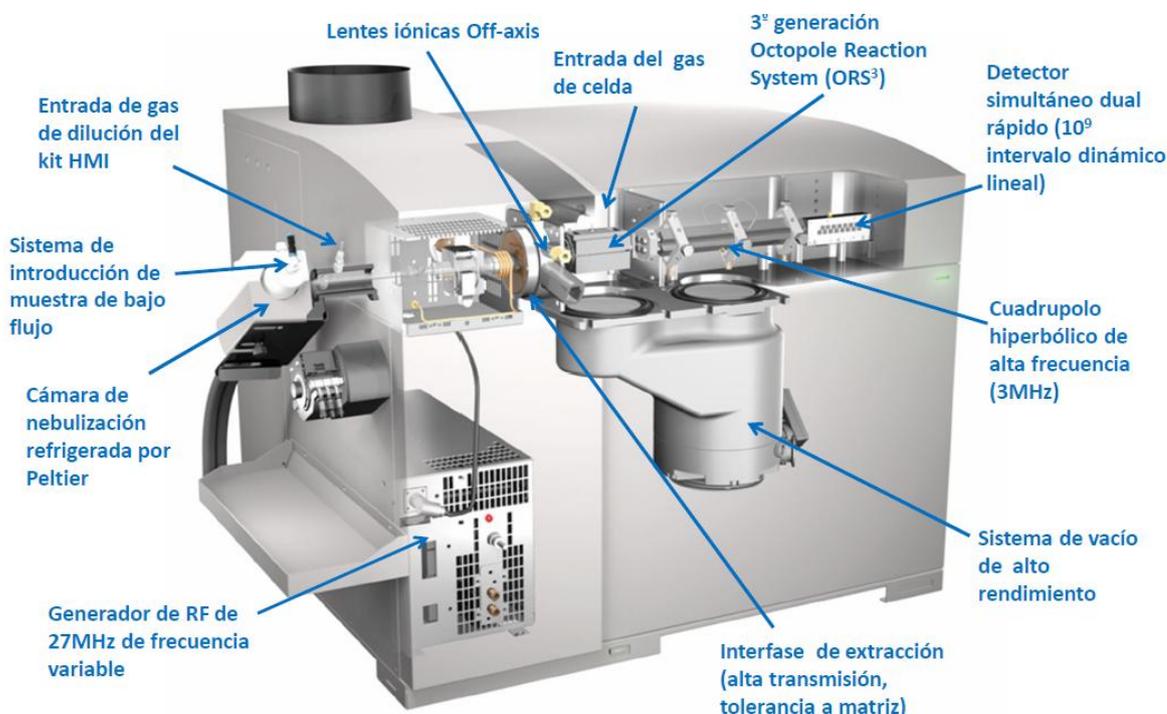


Figura 10: Espectrómetro de masas ICP utilizado, Agilent 7700.<sup>35</sup>

En los experimentos es los que ha sido necesario trabajar con cromatografía capilar o microflujos en FIA, se empleó un nebulizador de microflujos de consumo total (DS-5



nebulizer, Cetac Technologies, Omaha, NE). Este nebulizador posee un capilar de dimensiones muy pequeñas (50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 180  $\mu\text{m}$  de diámetro externo y 41 mm de longitud), lo que provoca una elevada resistencia al flujo y permite obtener flujos estables en un rango que va de los 0.5 a los 11  $\mu\text{L}$ . La punta del capilar del capilar está centrada frente a un orificio de cristal de zafiro de 254  $\mu\text{m}$  de diámetro interno permitiendo así la formación del aerosol.<sup>2</sup> La cámara de nebulización posee una entrada lateral para el gas opcional.



*Figura 11: Nebulizador de microflujos de consumo total.*

Para los experimentos de análisis FIA y para aplicar flujo postcolumna se ha utilizado una bomba de jeringa digital SP100i de World precision instruments (Stevenage, Reino Unido), y una válvula de inyección Rheodyne 7520 con micro-inyector (Bellefonte, USA) con una capacidad de loop de 0.5  $\mu\text{L}$ .



*Figura 12: A la derecha bomba de jeringa digital World Precision Instruments SP 100i.  
A la izquierda válvula de inyección Rheodyne 7520*

Para las separaciones cromatográficas se ha utilizado un equipo HPLC 1200 Infinity de Agilent Technologies 1200 (Santa Clara, USA), acoplado a una columna de cromatografía



capilar Agilent ZORBAX SB-C18 para trabajar en fase reversa con 150 mm de longitud, 0.3 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (tamaño de poro 80  $^{\circ}\text{A}$ ).

Los tubos capilares utilizados fueron de PEEK (Upchurch, USA) de 400  $\mu\text{m}$  de diámetro interno.

Para las separaciones cromatográficas con dilución postcolumna se utilizó una pieza en forma de T de PEEK (Upchurch, USA).

### 3.2. REACTIVOS UTILIZADOS

Las disoluciones acuosas se prepararon con agua MilliQ obtenida mediante un sistema MilliQ Advance A10 de Millipore (Bedford, USA).

El acetonitrilo utilizado en todas las disoluciones incluidas las fases móviles fue ACN de pureza gradiente HPLC Fisher Scientific (Fair Lawn, USA).

El Ácido Fórmico utilizado fue de pureza analítica (Merck, Darmstadt, Alemania).

Las disoluciones de Se, Ge y P se prepararon a partir de disoluciones patrón de estos tres elementos proporcionadas por Alfa Aesar (Ward Hill, USA).

Los 4 compuestos de fósforo utilizados son de pureza analítica suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Las fórmulas de dichos compuestos se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2: Estructuras químicas de los compuestos de fósforo utilizados

<p>BNPP</p>	<p>DBP</p>
<p>TEP</p>	<p>TMP</p>



En la tabla 3, se muestran las principales características de los 4 compuestos citados anteriormente:

Tabla 3: Propiedades de los compuestos fosforados utilizados.<sup>36</sup>

Compuesto	BNPP	DBP	TEP	TMP
Tª Ebullición (°C)	545	190-260	215.6	197
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1615	-	1060	-
Solubilidad Agua	Miscible (a 25 °C)	17 g/l (a 25 °C)	Miscible (a 25 °C)	Miscible (a 25 °C)
Pka	3.5	2.32 (a 25 °C)	-	-
PM	340	210	183	141

### 3.3. EXPERIMENTOS REALIZADOS

#### 3.3.1. Optimización del gas opcional ArO<sub>2</sub>

Al utilizar altos contenidos de disolvente orgánico, como es el ACN, se producen inestabilidades en el plasma, disminuyendo la sensibilidad del análisis, y generándose depósitos de carbono en los conos de la interfase, que podrían llevar incluso a su obturación. Por tanto, resulta muy conveniente usar como gas opcional (Optional gas) una mezcla de Ar/O<sub>2</sub> (ya comentada en el apartado 1.3.4).

De este modo se consigue aumentar considerablemente la sensibilidad del análisis y, por tanto, los límites de cuantificación. También de esta manera el ensuciamiento del equipo (problemático a la hora de analizar materia orgánica) es mucho menor, especialmente en los conos de la interfase entre el plasma y el analizador.

