



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

**ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO, ESTRUCTURAL
Y
MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL**

TESIS DOCTORAL

**“Síntesis, purificación, caracterización analítica y aplicaciones
de biocompuestos marcados isotópicamente”**

Jesús Nicolás Carcelén

Diciembre 2022, Oviedo



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Síntesis, purificación, caracterización analítica y aplicaciones de biocompuestos marcados isotópicamente.	Inglés: Synthesis, purification, analytical characterization and applications of isotopically labeled biocompounds.
2.- Autor	
Nombre: Jesús Nicolás Carcelén	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado	

RESUMEN (en español)

La presente Tesis Doctoral se engloba dentro del programa de doctorado de Análisis Químico, Bioquímico, Estructural y Modelización Computacional de la Universidad de Oviedo y los trabajos desarrollados y descritos en esta Tesis han sido realizados entre 2017 y 2022 bajo la dirección de Don Juan Manuel Marchante Gayón y de Don Pablo Rodríguez González, ambos profesores de la Universidad de Oviedo, pertenecientes al Grupo de Isótopos Estables Enriquecidos del Departamento de Química Física y Analítica. En el contexto de esta Tesis, los isótopos estables enriquecidos se encuentran en moléculas, conformando moléculas marcadas isotópicamente, cuyo uso más frecuente es junto a la Espectrometría de Masas para llevar a cabo análisis por Dilución Isotópica (IDMS). La Espectrometría de Masas, en sus diferentes variantes, es una herramienta analítica fundamental para la resolución de los problemas químico-analíticos que se plantean en una gran variedad de campos científicos y técnicos, incluyendo el ámbito clínico. En combinación con la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos posibilita la determinación una gran variedad de biocompuestos de interés clínico, gracias en gran medida a la elevada sensibilidad, exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Así mismo, el empleo de patrones marcados isotópicamente permite el desarrollo de metodologías analíticas (IDMS) que proporcionan ventajas únicas respecto a otras estrategias de calibración. IDMS está considerado un método primario de medida, ya que permite corregir la mayoría de los errores aleatorios y sistemáticos de una metodología analítica, por lo que los resultados obtenidos son directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI). Por tanto, estas metodologías están consideradas metodologías analíticas de referencia y sirven para validar los métodos analíticos de rutina empleados en los laboratorios clínicos. Sin embargo, la utilización de esta herramienta analítica requiere el empleo de compuestos marcados isotópicamente que suelen ser costosos o no existir comercialmente, como suele ser en el caso de moléculas complejas como las proteínas o los péptidos.



La presente Tesis Doctoral ha abordado la producción de patrones marcados isotópicamente y su posterior uso con métodos IDMS. Para ello se han desarrollado, en primer lugar, diferentes métodos de síntesis y de biosíntesis de moléculas marcadas tanto en ^{15}N como en ^{13}C . Así mismo, tras la producción de moléculas marcadas se han purificación y caracterización los compuestos marcados para poder emplearlos posteriormente. Paralelo a este proceso se han desarrollado diferentes metodologías analíticas, tanto para caracterizar los patrones como para su aplicación a diferentes muestras: procesos de tratamiento de muestra, como extracciones o derivatizaciones, separaciones por cromatografía de líquidos y de gases, procesos computacionales para tratamiento de datos avanzado y desarrollo de estrategias de cuantificación novedosas. Finalmente, los diferentes compuestos marcados sintetizados y los métodos desarrollados han sido aplicados en diferentes campos del análisis como la cuantificación absoluta de moléculas de interés clínico (Capítulo 1), la cuantificación de péptidos de forma trazable al SI (Capítulo 2), la medida del porcentaje de metilación de citosinas en muestras de ADN (Capítulo 3) y la identificación (anotación) de metabolitos celulares a través de herramientas computacionales y moléculas marcadas isotópicamente.

RESUMEN (en Inglés)

The present Doctoral Thesis proposal takes place within the doctoral study program “Chemical Analysis, Biochemical Analysis, Structural Analysis and Computational Modelling” of the University of Oviedo and the work developed and described in this document have taken place between 2017 and 2022 and under the supervision and direction of Juan Manuel Marchante Gayón and Pablo Rodríguez González, both full professors in the University of Oviedo, and both enclosed to the research group of “Enriched Stable Isotopes” of the Physical- and Analytical- Chemistry Department.

In the context of this work, the enriched stable isotopes are described as part of isotopically labeled molecules, which may be used altogether with Mass Spectrometry (MS) to perform Isotope Dilution measurements (IDMS). Mass Spectrometry is considered a fundamental analytical tool to solve analytical problems of different magnitude and belonging to different fields, including clinical chemistry. Hyphenated with Liquid -and Gas- Chromatography, Mass Spectrometry enables the determination of a huge variety of compounds with clinical interest, such as amino acids, proteins or nucleobases. The high capability of this technology (IDMS) provides a state-of-the-art accuracy and precision of the results. Furthermore, the use of isotopically labeled standards provide unique capabilities in comparison to other quantification strategies. IDMS is a Primary Measurement Method, as it directly measures mass. Therefore, the measurements are directly traceable to the International System of Units (SI). Additionally, the use of labeled standards allows the correction of random and systematic bias within the



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

analytical method. For all these reasons, this methodology is considered the gold standard technology and it is used to validate routine analytical methodologies, which usually do not require such high accuracy, precision, and traceability. Nonetheless, the performance of IDMS measurement requires the use of labeled standards, which usually are very expensive and, on the other hand, sometimes they are not commercially available.

For these reasons, the present Doctoral Thesis deals with the production of labeled molecules and with the development of IDMS methodologies to study biocompounds of clinical significance. This proposal has been performed, firstly, through the synthesis and biosynthesis of different classes of labeled compounds, either using ^{15}N or ^{13}C . Moreover, after the production of the labeled molecules, purification and characterization procedures have been developed to prepare the compounds for their further use. Additionally, different analytical methodologies have been developed, including sample preparation procedures, such as extraction and derivatization procedures, chromatographic separations, both in GC and in LC, data processing and state-of-the-art IDMS quantifications (doble IDMS). Finally, the produced labeled compounds and the developed analytical methods have been used for the absolute quantification of clinically relevant samples (Chapter 1), the SI-traceable quantification of a peptide (Chapter 2), the determination of the cytosine methylation percentage in DNA samples (Chapter 3) and the identification (annotation) of cellular metabolites through computational tools and labeled molecules.

**SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN
COMPUTACIONAL**

ÍNDICE

Resumen	9
Summary	11
Introducción	
1. Análisis por Dilución Isotópica	15
1.1. Análisis por Dilución Isotópica en análisis orgánico	16
1.2. Pureza espectral y enriquecimiento isotópico	18
1.3. Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico	18
1.4. Ecuación del análisis por Dilución Isotópica	19
1.5. Deconvolución de Perfiles Isotópicos	21
1.6. Dilución Isotópica doble	23
2. Aplicaciones de los isótopos estables enriquecidos	25
3. Producción de moléculas marcadas isotópicamente	27
4. Proteómica	29
4.1. Cuantificación relativa de proteínas	30
4.2. Cuantificación absoluta de proteínas	30
4.3. Métodos de cuantificación específicos	31
4.4. Métodos de cuantificación no específicos	33
5. Metabolómica	35
5.1. Metabolómica no dirigida	35
5.1.1. Tratamiento de datos con comandos	37
5.1.2. Paquetes en R	38
5.2. Calidad en metabolómica	39
6. Metabolómica dirigida: Enfermedades metabólicas congénitas	41
6.1. Cribado neonatal	42
6.2. Tipos de muestras en el cribado neonatal	43
7. Bibliografía	46
Objetivo	71
I. Capítulo 1: Síntesis, purificación, caracterización y aplicación de 3-monoyodotirosina y 3,5-diiodotirosina marcada a la determinación de muestras de orina de neonatos	73

I.1. Introducción	
I.1.1. Hipotiroidismo congénito	75
I.1.2. Determinación de metabolitos del tiroides por HPLC-MS/MS	76
I.2. Objetivo	78
I.3. Experimental	
I.3.1. Reactivos y materiales	79
I.3.2. Instrumentación	79
I.3.3. Procedimientos	80
I.4. Resultados y discusión	
I.4.1. Síntesis y purificación de tirosinas marcadas	88
I.4.2. Medida de la composición isotópica de MIT y DIT mediante HPLC-ESI-MS/MS	91
I.4.3. Cálculo del enriquecimiento isotópico, concentración y pureza de ¹⁵ N-MIT y ¹³ C ₂ -DIT	92
I.4.4. Estudios de estabilidad de MIT y DIT en disolución	93
I.4.5. Efectos de matriz en la determinación de MIT y DIT en muestras de orina por LC-MS/MS	95
I.4.6. Estudios de recuperación para el análisis de muestras líquidas.	97
I. 4.7. Estudios de recuperación para el análisis de orina impregnada en tiras de papel (DUS)	99
I. 4.8. Límites de detección y de cuantificación	101
I. 4.9. Análisis de orinas y DUS de neonato	101
I. 4.10. Repetibilidad y reproducibilidad en la determinación de MIT en DUS de neonato	102
I. 4.11. Determinación de MIT en DUS de recién nacidos	104
I. 5. Conclusiones	105
I. 6. Publicación	107

I. 7. Bibliografía	109
II. Capítulo 2: Síntesis, purificación, caracterización y aplicación de angiotensina I marcada a la determinación trazable al SI de angiotensina I	113
II.1. Introducción	
II.1.1. Trazabilidad en proteómica	115
II.1.2. Análisis de aminoácidos en la determinación de péptidos y proteínas	115
II.1.3. Angiotensina I	116
II.2. Objetivo	118
II.3. Experimental	
II.3.1. Reactivos y materiales	119
II.3.2. Instrumentación	120
II.3.3. Procedimientos	120
II.4. Resultados y discusión	
II.4.1. Medida de la composición isotópica de aminoácidos por LC-MS/MS	127
II.4.2. Medida de la composición isotópica de aminoácidos por GC-MS/MS	130
II.4.3. Optimización del procedimiento de hidrólisis	132
II.4.4. Exactitud y precisión del método de hidrólisis por microondas focalizadas	137
II.4.5. Síntesis y purificación de Angiotensina I natural y marcada	139
II.4.6. Medida de la composición isotópica de los péptidos sintetizados empleando LC-ESI-MS/MS y validación del método MRM	141
II.4.7. Cuantificación de Angiotensina I de forma trazable al SI	145
II.5. Conclusiones	148
II.6. Bibliografía	149
III. Capítulo 3: Biosíntesis, extracción, purificación y caracterización de biocompuestos marcados y puesta a punto de un método de medida de metilación de citosinas por Dilución Isotópica HPLC-MS/MS.	158
III.1. Introducción	
III.1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	160

III.2. Objetivo	161
III.3. Experimental	
III.3.1. Reactivos y materiales	162
III.3.2. Instrumentación	164
III.3.3. Procedimientos	165
III.4. Resultados y discusión	
III.4.1. Cultivo de <i>Chlamydomonas</i>	174
III.4.2. Extracción conjunta de proteínas y ácidos nucleicos	175
III.4.3. Extracción selectiva de ácidos nucleicos	177
III.4.4. Determinación del enriquecimiento isotópico de aminoácidos marcados por LC-MS	178
III.4.5. Hidrólisis y purificación de nucleósidos por HPLC semipreparativa	181
III.4.6. Medida del enriquecimiento isotópico de nucleósidos marcados por LC-MS y validación del método de medida de metilación	181
III.4.7. Determinación de la metilación de ADN empleando Dilución Isotópica	184
III.5. Conclusiones	186
III.6. Bibliografía	187
IV. Capítulo 4: Desarrollo de una metodología para la identificación de metabolitos intracelulares naturales y marcados en ¹⁵N de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	192
IV.1. Introducción	
IV.1.1. Identificación de compuestos en metabolómica no dirigida	194
IV.1.2. Identificación de compuestos marcados en metabolómica	195
IV.2. Objetivo	197
IV.3. Experimental	
IV.3.1. Reactivos y materiales	204
IV.3.2. Instrumentación	205
IV.3.3. Procedimientos	198
IV.4. Resultados y discusión	
IV.4.1. Inspección de la separación cromatográfica y la detección	204
IV.4.2. Identificación de parejas de compuestos naturales y marcados con MetExtract II	205

ÍNDICE

IV.4.3. Identificación de compuestos naturales con MSDIAL	208
IV.4.4. Tratamiento de datos para la identificación de parejas de compuestos naturales y marcados	212
IV.5. Conclusiones	237
IV.6. Bibliografía	238
Anexo I.	243
Anexo II.	259

Resumen

La presente Tesis Doctoral se engloba dentro del programa de doctorado de Análisis Químico, Bioquímico, Estructural y Modelización Computacional de la Universidad de Oviedo y los trabajos desarrollados y descritos en esta Tesis han sido realizados entre 2017 y 2022 bajo la dirección de Don Juan Manuel Marchante Gayón y de Don Pablo Rodríguez González, ambos profesores de la Universidad de Oviedo, pertenecientes al Grupo de Isótopos Estables Enriquecidos del Departamento de Química Física y Analítica. En el contexto de esta Tesis, los isótopos estables enriquecidos se encuentran en moléculas, conformando moléculas marcadas isotópicamente, cuyo uso más frecuente es junto a la Espectrometría de Masas para llevar a cabo análisis por Dilución Isotópica (IDMS). La Espectrometría de Masas, en sus diferentes variantes, es una herramienta analítica fundamental para la resolución de los problemas químico-analíticos que se plantean en una gran variedad de campos científicos y técnicos, incluyendo el ámbito clínico. En combinación con la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos posibilita la determinación una gran variedad de biocompuestos de interés clínico, gracias en gran medida a la elevada sensibilidad, exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Así mismo, el empleo de patrones marcados isotópicamente permite el desarrollo de metodologías analíticas (IDMS) que proporcionan ventajas únicas respecto a otras estrategias de calibración. IDMS está considerado un método primario de medida, ya que permite corregir la mayoría de los errores aleatorios y sistemáticos de una metodología analítica, por lo que los resultados obtenidos son directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI). Por tanto, estas metodologías están consideradas metodologías analíticas de referencia y sirven para validar los métodos analíticos de rutina empleados en los laboratorios clínicos. Sin embargo, la utilización de esta herramienta analítica requiere el empleo de compuestos marcados isotópicamente que suelen ser costosos o no existir comercialmente, como suele ser en el caso de moléculas complejas como las proteínas o los péptidos.

La presente Tesis Doctoral ha abordado la producción de patrones marcados isotópicamente y su posterior uso con métodos IDMS. Para ello se han desarrollado, en primer lugar, diferentes métodos de síntesis y de biosíntesis de moléculas marcadas tanto en ^{15}N como en ^{13}C . Así mismo, tras la producción de moléculas marcadas se han purificación y caracterización los compuestos marcados para poder emplearlos posteriormente. Paralelo a este proceso se han desarrollado diferentes metodologías analíticas, tanto para caracterizar los patrones como para su aplicación a diferentes muestras: procesos de tratamiento de muestra, como extracciones o derivatizaciones, separaciones por cromatografía de líquidos y de gases, procesos computacionales para tratamiento de datos avanzado y desarrollo de estrategias de cuantificación novedosas. Finalmente, los diferentes

RESUMEN

compuestos marcados sintetizados y los métodos desarrollados han sido aplicados en diferentes campos del análisis como la cuantificación absoluta de moléculas de interés clínico (Capítulo 1), la cuantificación de péptidos de forma trazable al SI (Capítulo 2), la medida del porcentaje de metilación de citosinas en muestras de ADN (Capítulo 3) y la identificación (anotación) de metabolitos celulares a través de herramientas computacionales y moléculas marcadas isotópicamente.