El objetivo principal de este experimento es optimizar el porcentaje de gas opcional frente a la suma del gas portador (carrier gas) y gas auxiliar (auxiliary gas).

El procedimiento de optimización consistió en optimizar el gas portador entre 0.7 L/min y 1.05 L/min, de manera que para cada uno de los flujos utilizados se modificaba el porcentaje de gas opcional de 0% al 10% (tanto por ciento de la suma de flujos del carrier gas más el del gas auxiliar que es constante), y observándose la variación de la señal del elemento analítico, <sup>31</sup>P, y del <sup>78</sup>Se, utilizado como patrón interno.

El rango de flujos de carrier gas elegido se debe a que normalmente el óptimo se encuentra en torno a 1 L/min. El porcentaje máximo de gas opcional que se puede utilizar es del 10%, ya que a partir de este punto se producen inestabilidades en el plasma que pueden llegar a extinguirlo, por ello no se sobrepasa ese límite.



## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPUESTOS DE FÓSFORO MEDIANTE HPLC CAPILAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL

Las disoluciones utilizadas fueron un blanco de 50 ppb de Se en 30% de ACN, y una disolución de 1 ppm P, de nuevo en 30% de ACN con 50 ppb de Se.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizó el ICP-MS con la cámara de nebulización convencional con inyección mediante bomba peristáltica y se utilizó la celda de colisión con He con un flujo de 2 ml/min.

Las condiciones del equipo utilizadas para llevar a cabo el experimento se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Condiciones experimentales del ICP-MS para la optimización del gas opcional.

Parámetros del Plasma	
RF Power	1550 W
RF Matching	1.8 V
Carrier Gas	0.7-1.05 L/min
Optional Gas	0-10%
Parámetros de las lentes	
Extract 1	0 V
Extract 2	(-) 180.0 V
Omega Bias	(-) 115.0 V
Omega Lens	6.5 V
Cell Entrance	(-) 30.0 V
Cell Exit	(-) 50.0 V
Deflect	12.8 V
Plate Bias	(-) 60.0 V
Parámetros de celda	
Octapole Bias	(-)18.0 V
Octapole RF	200.0 V
He Flow	2 ml/min

Los resultados experimentales de las medidas realizadas con los diferentes flujos de carrier gas y porcentajes de gas opcional se muestran a continuación en las figuras 13, 14 y 15. Para la representación en ordenadas se muestran dos escalas, una a la izquierda que expresa la señal correspondiente al  $^{31}\text{P}$  y otra a la derecha que muestra la señal correspondiente al  $^{78}\text{Se}$ . En las medidas para el  $^{31}\text{P}$  de señales del blanco y bruta se representa en cada punto su desviación estándar mediante bigotes. En color verde se representa la señal del fósforo y en azul la señal de selenio.



## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPUESTOS DE FÓSFORO MEDIANTE HPLC CAPILAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL

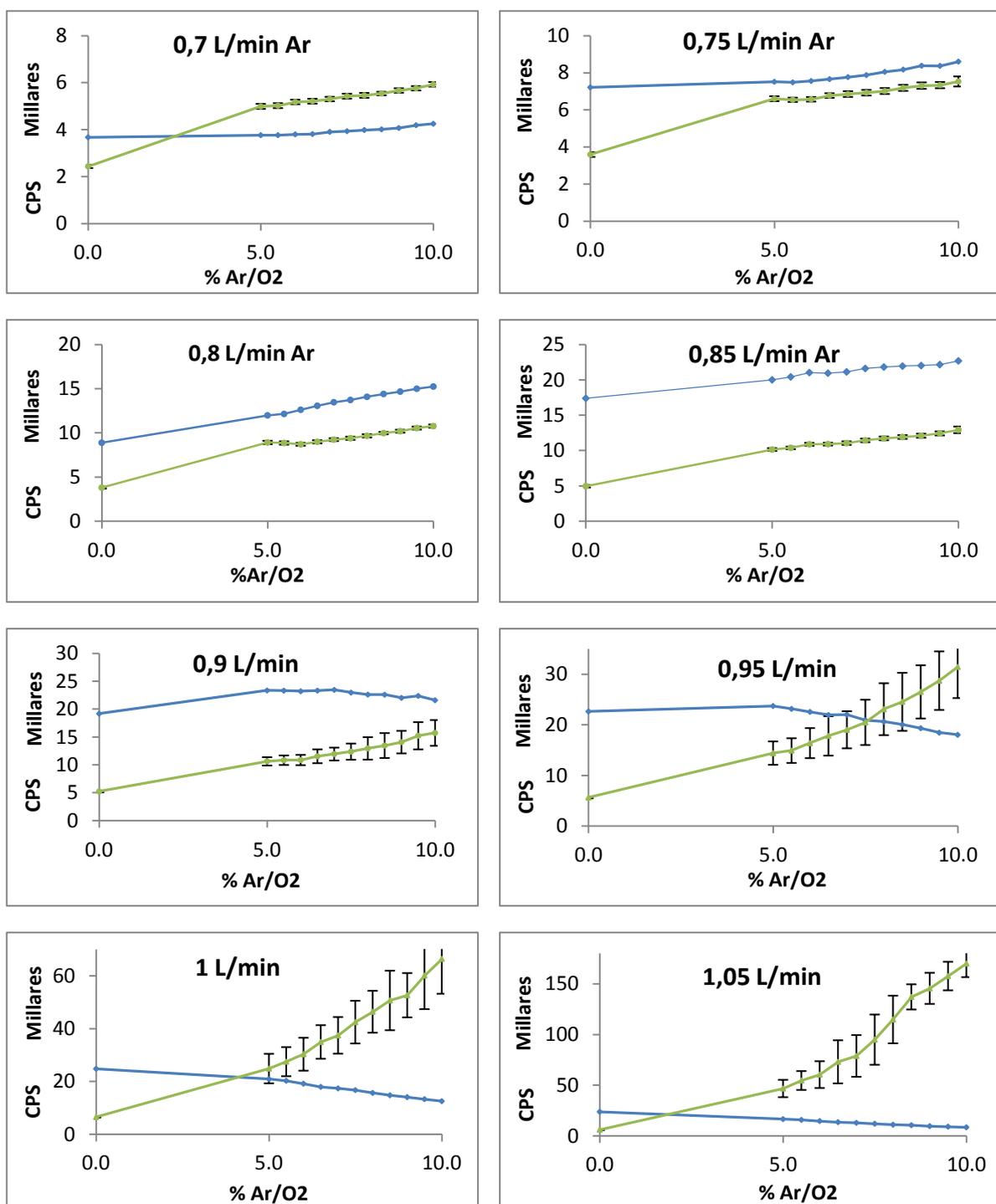
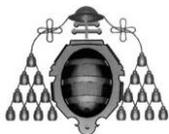


Figura 13: Gráficas de la señal de medida del blanco para la optimización del flujo de Ar/O<sub>2</sub> en función de flujo del carrier gas. En verde la señal del <sup>31</sup>P y en azul la señal del <sup>78</sup>Se. Para la señal de <sup>31</sup>P se representa la desviación estándar mediante bigotes.



## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPUESTOS DE FÓSFORO MEDIANTE HPLC CAPILAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL

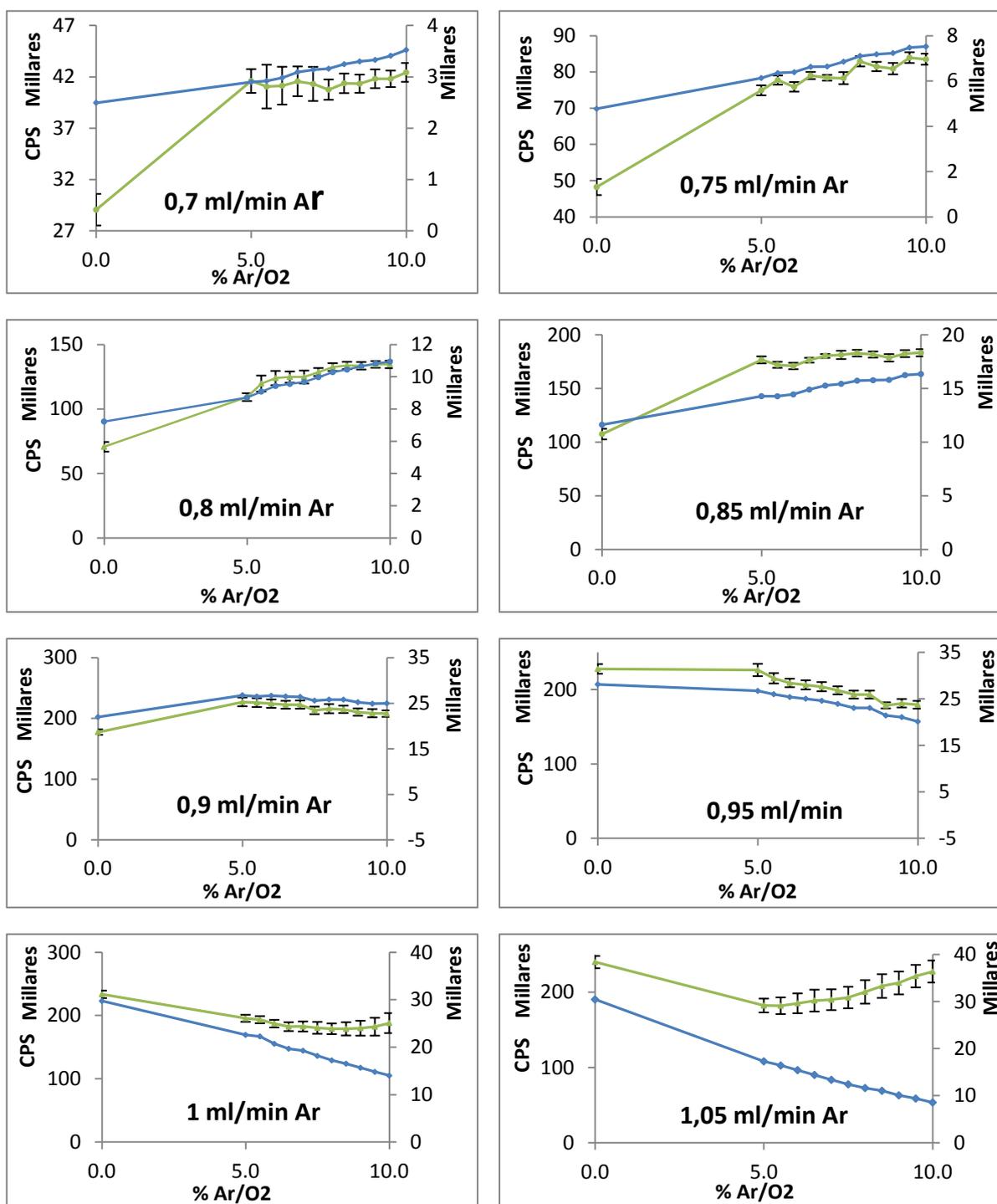


Figura 14: Gráficas de la señal bruta del análisis para la optimización del flujo de Ar/O<sub>2</sub> en función de flujo del carrier gas. En verde la señal del <sup>31</sup>P (escala de la izquierda) y en azul la señal del <sup>78</sup>Se (escala de la derecha). Para la señal de <sup>31</sup>P se representa la desviación estándar mediante bigotes.



## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPUESTOS DE FÓSFORO MEDIANTE HPLC CAPILAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL

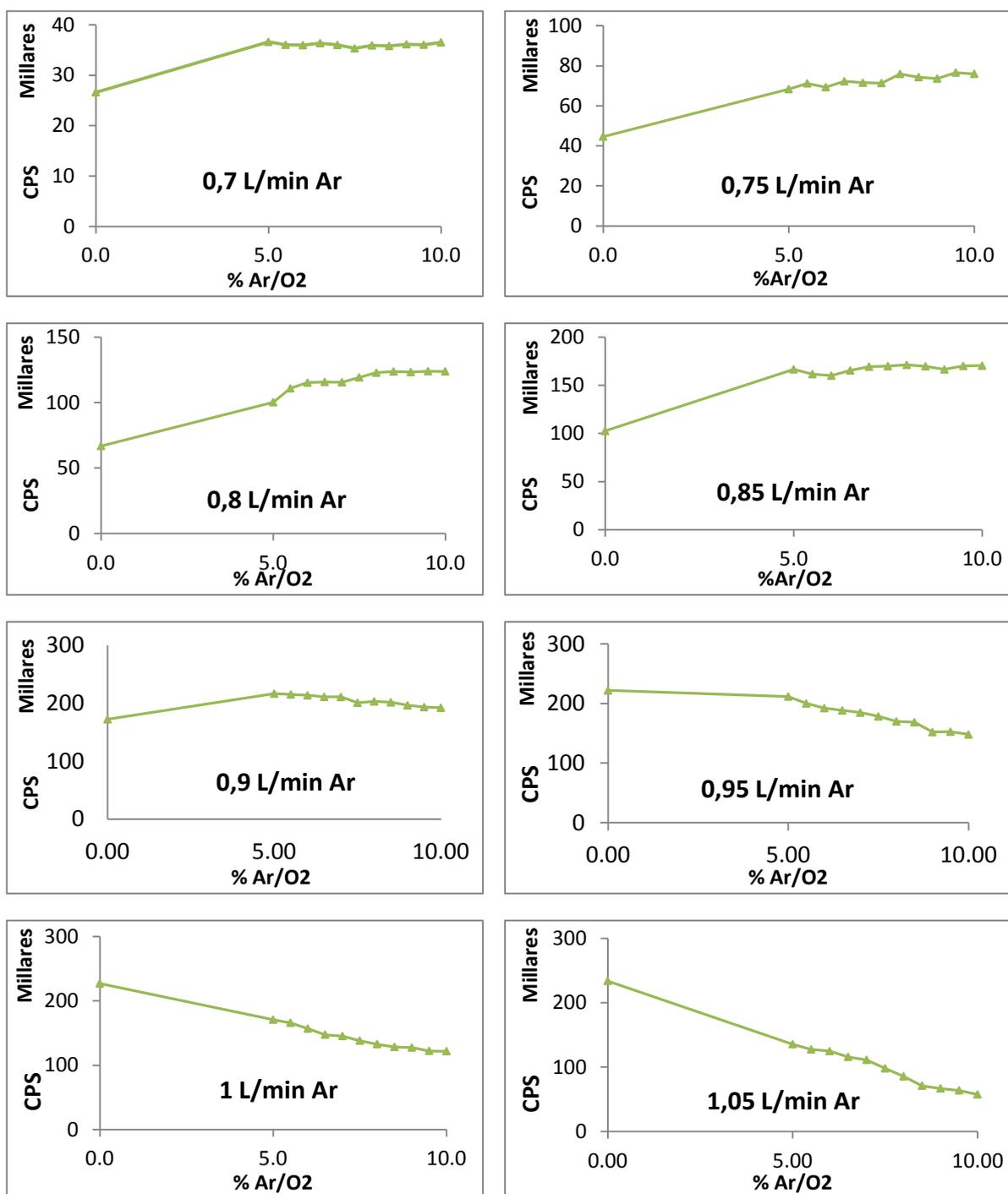


Figura 15: Gráficas de la señal neta de  $^{31}\text{P}$  para la optimización del flujo de  $\text{Ar}/\text{O}_2$  en función de flujo del carrier gas.

Por un lado, en las gráficas se observa, que a partir de un flujo de carrier gas mayor de 0.9 L/min las desviaciones estándar comienzan a ser elevadas, y no interesan RSD mayores del 5%.

Por otro lado, se ve que los valores de carrier gas para los que se observa un incremento de la sensibilidad (señal neta) para el  $^{31}\text{P}$  se corresponden con flujos de



carrier gas de 0.75, 0.8 y 0.85 L/min. Para cada una de estas 3 gráficas, se eligió el valor de Ar/O<sub>2</sub> con el que se obtuvo mayor sensibilidad, y se calculó su límite de detección en esas condiciones, obteniéndose de esta manera el valor de carrier y Ar/O<sub>2</sub> óptimo.

Las condiciones óptimas han resultado ser 0.8 L/min de carrier gas y un 10% del gas opcional, para estas condiciones es para las que se obtiene una mayor señal.

Hay que tener en cuenta que dependiendo del día el equipo puede tener mayor o menor sensibilidad, por lo que el valor óptimo del flujo de carrier gas no es inamovible. Si es necesario se debe modificar moderadamente el flujo de carrier gas para corregir la disminución de la sensibilidad.

### 3.3.2. Desarrollo y caracterización del sistema $\mu$ FIA-ICP-MS

El objetivo de este experimento es optimizar y comprobar la reproducibilidad de un sistema de análisis por inyección de microflujos ( $\mu$ FIA). El motivo de realizar este experimento es asegurar el estado del sistema instrumental, ya que será utilizado en experimentos posteriores para realizar una dilución postcolumna mediante una "T" a la salida de la correspondiente columna cromatográfica, para mejorar la sensibilidad de medida del P.

Se colocó en el ICP-MS el nebulizador de consumo total, y se trabajó con las condiciones de análisis optimizadas en el apartado anterior.

Para el montaje del sistema  $\mu$ FIA se optimizó para los siguientes elementos:

- 1º Bomba de jeringa digital
- 2º Válvula de inyección con un volumen de loop de 0,5  $\mu$ l
- 3º Nebulizador de microflujos de consumo total
- 4º ICP-MS Agilent Technologies 7700
- 5º Conexiones mediante tubos capilares de polímero PEEK.

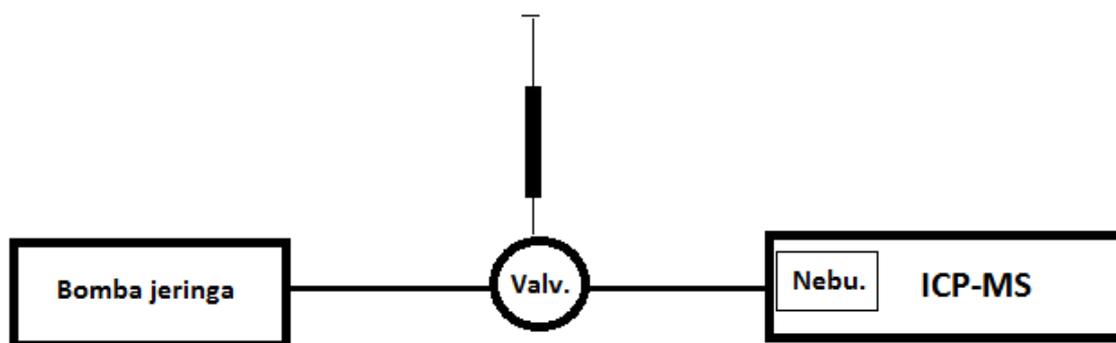
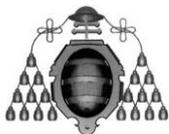


Figura 16: Esquema de montaje del sistema FIA

La bomba de jeringa digital se programa para que inyecte un flujo de 7  $\mu$ l/min de disolución carrier formada por 0.1% Ac. Fórmico, 50 ppb de Ge y Se, y 30% de ACN.



La muestra inyectada a través de la válvula de 0,5  $\mu\text{l}$  consistió en 30% ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  con 1ppm de Ge.

Para comprobar la reproducibilidad del sistema se efectuarán unos 10 pinchazos (0,5  $\mu\text{l}$ ) de disolución de 1 ppm de Ge, aproximadamente cada 200 segundos.

Los resultados obtenidos de la detección del  $^{72}\text{Ge}$  mediante el ICP-MS se muestran en el siguiente cromatograma:

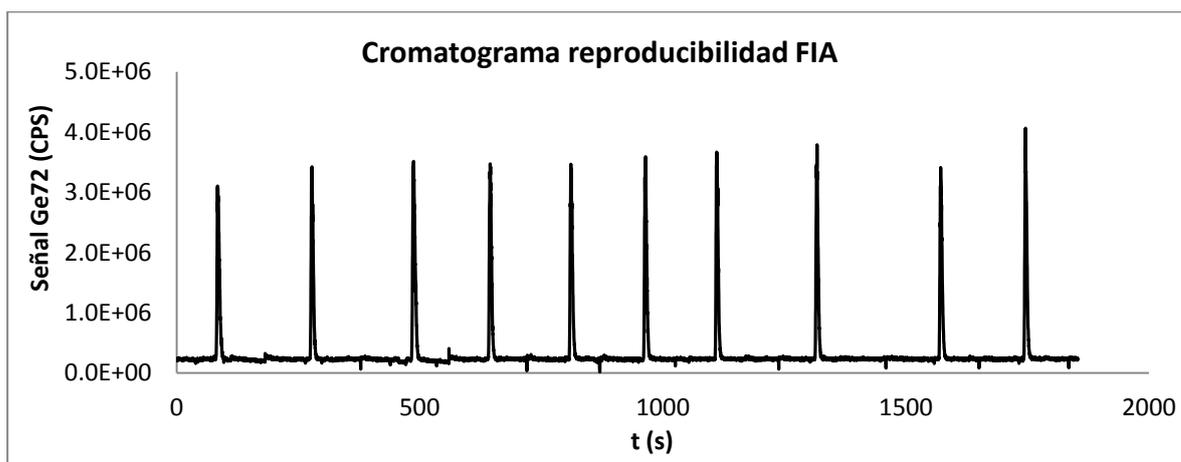


Figura 17: Cromatograma de reproducibilidad del sistema  $\mu\text{FIA}$ .