Summary

The present Doctoral Thesis proposal takes place within the doctoral study program “Chemical Analysis, Biochemical Analysis, Structural Analysis and Computational Modelling” of the University of Oviedo and the work developed and described in this document have taken place between 2017 and 2022 and under the supervision and direction of Juan Manuel Marchante Gayón and Pablo Rodríguez González, both full professors in the University of Oviedo, and both enclosed to the research group of “Enriched Stable Isotopes” of the Physical- and Analytical- Chemistry Department. In the context of this work, the enriched stable isotopes are described as part of isotopically labeled molecules, which may be used altogether with Mass Spectrometry (MS) to perform Isotope Dilution measurements (IDMS). Mass Spectrometry is considered a fundamental analytical tool to solve analytical problems of different magnitude and belonging to different fields, including clinical chemistry. Hyphenated with Liquid -and Gas- Chromatography, Mass Spectrometry enables the determination of a huge variety of compounds with clinical interest, such as amino acids, proteins or nucleobases. The high capability of this technology (IDMS) provides a state-of-the-art accuracy and precision of the results. Furthermore, the use of isotopically labeled standards provide unique capabilities in comparison to other quantification strategies. IDMS is a Primary Measurement Method, as it directly measures mass. Therefore, the measurements are directly traceable to the International System of Units (SI). Additionally, the use of labeled standards allows the correction of random and systematic bias within the analytical method. For all these reasons, this methodology is considered the gold standard technology and it is used to validate routine analytical methodologies, which usually do not require such high accuracy, precision, and traceability. Nonetheless, the performance of IDMS measurement requires the use of labeled standards, which usually are very expensive and, on the other hand, sometimes they are not commercially available.

For these reasons, the present Doctoral Thesis deals with the production of labeled molecules and with the development of IDMS methodologies to study biocompounds of clinical significance. This proposal has been performed, firstly, through the synthesis and biosynthesis of different classes of labeled compounds, either using ^{15}N or ^{13}C . Moreover, after the production of the labeled molecules, purification and characterization procedures have been developed to prepare the compounds for their further use. Additionally, different analytical methodologies have been developed, including sample preparation procedures, such as extraction and derivatization procedures, chromatographic separations, both in GC and in LC, data processing and state-of-the-art IDMS quantifications (doble IDMS). Finally, the produced labeled compounds and the developed analytical methods have been used for the absolute quantification of clinically relevant samples (Chapter 1), the SI-traceable

SUMMARY

quantification of a peptide (Chapter 2), the determination of the cytosine methylation percentage in DNA samples (Chapter 3) and the identification (annotation) of cellular metabolites through computational tools and labeled molecules.

INTRODUCCIÓN

1. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA

La Dilución Isotópica (ID) es una técnica de calibración de análisis químico cuantitativo que se emplea junto a la Espectrometría de Masas (IDMS). Se caracteriza por el empleo de isótopos estables enriquecidos, ya sea en su forma elemental o incorporados a la estructura química de moléculas. Estos elementos o moléculas, conocidos como trazadores isotópicos, se añaden a la muestra al principio del proceso de preparación de muestra. Una vez alcanzado una mezcla completa y homogénea entre la muestra y el trazador (equilibrio isotópico), es posible corregir los errores derivados de los distintos pasos implicados en la preparación de la muestra. Además, IDMS es un método absoluto de análisis, pues permite realizar determinaciones cuantitativas de elevada exactitud y precisión directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI)¹. Sin embargo, solo puede aplicarse en elementos poli-isotópicos o en moléculas que contengan al menos un elemento poli-isotópicos. En lo que respecta al análisis de moléculas orgánicas este hecho no es un problema, ya que sus principales elementos constituyentes (H, C, O, N y S) presentan varios isótopos estables.

En general, IDMS se puede dividir en dos categorías: el análisis elemental y el análisis molecular. El análisis elemental se centra en la determinación de elementos y en análisis de especiación elemental mediante el acoplamiento de técnicas cromatográficas. En ambos casos se requiere que los espectrómetros de masas estén acoplados a una fuente de ionización atómica, como la fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP). Las principales ventajas del acoplamiento de la fuente ICP a un espectrómetro de masas (ICP-MS) son su alta sensibilidad, su rapidez para realizar análisis cuantitativos y cualitativos con muy bajos efectos de matriz. Las relaciones señal-ruido obtenidas suelen ser muy elevadas, lo que repercute en unos bajos límites de detección, en torno a las partes por trillón (ppt)².

El campo de aplicación de la Dilución Isotópica molecular es mucho más amplio, permitiendo desde la determinación de moléculas de bajo peso molecular hasta la determinación de macromoléculas como proteínas³. A lo largo de esta Tesis Doctoral, cuando se haga referencia a IDMS hablaremos de la determinación de moléculas mediante el uso de análogos marcados isotópicamente, aunque los principios y las ecuaciones de IDMS utilizados a lo largo de la Tesis se pueden aplicar tanto al análisis elemental como al análisis orgánico. En la Figura 1 se muestra el espectro de masas de un analito, el de un análogo

marcado isotópicamente con una diferencia de masa de 1 Da y el espectro de la mezcla de ambos donde se observa un solapamiento espectral.

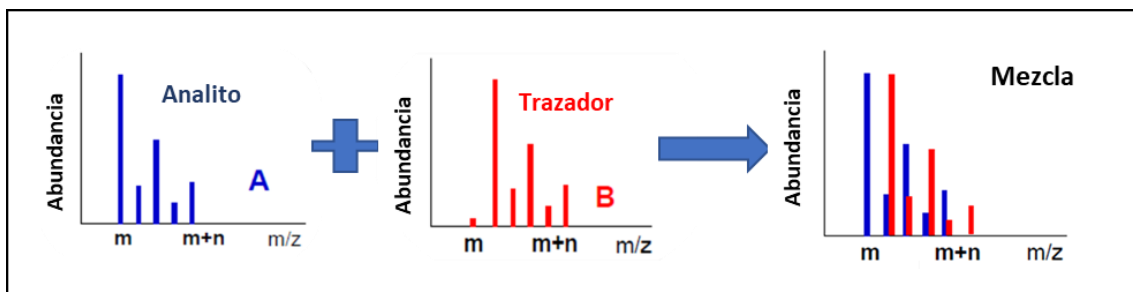


Figura 1. Espectros de masas de un compuesto natural, de su análogo marcado isotópicamente y de la mezcla de ambos.

1.1. Análisis por dilución isotópica en análisis orgánico

En la bibliografía se encuentran fundamentalmente dos estrategias de cuantificación cuando se aplica la dilución isotópica en la determinación de compuestos orgánicos. La primera estrategia fue desarrollada en 1976 por Pickup y McPherson, quienes publicaron un estudio donde aseguraban que no se podía llevar a cabo la medida experimental de las abundancias isotópicas de un trazador⁴. Por ello, propusieron el empleo de una estrategia de determinación empírica basada en la realización de calibrados metodológicos, donde una molécula marcada (trazador) es empleada como patrón interno (PI) y se lleva a cabo la cuantificación a través de una regresión lineal. Cuando se aplica esta estrategia suele utilizarse un trazador isotópico múltiplemente marcado para evitar el solapamiento espectral entre el analito y el trazador, para trabajar con rectas de calibración en lugar de polinomios. Por otro lado, la segunda estrategia desarrollada por el Grupo de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo está basada en el uso de la regresión lineal múltiple y permite la cuantificación directa del analito siempre y cuando se haya caracterizado previamente el trazador isotópico en concentración y enriquecimiento isotópico. Esta segunda estrategia permite una determinación directa del analito, sin la realización de calibrados metodológicos, reduciendo el empleo de reactivos y el tiempo de operación (pesadas, preparación de mezclas, etc.).

En general, la estrategia más empleada hasta el momento ha sido la primera, ya que el uso de calibrados metodológicos resulta sencillo de aplicar en laboratorios de análisis de rutina. Además, en este caso no se requiere una caracterización de la concentración ni de la composición isotópica del trazador. Como se resumen en la Figura 2, una diferencia de masa importante entre el compuesto “natural” y el marcado puede provocar la presencia de efectos isotópicos, lo cual es muy habitual cuando se emplean trazadores que contienen deuterio⁵. Esto es especialmente relevante para algunos métodos de análisis como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetros de masas con fuente de electrospray ya que la supresión de la ionización es muy variable con el tiempo y con ello la señal de los analitos, lo que puede conducir a cuantificaciones erróneas. Alternativamente, el empleo de moléculas mínimamente marcadas permite una corrección completa de los efectos isotópicos, aunque en estos casos se deba trabajar con regresiones polinomiales.

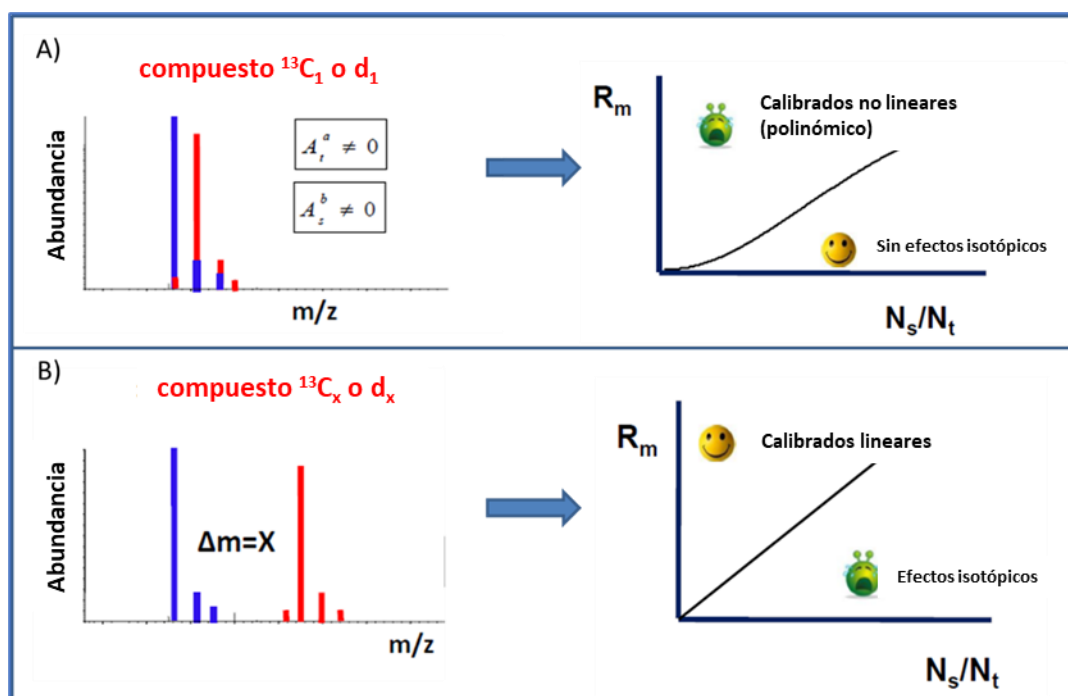


Figura 2. Estrategias de cuantificación en Dilución Isotópica para análisis molecular basadas en la realización de calibrados metodológicos: A) con solapamiento espectral y B) sin solapamiento espectral.

1.2. Pureza espectral y enriquecimiento isotópico

La distribución isotópica en elementos o distribución de isotopólogos en moléculas es la expresión matemática que describe la abundancia relativa de cada isótopo o isotopólogo constituyente. Para elementos monoisotópicos la probabilidad es uno y para elementos poliisotópicos la probabilidad se puede expresar a través de una distribución polinómica. Las probabilidades de encontrar determinados isótopos en la naturaleza han sido establecidas por la IUPAC⁶. Así, se considera que un elemento o una molécula es “natural” cuando su distribución de isótopos o isotopólogos, respectivamente, es la establecida por la IUPAC. Mediante procesos fisicoquímicos intencionados, un elemento o una molécula se puede obtener enriquecido o marcada isotópicamente, refiriéndose el término “marca” a la presencia de un elemento enriquecido isotópicamente en la molécula. Por lo tanto, el *enriquecimiento isotópico* es un parámetro necesario para describir la distribución isotópica de un elemento o molécula cuya composición de isótopos o isotopólogos ha sido modificada intencionadamente respecto a las abundancias isotópicas naturales. A la acción de introducir un elemento enriquecido en una molécula se le llama marcaje isotópico y una molécula marcada isotópicamente es caracterizada, entre otras cosas, por la identidad de la marca (¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O, ³²S, etc.), el número de marcas, su posición en la molécula y su enriquecimiento isotópico.

1.3. Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico

La pureza espectral es la concordancia entre la distribución de isotopólogos de una molécula obtenida experimentalmente y los valores teóricos obtenidos a partir de las abundancias isotópicas de sus elementos constituyentes. Se obtiene a través de la medida simultánea de los valores de m/z en un clúster seleccionado de la molécula. Dado que es un parámetro experimental, su valor depende del instrumento de medida y de las condiciones de la misma.

Respecto al enriquecimiento isotópico de moléculas marcadas, en la literatura se han descrito diversas formas de determinarlo⁷⁻⁹. Estudios previos han demostrado que los espectrómetros de alta resolución de tipo Orbitrap presentan una respuesta no lineal en la medida de la distribución de isotopólogos por lo que no son adecuados para este tipo de determinaciones¹⁰.

Por otro lado, cuando se utiliza una fuente de ionización electrónica (EI) los clústeres obtenidos tras la ionización pueden no ser como consecuencia de la pérdida o ganancia de átomos de hidrógeno. Cuando se utiliza un analizador de masas de tipo cuadrupolo la falta de resolución del mismo hace que exista un solapamiento espectral a masa M-1 incluso en equipos adecuadamente calibrados¹¹. Por último, cuando se utilizan analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF), se han descrito errores en la medida de distribuciones isotópicas asociados con la cantidad de analito inyectada en el equipo¹².

En la medida del enriquecimiento isotópico hay que tener en cuenta la pureza espectral¹³. Sin embargo, la pureza espectral no puede determinarse en una molécula marcada ya que experimentalmente no hay forma de discernir entre la desviación en la distribución isotópica debida a factores instrumentales y la debida a la presencia de elementos enriquecidos.

El grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral describió un procedimiento para determinar el enriquecimiento isotópico basado en la medida de la pureza espectral de los compuestos naturales, la medida de la distribución isotópica de las moléculas marcadas y la comparación de la distribución isotópica experimental corregida de la molécula marcada con 100 distribuciones teóricas de esa molécula para 100 posibles enriquecimientos isotópicos. En este cálculo, tanto el factor de la pureza espectral como el enriquecimiento se obtienen al realizar un ajuste de regresión lineal entre distribuciones isotópicas teóricas y experimentales. Para el compuesto natural, la distribución isotópica teórica se puede calcular a través de diferentes cálculos, siendo de especial relevancia por su sencillez el desarrollado en 1991 por Kubinyi, basado en multiplicaciones de matrices¹⁴. Para el compuesto marcado, la distribución isotópica teórica se obtiene a través de una hoja de Excel y una macro propia, basada en el método de Kubinyi¹⁵. Finalmente, el valor de enriquecimiento isotópico considerado como verdadero es aquel teórico que presenta un mejor ajuste frente a los valores experimentales.