Mediante el software del equipo se integra el área de los picos obtenidos. Se determina la media y las desviaciones estándar del área integrada de los picos de 1 ppm de Ge:

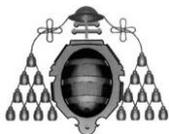
Media	SD	RSD (%)
1613290	102013	6.32

Tabla 5: Resultado de reproducibilidad del sistema

La reproducibilidad se analiza observando el resultado de la desviación estándar relativa (RSD) que ha resultado ser muy buena teniendo en cuenta que la inyección es manual y que una RSD de en torno al 5 % se considera reproducibilidad excelente.

### 3.3.3. Caracterización analítica del método para la medida de especies de fósforo.

Se sabe por trabajos realizados anteriormente en esta misma línea de investigación [Ana Pereira y cols.], que los resultados de la señal de fósforo  $^{31}\text{P}$  son independientes de la naturaleza del compuesto analizado.<sup>17</sup>



El objetivo de este experimento es determinar el límite de detección del método utilizado mediante análisis en  $\mu$ FIA-ICP-MS. Para ello se utilizará como patrón genérico un compuesto de P como es el BNPP (bis-4-nitrofenil-fosfato), y se realizará un calibrado con concentraciones crecientes de dicho compuesto, de manera que el límite de detección determinado para el BNPP, sea también el límite de detección para cualquier especie de fósforo, como se explica en el párrafo anterior.

Se utilizará el mismo sistema  $\mu$ FIA-ICP-MS utilizado en el apartado anterior con el ICP-MS operando con los parámetros optimizados en el apartado 3.3.1.

Se inyecta un flujo de 7  $\mu$ l/min de disolución carrier formada por 0.1% Ac. Fórmico, 50 ppb de Ge y Se, y 30% de ACN.

Se programan los siguientes tiempos de integración: 0.25 s para el  $^{31}\text{P}$  y 0.05 s para el  $^{72}\text{Ge}$  y el  $^{78}\text{Se}$ .

Para realizar el calibrado se preparan 4 disoluciones de BNPP en concentraciones crecientes (0.0, 0.1 ppm, 0.25 ppm, 0.6 ppm y 1 ppm) con un 30% de ACN y se inyecta por triplicado cada una de las disoluciones.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido y el resultado de las calibraciones.

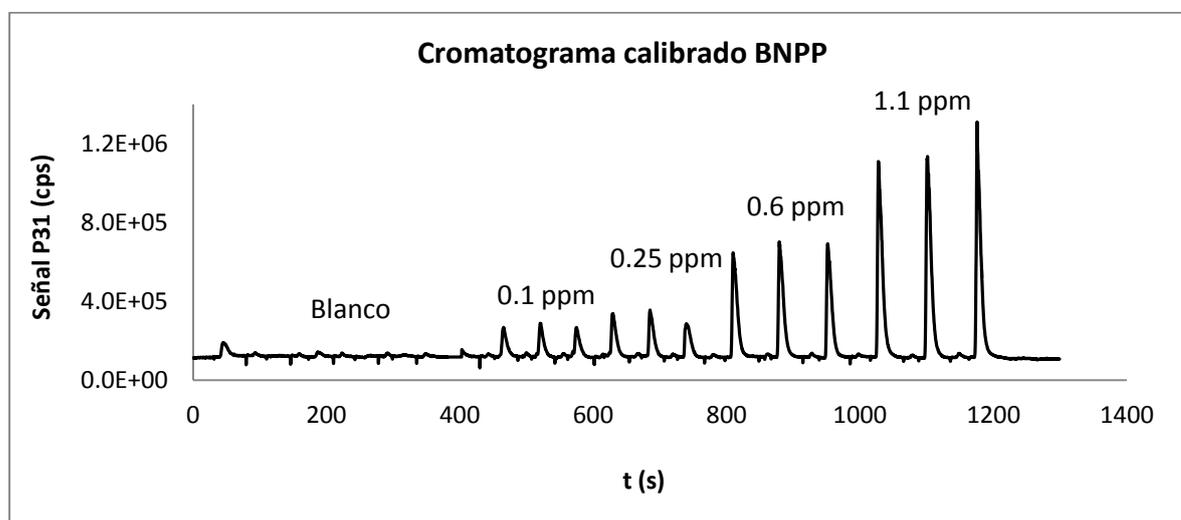


Figura 18: Cromatograma de calibrado de BNPP.

A continuación se muestra en las figuras 19 y 20 los calibrados realizados, por un lado mediante la integración del área de pico, y por otro lado, mediante la medida de la altura de pico; ambas tareas han sido realizadas con el propio software del equipo.

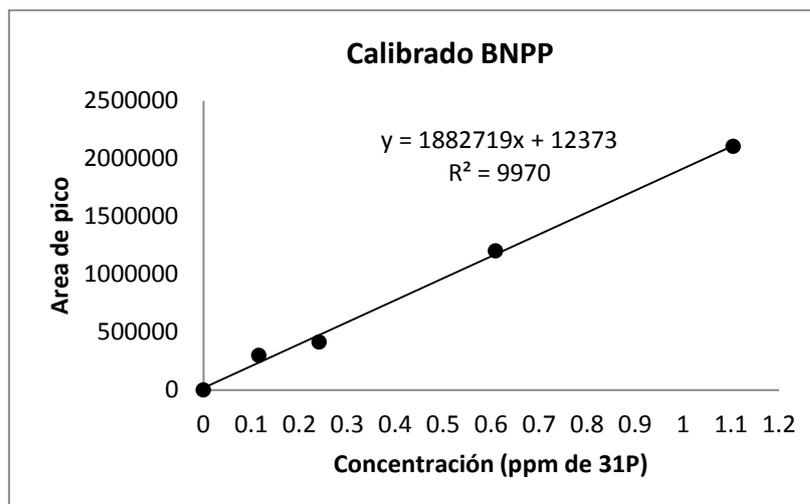
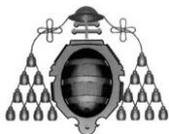