1.4. Ecuación del análisis por Dilución Isotópica

En Dilución Isotópica la ecuación que se emplea para obtener la cantidad de analito proviene del balance de masas (moles) del analito. Como se describe en la ecuación (1), la cantidad de

moles de un analito en una mezcla (N_m) es la suma de los moles originales presentes en una muestra (N_s) más los moles añadidos intencionadamente de trazador (N_t).

$$N_m = N_s + N_t \quad (1)$$

Para un isótopo **a** en un elemento **i** se da el mismo balance de masa y para, en el caso más sencillo de un elemento con dos isótopos, los balances de masa vienen dados por las ecuaciones 2 y 3.

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad (2)$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad (3)$$

Si se divide la ecuación (2) entre la ecuación (3) se obtiene la relación isotópica de ambos isótopos (**a/b**) en la mezcla (R_m) la cual se puede expresar como:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (5)$$

donde $N_s^a = N_s A_s^a$; $N_t^a = N_t A_t^a$; $N_s^b = N_s A_s^b$; $N_t^b = N_t A_t^b$ si se tienen en cuenta las abundancias de los isótopos **a** y **b** en la muestra (A_s^a y A_s^b) y en el trazador (A_t^a y A_t^b) respectivamente. Despejando N_s en la ecuación (5) se obtiene la ecuación (6):

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (6)$$

La ecuación (6) es la forma más básica de la ecuación de la Dilución Isotópica. En ella se verifica que conociendo la composición isotópica de la molécula marcada (trazador), la composición isotópica de la molécula natural y el número de moles añadidos de trazador, se

puede calcular el número de moles del elemento en la muestra solamente con la medida de la relación isotópica R_m en la mezcla. Esta ecuación se puede adaptar para expresar concentraciones utilizando los pesos atómicos del analito natural y marcado y los pesos tomados de la muestra y del trazador. En la ecuación (6), todos los parámetros son conocidos a excepción de la relación isotópica R_m . Por tanto, la concentración del analito en la muestra C_s se determina con la medida de R_m . Como se comprueba en esta ecuación, no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental y la incertidumbre de la medida depende, fundamentalmente, de la incertidumbre de la medida de la relación isotópica R_m . Por último, la medida de R_m proporciona directamente la concentración inicial del analito en la muestra, con lo que no es necesario recurrir a la calibración externa instrumental ni a métodos de adiciones estándar, consiguiendo un ahorro considerable en el tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales.

Sin embargo, para que todas estas afirmaciones sean veraces se han de cumplir algunos requisitos: En primer lugar, se debe tener en cuenta que cualquier pérdida de sustancia (ya sea de muestra o de trazador) antes de que se produzca el equilibrio isotópico será una fuente de error importante. Además, una vez que se haya alcanzado el equilibrio isotópico, la molécula marcada isotópicamente añadida a la muestra deberá comportarse de una manera idéntica respecto a la molécula natural a lo largo de todo el proceso analítico. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos **a** y **b** realizada por el espectrómetro de masas debe estar libre de interferencias espectrales y los factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas deben estar controlados. Finalmente, también se han de controlar exhaustivamente los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos de R_m . Es importante resaltar que en el caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica medida no proporcionará un valor exacto de la concentración inicial del elemento en la muestra.

1.5. Deconvolución de Perfiles Isotópicos

La Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) es un procedimiento matemático alternativo empleado en Dilución Isotópica que está basado en una regresión lineal múltiple. Como se muestra en la Figura 3, este procedimiento proporciona la contribución relativa (fracciones

molares) del espectro de masa del compuesto natural y el del trazador isotópico a un espectro de masas de la mezcla de ambos obtenido experimentalmente. Conociendo el número de moles de trazador añadido a la mezcla, este procedimiento permite la cuantificación de elementos y compuestos incluso cuando presentan espectros de masas solapados sin necesidad de realizar un calibrado metodológico. Adicionalmente, ya que se pueden introducir múltiples isotopólogos en el cálculo, los grados de libertad adicionales permiten corregir posibles interferencias en el espectro de masas de la mezcla. Así mismo, esta herramienta puede ser aplicada para obtener contribuciones adicionales al espectro de masas resultante, como puede ocurrir en el caso de interconversiones entre analitos. Esta estrategia de cuantificación fue desarrollada en 2010 por el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo para el análisis de compuestos orgánicos empleando LC-MS/MS¹⁶.

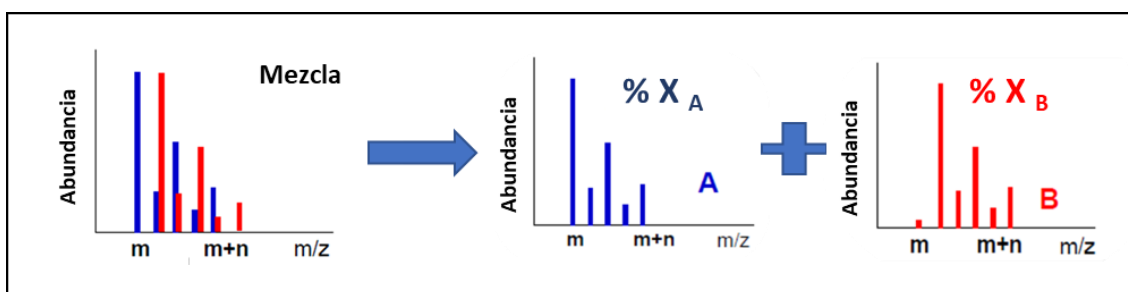


Figura 3. Ilustración del concepto de Deconvolución de Perfiles Isotópicos en el que un espectro de masas de una mezcla de analito y trazador se deconvoluciona en dos espectros de masa diferentes obteniéndose el porcentaje de cada uno de ellos (fracciones molares).

La ecuación (7) expresa la distribución isotópica (obtenida experimentalmente) para la medida de n relaciones masa carga (m/z) de una muestra como una combinación lineal de dos distribuciones isotópicas: la del perfil isotópico del compuesto de abundancia natural y del perfil isotópico del compuesto marcado isotópicamente. En la ecuación (7), A se refiere a la abundancia relativa de cada uno de los isotopólogos constituyentes de la molécula y e es un parámetro de medida del error en el ajuste.

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^1 & A_t^1 \\ A_s^2 & A_t^2 \\ A_s^3 & A_t^3 \\ \dots & \dots \\ A_s^{n-1} & A_t^{n-1} \\ A_s^n & A_t^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_s \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (7)$$

Las soluciones a la ecuación (7) son las fracciones molares del compuesto natural (x_s) y el compuesto enriquecido isotópicamente (x_t). A partir de la relación de estas fracciones molares se obtiene directamente el número de moles de compuesto natural (N_s) según la ecuación (8), siempre y cuando se conozca previamente el número de moles de compuesto enriquecido o trazador añadido al comienzo del proceso (N_t).

$$\frac{N_s}{N_t} = \frac{x_s}{x_t} \quad (8)$$

Esta estrategia se ha empleado para la cuantificación de analitos de forma exacta y precisa en una multitud de matrices, demostrando su exactitud e idoneidad para corregir las variaciones en la señal de un analito debidas a los efectos de matriz en la ionización por electrospray¹⁷⁻²⁵. Adicionalmente, la determinación de compuestos a través de distribuciones isotópicas es un campo de estudio actual en metabolómica, ya que en la mayoría de los estudios de fluxómica no se puede evitar un solapamiento espectral entre el compuesto natural y el marcado²⁶.

1.6. Dilución Isotópica doble

La Dilución Isotópica también se emplea para llevar a cabo estudios de especiación elemental. El término especiación se refiere a la determinación de las distintas especies químicas en las que puede encontrarse un elemento en una muestra. El análisis por Dilución Isotópica se ha venido aplicando dentro del campo de la especiación a la determinación de compuestos organometálicas, como por ejemplo compuestos de mercurio, o compuestos orgánicos de selenio o de hierro²⁷. Así, esta metodología ha sido empleada para llevar a cabo

estudios nutricionales²⁸, clínicos²⁹ y para estudiar la transformación de especies orgánicas durante el tratamiento de muestra³⁰. Este último aspecto se puede abordar a través de Dilución Isotópica doble y triple para cuantificar especies que son proclives a sufrir procesos de degradación y/o conversión, como en el caso de las especies de mercurio, los iones nitrito y nitrato, la creatina y creatinina y los diferentes nucleótidos³¹⁻³⁴.

En el caso de la Dilución Isotópica doble se emplean dos trazadores isotópicos con un marcaje distinto para cuantificar dos analitos. De este modo el perfil isotópico de cada analito se puede expresar como una combinación lineal de tres perfiles isotópicos, tal como se describe en la ecuación (9), análoga a la ecuación (7) pero en la que se añade la contribución de un segundo trazador (χ_{t2}). Este procedimiento de cuantificación se desarrolló en el grupo de investigación donde se ha realizado la presente Tesis Doctoral para determinar la interconversión de compuestos butilados de estaño, compuestos de Hg, especies de Cr y para la determinación de creatina-creatinina. Como se ha dicho anteriormente. los dos trazadores deben presentar un marcaje diferente. En el caso de compuestos orgánicos deben presentar un número de átomos marcados distinto.

$$\begin{bmatrix} A_1^m \\ A_2^m \\ A_3^m \\ A_4^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1^s & A_1^{t1} & A_1^{t2} \\ A_2^s & A_2^{t1} & A_2^{t2} \\ A_3^s & A_3^{t1} & A_3^{t2} \\ A_4^s & A_4^{t1} & A_4^{t2} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s \\ x_{t1} \\ x_{t2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \end{bmatrix} \quad (9)$$

Para un analito A que se convierte en B, y viceversa, se establecen los factores de conversión F1 y F2, tal como se describe en la ecuación (10) y los balances de masas para A y B son los descritos en las ecuaciones (11) y (12). El procedimiento matemático se describe con detalle en Queipo Abad *et al.*³⁴

$$A \xrightleftharpoons[F1 \rightarrow]{\leftarrow F2} B \quad (10)$$

$$N_m^A = N_s^A + N_{t1}^A + N_{t2}^A \quad (11)$$

$$N_m^B = N_s^B + N_{t1}^B + N_{t2}^B \quad (12)$$

2. APLICACIONES DE LOS ISÓTOPOS ESTABLES ENRIQUECIDOS.

Los isótopos estables enriquecidos encuentran diversas aplicaciones en el estudio de los seres vivos, como los estudios de ecología, los estudios nutricionales y los estudios metabolómicos y proteómicos. Los primeros se emplean para estudiar poblaciones animales y sus desplazamientos o distribución geográfica, tanto en paleontología como en estudios actuales, y van desde los estudios de captura-recaptura hasta los estudios de relaciones isotópicas³⁵⁻³⁷. Los estudios nutricionales, por su parte, ponen el foco en los sustratos energéticos de los organismos vivos (glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales)^{38,39}, mientras que los estudios metabolómicos y proteómicos están dedicados a la caracterización del estado biológico de un organismo, como, por ejemplo, su metabolismo celular o su expresión génica⁴⁰⁻⁴². Así mismo, estos estudios no solo pertenecen al ámbito de la investigación, sino que los isótopos estables también se emplean para el diagnóstico clínico en humanos, ya sea a través de su administración o como patrones internos empleados para la cuantificación⁴³⁻⁴⁶. Sin embargo, y a pesar de la inocuidad de los isótopos estables³⁸, alimentar humanos o inyectar sustancias para llevar a cabo investigaciones presenta una serie de controles regulatorios y tiene unas implicaciones éticas que hacen que la mayoría de los laboratorios y centros de investigación realicen sus investigaciones empleando organismos menos complejos, como levaduras, hongos, plantas o ratones.

Por otro lado, las investigaciones en ciencias -ómicas presentan tres enfoques: estudio de analitos concretos conocidos (enfoque dirigido o *targeted*), monitorización global de analitos (enfoque no dirigido o *untargeted*) y el enfoque semidirigido⁴⁷. En los primeros se conoce la identidad de los compuestos a determinar y se suele obtener información cuantitativa absoluta, mientras que en los segundos la identidad es desconocida y la información obtenida es semicuantitativa. Por otro lado, entre ambos enfoques se encuentran los semidirigidos, donde se obtiene a la vez información cuantitativa para algunos analitos y semicuantitativa para otros. Así, generalmente los estudios dirigidos utilizan espectrómetros de masas de baja resolución, mientras que los no dirigidos y semidirigidos emplean habitualmente espectrómetros de masas de alta resolución. Por otro lado, en ambos casos las investigaciones pueden estar dedicadas a la identificación o elucidación estructural, a la cuantificación relativa o absoluta, o a ambos propósitos.

En 1935 se llevó a cabo el que podríamos considerar como el primer experimento empleando isótopos estables enriquecidos y un organismo vivo: el empleo de ácidos grasos (aceite de linaza) marcados en deuterio para estudiar el metabolismo lipídico de ratones⁴⁸. Desde entonces, se ha desarrollado una gran variedad de métodos para llevar a cabo estudios de transformación de especies y cuantificar metabolitos en diferentes organismos, células, entornos y enfermedades⁴⁹⁻⁵². En estos experimentos se ha empleado principalmente ¹³C, por ser el carbono el principal elemento que conforma las estructuras moleculares. Sin embargo, también es frecuente el empleo de ²H, ¹⁵N, ¹⁸O, ³²S o ⁸²Se, al encontrarse estos elementos frecuentemente en las moléculas. El empleo de isótopos de hidrógeno y oxígeno presenta la desventaja de que, en experimentos biológicos, en muchos casos estos se intercambian con isótopos de hidrógeno y oxígeno del medio celular (agua), perdiéndose las marcas isotópicas⁵³. Así mismo, el empleo de hidrógeno no es recomendado, pues presenta efectos isotópicos⁵⁴. Por otro lado, de los elementos mencionados anteriormente, el azufre y el selenio son los menos frecuentes, encontrándose principalmente en la metionina, la cisteína, sus derivados con selenio y los compuestos de sus ciclos metabólicos. Por último, el nitrógeno ha sido ampliamente empleado en el estudio del metabolismo del nitrógeno, muy importante en plantas y en estudios proteómicos. Adicionalmente, caben destacar los estudios donde se emplea simultáneamente isótopos estables de diferentes elementos, lo que permite, entre otras cosas, determinar exactamente los desplazamientos elementales en las rutas metabólicas o llevar a cabo determinaciones de propiedades fisicoquímicas⁵⁵⁻⁵⁷. Recientemente se ha publicado una revisión donde se recoge un elevado número de artículos sobre (micro)organismos, plantas y animales en los que se han empleado isótopos estables enriquecidos⁵⁸. Los isótopos estables de los elementos mencionados y sus abundancias relativas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Isótopos estables y su abundancia relativa de los elementos mencionados en esta sección.

Elemento	Isótopo estable	Abundancia rel. ⁶ (%)
Hidrógeno	¹ H	99,99
	² H	0,01
Carbono	¹² C	98,89
	¹³ C	1,11
Oxígeno	¹⁶ O	99,76
	¹⁷ O	0,03
	¹⁸ O	0,21
Nitrógeno	¹⁴ N	99,64
	¹⁵ N	0,36
Azufre	³² S	95,02
	³³ S	0,75
	³⁴ S	4,24
	³⁶ S	0,02
Selenio	⁷⁴ Se	0,89
	⁷⁶ Se	9,37
	⁷⁷ Se	7,63
	⁷⁸ Se	23,77
	⁸⁰ Se	49,61
	⁸² Se*	8,73

*Isótopo no estable pero con un tiempo de vida muy elevado.

3. PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS MARCADAS ISOTÓPICAMENTE

La obtención de moléculas marcadas para llevar a cabo cuantificaciones por dilución isotópica o estudios en metabolómica se puede abordar a través de la síntesis química o combinando la biotecnología y la síntesis bioquímica.