Figura 19: Recta de calibrado a través de las áreas de pico de BNPP

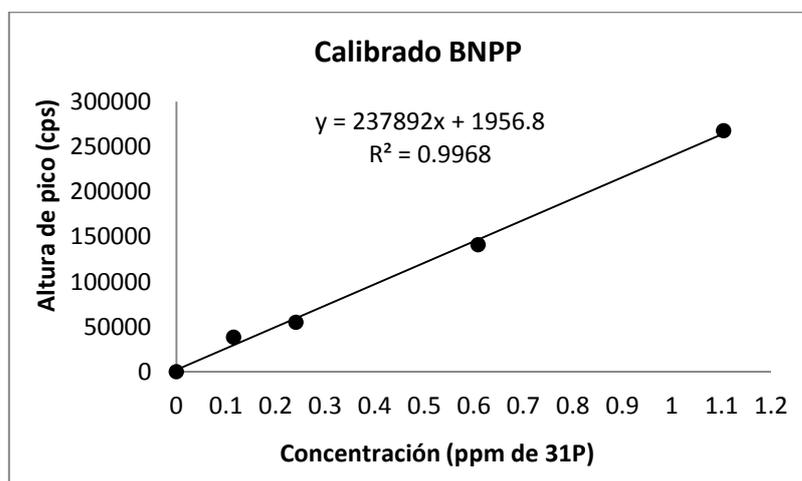


Figura 20: Recta de calibrado a través de las alturas de pico de BNPP.

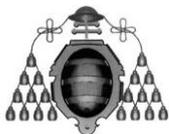
Los resultados de la calibración son bastante buenos. Se procede ahora al cálculo del límite de detección que responde a la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3 \cdot SD}{a}$$

Donde:

SD es la desviación estándar de las áreas de pico del blanco, pero como en este caso el blanco no da señal significativa, lo que se hace es calcular la desviación estándar del ruido de fondo en un intervalo de tiempo correspondiente al ancho al ancho de pico medio de los picos cromatográficos obtenidos. Por lo tanto el calibrado habitual en base al área de pico no es útil y se debe realizar en base a la altura de pico neta.

“a” es la pendiente de la recta de calibrado en base a la altura de pico neta.



$$LD = \frac{3 \cdot 1171}{237892} = 0.0148 \cong 15 \text{ ppb}$$

### 3.3.4. Análisis de mezclas de especies de fósforo con capHPLC-ICP-MS

Como se ha comentado en la introducción, el ACN tiene un efecto perjudicial en la ionización. Sin embargo, es una fase móvil muy común en el acoplamiento de ICP-MS con capHPLC y, por tanto, es necesario desarrollar un método que sea capaz de corregir o cuantificar la disminución de la sensibilidad del sistema a lo largo del gradiente cromatográfico. Una posible solución, también ya investigada en los estudios anteriores de esta línea de investigación del grupo, es la inyección de un flujo postcolumna con un 40% de ACN y un patrón interno que será selenio en este caso, de manera que así las variaciones del gradiente se minimicen a la hora del análisis en el ICP-MS.

El objetivo de este experimento es establecer una comparación entre el análisis de 4 compuestos de fósforo que eluyen a distintos tiempos de retención a lo largo del cromatograma.

Se analizarán 4 compuestos diferentes con fósforo en su estructura: el BNPP ya citado anteriormente, el TEP (Trietil fosfato), el TMP (Trimetil fosfato) y DBP (Dibutil fosfato). Para su análisis, dichos compuestos estarán a una concentración de 1 ppm y disueltos en un 3% de acetonitrilo ya que será la concentración a la que comenzará el gradiente.

Se realizarán 4 cromatografías: una para el blanco, otra para el BNPP junto con el DBP, y las dos últimas cromatografías serán los 4 compuestos; una sin flujo postcolumna, y otra con flujo postcolumna.

El montaje del sistema consta de los siguientes elementos:

- 1º HPLC Agilent 1200
- 2º Válvula de inyección de 0,5 µl de loop
- 3º Columna cromatográfica capilar C18 para fase reversa
- 4º Nebulizador de consumo total
- 5º ICP-MS
- 6º Bomba de jeringa digital
- 7º Conexión en "T" (utilización de flujo postcolumna)

Las fases móviles se preparan con las siguientes composiciones:

- FASE A (Agua MiliQ + 1% ACN, 0.1% Ac. fórmico y 20 ppb Ge)
- FASE B (ACN + 0.1% Ac. fórmico y 20 ppb Ge)



La disolución carrier para el flujo postcolumna está formada por un 40% de ACN + 50 ppb Se.

El equipo de cromatografía bombea siempre 4  $\mu$ /min y la bomba de jeringa trabaja a 7  $\mu$ l/ min en el experimento realizado con postcolumna.

El gradiente programado para todos los análisis cromatográficos ha sido el siguiente:

Tabla 6: Gradiente cromatográfico empleado

Tiempo (min)	% Fase B (ACN)
0	3
4.5	3
46.5	40
54.5	80
60	3

La mayoría de los compuestos orgánicos eluyen normalmente entre el 15 y el 35%, por ello en ese intervalo de tiempo se le programa una pendiente de aproximadamente un 1% para que los compuestos puedan salir bien separados y la variación de sensibilidad provocada por el aumento de ACN no sea muy brusca. Posteriormente, se aplica una pendiente mucho más elevada para eliminar residuos que puedan haber quedado en la columna.

Los cromatogramas obtenidos en cada análisis se muestran a continuación:

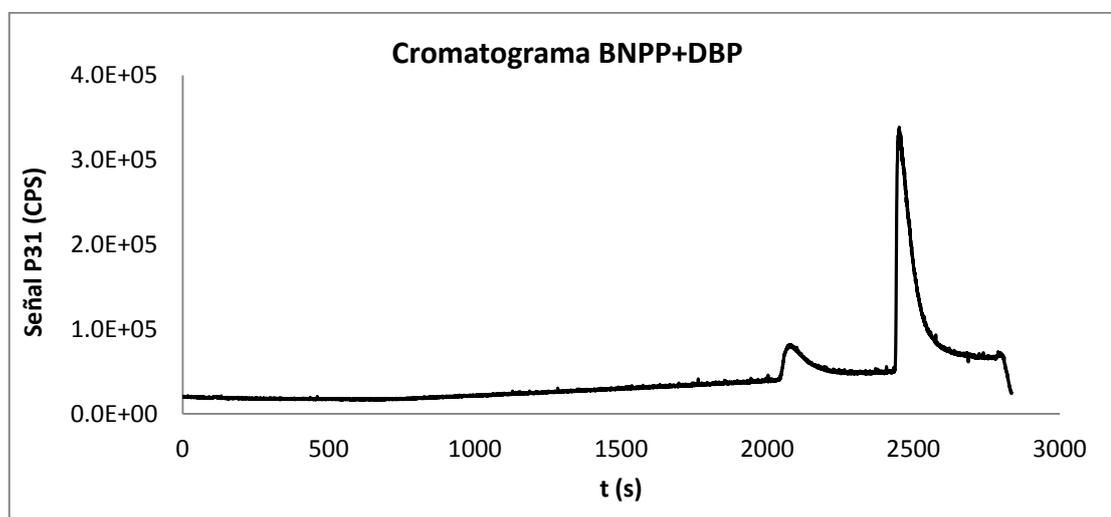
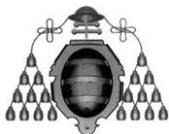


Figura 21: Cromatograma de BNPP+DBP



El primer pico que se observa se corresponde al DBP que eluye a unos 2060 s y el segundo pico corresponde al BNPP que eluye a unos 2450 s.