La síntesis química presenta la ventaja de ser, por lo general, sencilla y económicamente asequible. Sin embargo, también presenta dos desventajas importantes:

- 1) La síntesis química produce generalmente una molécula por ruta sintética.
- 2) Las rutas sintéticas son muy complejas a la hora de obtener productos naturales, como por ejemplo lípidos que presenten múltiples dobles enlaces en diferentes posiciones y centros quirales.

Todo ello hace que, en determinados casos, la síntesis química no sea viable o rentable económicamente. En todo caso, recientemente se ha empleado la síntesis química para producir el primer CRM de un compuesto marcado isotópicamente (⁸²Se-metionina)⁵⁹ y, adicionalmente, es la opción por excelencia en la síntesis de péptidos y proteínas marcadas, tal y como se ha comentado en la sección b.i.

Alternativamente, la biotecnología emplea microorganismos para obtener moléculas de alto valor añadido (fármacos, vacunas, etc)⁶⁰ y también para obtener reservorios nutricionales⁶¹ o energéticos (biocombustibles)⁶². El cultivo y crecimiento de microorganismos en presencia de isótopos estables es un proceso que ha sido utilizado en estudios del metabolismo celular. Por ejemplo, la técnica SILAC se sirve del cultivo *in vivo* de células para llevar a cabo estudios en proteómica cuantitativa⁶³. Por ello, el empleo de microorganismos como herramienta biotecnológica para producir moléculas marcadas se ha convertido en la opción preferente cuando se trata de obtener productos naturales complejos o mezclas de productos marcados.

En lo que respecta al empleo de (micro)organismos como herramienta biotecnológica, su elección debe adecuarse al objetivo para el cual se utiliza. En el ámbito de la producción de moléculas marcadas esta premisa no es diferente y en este caso deben ser tenidas en cuenta variables adicionales, como la tasa de incorporación del isótopo añadido, la cual se determina generalmente a través del enriquecimiento isotópico de las moléculas sintetizadas. Este proceso se ve afectado por:

- 1) La incorporación selectiva de moléculas⁶⁴.
- 2) Factores de discriminación^{65,66}.
- 3) La tasa de recambio biológico o *turnover*, siendo este último factor el más significativo y el que, por ejemplo, hace que haya una baja tasa de incorporación isotópica en organismos superiores⁶⁷.

El grupo de investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo, en el cual se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, posee una gran experiencia en la producción de moléculas marcadas para su aplicación análisis químico o la realización de estudios metabólicos. A través de colaboraciones con diferentes grupos de investigación del área de Bioquímica, Biología Redox y Biología de Organismos y Sistemas se han cultivado diferentes (micro)organismos y líneas celulares para llevar a cabo investigaciones empleando diferentes isótopos estables enriquecidos. Así, se ha cultivado levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de ³⁴S y ⁸²Se y se ha empleado la misma para realizar estudios metabólicos y cuantificar diferentes compuestos de azufre y selenio en suplementos nutricionales y en muestras de plasma y de orina⁶⁸⁻⁷⁵. Por otro lado, también se ha empleado

^{13}C -glucosa y $^{15}\text{NH}_4$ para llevar a cabo cultivos celulares, cultivos de microalgas y estudios metabólicos en ratones⁷⁶⁻⁷⁸.

4. PROTEÓMICA

La proteómica es el campo de estudio científico dedicado a estudiar el proteoma, esto es, el conjunto de péptidos y proteínas presentes en un sistema biológico, tanto a nivel composicional, como estructural y funcional. Los diferentes campos que aborda y los diferentes enfoques en las investigaciones hacen que exista un elevado número de estrategias y de técnicas analíticas empleadas para llevar a cabo estudios en proteómica. Tradicionalmente el 2D-SDS-PAGE y el Western Blot⁷⁹ han sido los métodos empleados en el estudio de proteínas por su sencillez, bajo coste y buena linealidad y sensibilidad, así como los enzoinmunoensayos (ELISA), que presentan una mayor especificidad y sensibilidad⁸⁰. Sin embargo, con el desarrollo y comercialización de la fuente de ionización electrospray (ESI) y su aplicación al análisis de proteínas⁸¹, la Espectrometría de Masas se ha convertido en la técnica por excelencia en proteómica, dada una serie de ventajas:

- 1) Es capaz de detectar, potencialmente (y simultáneamente), cualquier proteína presente en la muestra con una sensibilidad mayor que con cualquier otra técnica analítica.
- 2) Permite la inequívoca identificación de proteínas, al menos hasta la estructura secundaria, incluyendo aquellas que presentan modificaciones post-transcripcionales (PTMs).
- 3) Permite realizar cuantificaciones absolutas y trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI).

Por otro lado, el estado del arte actual de este campo de la investigación ha sido posible gracias al desarrollo teórico e instrumental de nuevas tecnologías como el uso de isótopos estables enriquecidos y la Dilución Isotópica, fundamentales en proteómica cuantitativa.

4.1. Cuantificación relativa de proteínas

La mayoría de las aplicaciones actuales de cuantificación en proteómica con Espectrometría de Masas se basan en la comparación de las proteínas de la muestra de estudio respecto a una muestra de referencia⁸². Esto se conoce como “proteómica diferencial” y estudia los cambios del proteoma en función de una serie de características de estudio como pueden ser el estado de ciclo celular, el estado de una enfermedad o el metabolismo de un fármaco⁸³. El uso de la Dilución Isotópica y el empleo de moléculas marcadas isotópicamente proporciona información única en estos estudios y, dentro de este tipo de técnicas, se encuentran el marcaje metabólico con ^{13}C o ^{15}N o con aminoácidos, SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture)⁶³, el marcaje químico o la derivatización enzimática *in vitro* con ^{18}O ^{84,85}, y las estrategias de derivatización y marcaje con reactivos químicos ICAT (Isotope Coded Affinity Tags)⁸⁶ e iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification)^{87,88}. A pesar del gran uso y utilidad de estas estrategias, la caracterización de forma exacta del estado biológico de una muestra, y por ende la comparación de unos estudios con otros, no puede realizarse de forma directa. Esto es debido a que no se dispone de información cuantitativa absoluta, la cual es fundamental para caracterizar de forma exacta y universal un estado biológico respecto a sus proteínas y la concentración de las mismas en los diferentes compartimentos celulares⁸⁹. De hecho, para la mayoría de las proteínas y péptidos de baja abundancia no se conocen valores exactos de referencia en muestras de ámbito clínico-biológico, con las implicaciones que esto tiene, tanto a nivel médico-científico como a nivel de estudios globales, trazabilidad e intercomparación de resultados.

4.2. Cuantificación absoluta de proteínas

Una estrategia para la cuantificación absoluta de proteínas es la estandarización interna con análogos marcados isotópicamente⁹⁰. Aunque esta práctica se encuentra muy desarrollada, para su realización se requieren patrones que se comporten exactamente igual al analito para evitar posibles diferencias en los diferentes procesos fisicoquímicos del procedimiento analítico, lo cual no es posible con compuestos marcados con deuterio ya que no se corrigen determinados efectos isotópicos. No obstante, la mayoría de estos métodos de cuantificación absoluta de proteínas por Espectrometría de Masas emplean patrones de especies diferentes

a las que se pretende determinar debido a la carencia de patrones de péptidos y proteínas dado que su síntesis y aislamiento presenta una gran complejidad con diferentes niveles estructurales (distribución espacial) y/o modificaciones post-transduccionales (PTMs). Esta particularidad hace que la mayoría de los métodos actuales de cuantificación de proteínas no sean métodos de cuantificación absoluta que presenten resultados universales y reproducibles, y que el control de calidad y la trazabilidad de las medidas en proteómica cuantitativa sea escaso. Sin embargo, muchos de los desarrollos actuales en este campo están centrados en realizar determinaciones absolutas, aunque el análisis de proteínas clínicamente relevantes a través de estos métodos es, de momento, demasiado costoso para una futura implantación en análisis de rutina.