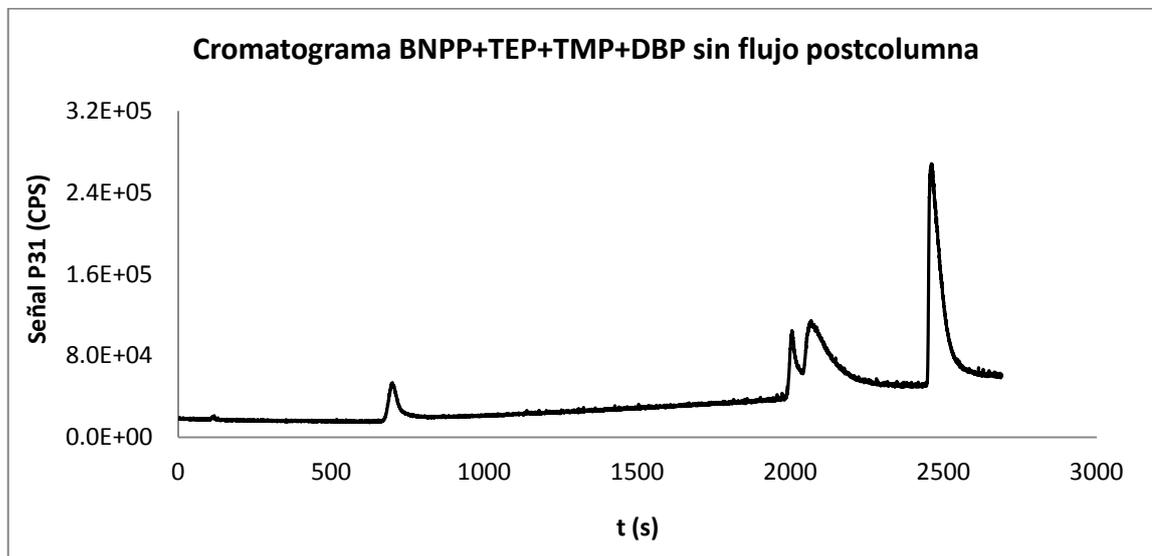


Figura 22: Cromatograma de BNPP+DBP+TEP+TMP sin utilización de flujo postcolumna

El primer pico que se observa corresponde al TMP que eluye a 700 s, el segundo pico (solapado con el siguiente) corresponde al TEP que eluye a unos 2000 s, el tercer pico (solapado con el anterior) se corresponde con el DBP que eluye a unos 2060 s como en el cromatograma anterior figura 21 y el último pico se corresponde con el BNPP que eluye a unos 2450 s también correspondiéndose con el cromatograma anterior figura 21.

El orden de elución de estos compuestos, descritos en el apartado 3.2, se explica a partir de su estructura química (véase tabla 2). El primer compuesto en eluir es el TMP ya que es el que posee las cadenas carbonadas más cortas de los 4 compuestos y por tanto tiene una menor interacción con la fase estacionaria C18 de la columna; el siguiente en eluir es el TEP, por el mismo motivo, aunque éste está constituido por cadenas carbonadas más largas, el siguiente en eluir es el DBP que contiene grupos terbutilo que tienen más posibilidades de interacción con la fase estacionaria, aunque por otra parte, uno de sus enlaces está sustituido por un grupo OH lo que favorece el efecto contrario; y el último compuesto en eluir es el BNPP debido a que contiene 2 grupos fenilo en su estructura, presentando una fuerte interacción con la columna.

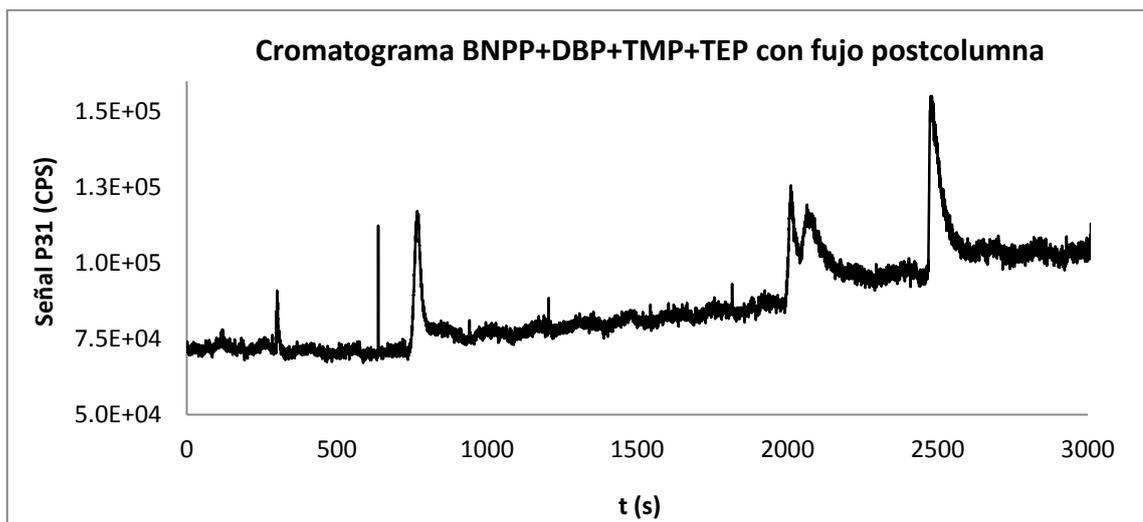
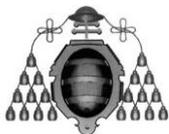
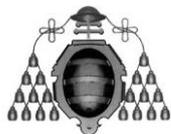


Figura 23: Cromatograma de BNPP+DBP+TEP+TMP con utilización de flujo postcolumna

Los compuestos de este cromatograma son los mismos que el anterior análisis y por lo tanto eluyen a tiempos de retención prácticamente idénticos.

Se puede apreciar que al aplicar el flujo postcolumna las áreas netas de los picos cromatográficos son más similares entre sí, con lo que ciertamente se corrige la variación de la sensibilidad a lo largo del gradiente, ya que todos los compuestos están presentes en la muestra a la misma concentración (1 ppm). También se aprecia que la sensibilidad disminuye con respecto al cromatograma realizado a la misma muestra sin aplicar flujo postcolumna, lo que es indicativo de que el sistema necesita ser optimizado.

También se puede apreciar que el TEP y DBP no se resuelven correctamente con el gradiente utilizado, y como lo que interesa es tener compuestos que eluyan a tiempos de retención distribuidos a lo largo del cromatograma, lo lógico sería descartar el DBP ya que presenta un mayor ensanchamiento de pico cromatográfico.



## 4. CONCLUSIONES

Los conocimientos obtenidos en el presente trabajo han sido tanto teóricos como técnico-experimentales. Así mismo, se han adquirido competencias profesionales muy valoradas hoy en día como son el trabajo en grupo y la utilización de bibliografía en inglés.

Se ha profundizado en el conocimiento de la química analítica y la bioquímica (aplicación de la espectrometría de masas en el estudio de modificaciones post-traduccionales en proteínas, las fosfoproteínas, y proteómica en general) hasta ahora desconocidas para el alumno.

Se han realizado trabajos experimentales en ICP-MS con distintos tipos de cámaras de nebulización, acoplamiento a técnicas capHPLC y  $\mu$ FIA trabajando con microflujos y flujo postcolumna, además de en técnicas de preparación de muestra.

En el desarrollo de la parte experimental se ha comprobado el incremento de la sensibilidad producido por la introducción como gas opcional del Ar/O<sub>2</sub>, y se ha propuesto el uso de diferentes compuestos de fósforo con distintos tiempos de elución para valorar la variación de la sensibilidad a lo largo del gradiente de ACN en futuros trabajos de la línea de investigación en cuantificación absoluta de fosfopéptidos.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Alejandra Simón Mañogil, *“cuantificación específica y absoluta de péptidos fosforilados en tirosina mediante el marcaje con <sup>127</sup>I y análisis por HPLC capilar ICP-MS”*, Seminario de investigación, Universidad de Oviedo, 2009.
2. Ana Pereira Navaza, *“Cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos mediante la integración de la espectrometría de masas elemental y molecular”*, Tesis doctoral, Universidad de Oviedo, 2009
3. A. Pandey, M. Mann, *“Proteomics to study genes and genomes”*, Nature, 405, 837-846, 2000.
4. J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, *“The sequence of the human genome”*, Science, 291, 1304-1351, 2001.
5. S. D. Paterson, R. H. Aebersold, *“Proteomics the first decade and beyond”*, Nature Genetics, 33, 311-323, 2003
6. M. Mann, O. N. Jensen, *“Proteomic analysis of post-translational modifications”*, Nature Biotechnology, 21, 255-261, 2003.
7. O. N. Jensen, *“Interpreting the protein language using proteomics”*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7, 391-403, 2006.
8. R. G. Krishna, F. Wold, *“Post-translational modifications”*, Protein Analysis and Design, Academic Press, Sand Diego, 121-206, 1998.
9. T. Hunter, *“Signaling and Beyond”*, Cell, 100, 113-127, 2000.
10. C. V. Clevenger, *“Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer”*, Am. J. Pathology, 165, 1449-1460, 2004.
11. X. Zhu, H. Lee, A. K. Raina, G. Perry, M. A. Smith, *“The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer’s disease”*, Neurosignals, 11, 270-281, 2002.
12. M. Gronborg, O. N. Jensen, *“Phosphoprotein and phosphoproteome analysis by mass spectrometry”*, Emerging Technologies in Protein and Genomic Material Analysis, 68, 21-34, 2003.
13. M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, *“Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome”*, Trends in Biotechnology, 20, 261-268, 2002.
14. G. Manning, DB Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *“The Protein Kinase Complement of the Human Genome”*, Science, 298, 1912-1934, 2002.
15. S. Zolnierowicz, M. Bollen, *“Protein phosphorylation and protein phosphatases”*, The EMBO Journal, 19, 483-488, 2000.
16. Verónica González Núñez, *“Modificaciones post-traduccionales de las proteínas”*, Bioquímica, Universidad de Salamanca, 2007.
17. Ana Pereira Navaza, *“Cuantificación absoluta de fosfopéptidos usando un patrón elemental de fósforo y HPLC capilar acoplado a ICP-MS”*, Seminario de investigación, Universidad de Oviedo, 2006.

18. D. M. Olivie, "Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development", *Expert Review Proteomics*, 1, 327, 2004.
19. E. Zwick, J. Bange, A. Ullrich, "The role of EGFR in solid tumors and implications for therapy", *Oncology Biotherapeutics*, 1, 1-30, 2000.
20. K. Krzemieniecki, E. Szpyt, I. Rashedi, K. Gawron, M. Ios, "Targeting of solid tumors and blood malignancies by antibody-based therapies – EGFR – pathway as an example", 1, 167-182, 2006.
21. A. Ocana, R. Serrano, R. Calero, A. Pandiella, "Novel tyrosine kinase inhibitors in the treatment of cancer", *Current Drug Targets*, 10, 575-576, 2009.
22. S. I. Walaas, P. Greengard, "Protein phosphorylation and neuronal function", *Pharmacological reviews*, 43, 299, 1991.
23. D. Schamloffel, "Capillary liquid separation techniques with ICP-MS detection", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 351, 2004.
24. J. L. Todolí, J. M. Mermet, "Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS", *Spectrochimica Acta Part B*, 61, 239, 2006.
25. M. Wind, O. Kelm, E. A. Nigg, W. D. Lehmann, "Identification of phosphorylation sites in the polo-like kinases Plx1 and Plk1 by a novel strategy based on element and electrospray high resolution mass spectrometry", *Proteomics*, 2, 1516-1523, 2002.
26. M. Wind, A. Eisenmenger, W. D. Lehmann, "Modified direct injection high efficiency nebulizer with minimized dead volume for analysis of biological samples by micro and nano HPLC-ICP-MS", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 21, 2002.
27. D. Pröfrock, P. Leonhard, W. Ruck, A. Prange, "Development and characterization of a new interface for coupling capillary LC with collision cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 194, 2005.
28. M. Wind, M. Edler, N. Jakubowski, M. Linscheid, H. Wesch, W. D. Lehmann, "Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry With  $^{31}\text{P}$  detection and to electrospray mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, 73, 29, 2001.
29. A. Sanz, M. Montes, M. L. Fernández, "Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 236-247, 2003.
30. <http://es.scribd.com/doc/19657961/23/ESQUEMA-DE-ICP-MS-DE-DOBLE-ENFOQUE>
31. S. Diez, N. Sugishama, J. Ruiz, A. Sanz, "Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics", *Analytical Chemistry*, 10, 1021, 2012.
32. A. Montaser, J. A. McLean, H. Liu, J. M. Mermet, "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", Willey VCH, ch. 1, 1-31, 1998.
33. A Primer of 7500 series Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies.
34. [http://www.uam.es/personal\\_pas/txrf/icpms.html](http://www.uam.es/personal_pas/txrf/icpms.html)
35. A Primer of 7700 series Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies.

36. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.250.html>
37. A. Pereira, J. Ruiz y A. Sanz, "*Quantitative protein analysis: the role of ICP-MS*", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 1223-1237, 2007.
38. S-E. Ong, M. Mann, "*Mass spectrometry based proteomic turns quantitative*" *Nature Chemical Biology*, 1, 252-262, 2005.
39. H. Zhang, W. Yan, R. Aebersold, "*Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis proteomes and subproteomes*" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8, 66-75, 2004.