Dentro de la cuantificación absoluta de proteínas podemos diferenciar tres grandes grupos, los que utilizan patrones específicos, los que no utilizan patrones específicos y aquellos que, además de no usar patrones específicos, emplean una técnica de determinación diferente a la Espectrometría de Masas. En este contexto, definimos patrón específico como aquella molécula marcada isotópicamente que es igual a las que se pretende determinar o, en su defecto, una molécula marcada que sea igual a una molécula específica y derivada de la molécula a determinar, como puede ser el caso de un péptido proteotípico empleado para determinar la proteína de la que procede inequívocamente.

4.3. Métodos de cuantificación específicos

En este apartado se van a detallar los aspectos más relevantes las tres principales estrategias de proteómica cuantitativa absoluta que emplea patrones específicos marcados isotópicamente, PSAQ, AQUA y QconCAT. Sin embargo, existen otras estrategias como TAQSI⁹¹, FlexiQuant⁹² o “Absolute SILAC”⁹³, cuyos fundamentos y aplicaciones no van a ser comentados.

En el método PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification) se emplea una proteína marcada que se añade al principio del proceso analítico y es digerida en péptidos para llevar a cabo su determinación⁹⁴⁻¹⁰⁴. Teóricamente, este método de cuantificación es el que más exactitud puede proporcionar, ya que al añadirse el trazador al inicio del proceso analítico, se corrigen posibles pérdidas de analito durante el proceso de preparación de muestra como

por ejemplo durante la hidrólisis de la proteína. Así mismo, esta estrategia tiene el potencial de cubrir un rango de secuencias peptídicas muy elevado, incluyendo la determinación de péptidos que contengan cisteína o aquellos que no se digieran completamente^{105,106}. Por este motivo, esta estrategia también tiene una mayor aplicabilidad, al menos en cuanto a la posibilidad de seleccionar cualquier péptido proveniente de la hidrólisis para llevar a cabo la determinación. No obstante, el método PSAQ presenta diversas limitaciones. En primer lugar, la síntesis de proteínas marcadas es muy compleja llevándose a cabo a través de vectores de expresión génica y microorganismos^{100,107}, seguido de laboriosos procesos de purificación, por lo que el precio de las proteínas marcadas isotópicamente obtenidas es muy elevado. En segundo lugar, las proteínas marcadas isotópicamente que se sintetizan pueden presentar estructuras terciarias (y cuaternarias) diferentes a su análogo natural lo que puede conducir a errores derivados de una diferente interacción de las proteínas con la matriz, diferentes recuperaciones o diferentes degradaciones¹⁰⁸. Además, son compuestos de escasa estabilidad. Todo ello hace que la comercialización de proteínas marcadas isotópicamente sea aún un campo en desarrollo con una baja disponibilidad de estos productos.

El método AQUA (Absolute Quantification) hace uso de péptidos proteotípicos marcados isotópicamente que se añaden al principio del procedimiento analítico para determinar péptidos o proteínas de las que son específicos¹⁰⁹⁻¹¹⁹. Este método ha sido más empleado que el método PSAQ, al usar como trazador una molécula menos compleja y más fácil de sintetizar o adquirir comercialmente. La principal desventaja de este método es que su aplicabilidad es más limitada, pues no es capaz de corregir errores derivados de digestiones incompletas ni aplicarse en caso de rupturas peptídicas fallidas (Missed Cleavage Sites)¹²⁰ o a péptidos que contengan cisteína. Por otro lado, este método sí puede emplearse para cuantificar PTMs^{3,121}.

Una aplicación de AQUA desarrollada en nuestro grupo de investigación emplea péptidos minimamente marcados cuyo espectro de masa solapa con su análogo natural (Mass Overlapping peptides, MOPs) y LC-MS/MS para llevar a cabo las determinaciones¹²²⁻¹²⁴. En este caso, el marcaje se realiza con 1-5 átomos de ¹³C o ¹⁵N y, al tratarse de moléculas solapadas espectralmente, para su determinación se requiere el empleo de IPD. Esto permite realizar cuantificaciones absolutas sin recurrir a un calibrado metodológico y, dado que el

trazador es muy similar al analito, corregir los posibles efectos isotópicos durante la preparación de la muestra y los efectos de matriz en la cuantificación.

Por último, la técnica QconCAT emplea genes desarrollados artificialmente para generar proteínas formadas por los péptidos trópticos de interés que se van a utilizar para la cuantificación¹²⁵⁻¹²⁸. Estos genes se insertan en *E. coli* realizando un cultivo de la bacteria en un medio que contiene aminoácidos marcados con isótopos estables enriquecidos, generalmente lisina y/o arginina marcados en ¹³C o ¹⁵N. Por último, se lleva a cabo una extracción y purificación de las proteínas marcadas y se mezclan con la muestra para llevar a cabo una digestión enzimática, a través de la cual se cuantifican todos los péptidos trópticos de proteínas cuyo análogo marcado estaba concatamerizado en la proteína artificial¹²⁹. La principal ventaja de esta estrategia es la síntesis (potencialmente rápida, efectiva y económicamente asequible) y cuantificación simultánea de múltiples proteínas. Esta técnica tiene, potencialmente, más aplicabilidad que otras estrategias respecto a la síntesis de péptidos marcados al estar estos diseñados *in silico* e incluidos en un gen, de tal forma que se pueden obtener péptidos muy complejos (al menos en tamaño) más eficientemente que a través de otros métodos de síntesis. Sin embargo, para la aplicación de esta técnica se requiere una equimolaridad 1:1 de los péptidos en la mezcla, de forma que se pueda asegurar una cuantificación exacta, y esto solo es posible a través de una optimización de las condiciones de digestión de las proteínas QconCAT¹³⁰. Así mismo, pueden darse fallos de expresión y que los péptidos diseñados no se transcriban correctamente, lo cual puede ser especialmente problemático si se trata de errores en los puntos de rotura enzimática^{131,132}. Por último, a pesar de sus ventajas, para su aplicación se requieren conocimientos y herramientas biotecnológicas y, hay que tener en cuenta, que el cultivo de microorganismo no es tan robusto como una síntesis química. Todo ello hace que, en general, su uso haya sido más reducido que el de los otros métodos aquí descritos.

4.4. Métodos de cuantificación no específicos

Los métodos no específicos se pueden dividir en aquellos que no emplean isótopos estables enriquecidos o métodos “label free” y aquellos que emplean isótopos estables enriquecidos.

Al primer grupo pertenecen los métodos APEX¹³³, emPAI¹³⁴ e iBAQ¹³⁵ y a los segundos las estrategias que emplean marcas isobáricas y análisis elementales.

Los métodos *label free* hacen uso de expresiones matemáticas y herramientas computacionales para obtener la abundancia de proteínas basándose en las relaciones de intensidades de las proteínas entre sí y con otros experimentos, empleando calibrados con patrones internos como referencia para las cuantificaciones^{136,137}. Estos métodos son simples y económicos en cuanto a preparación de la muestra y pueden aplicarse, potencialmente, a cualquier tipo de muestra y compuesto a determinar. Sin embargo, las cuantificaciones a través de este método presentan una exactitud comprometida y son poco robustos.

Por otro lado, los métodos iTRAQ y el empleo de reactivos con marcas isobáricas (TMTs)¹³⁸ o reactivos derivados de aminoácidos como el DiLeu¹³⁹ o DiAla¹⁴⁰ surgen de la idea de realizar cuantificaciones absolutas sin la necesidad de emplear un péptido o proteína marcada isotópicamente, o en casos en los que estos no están disponibles comercialmente. Estas metodologías se basan en el empleo de “marcas isobáricas” que se introducen en los péptidos de interés a través de una reacción química. En ambos casos, las *marcas isobáricas* tienen un grupo que reacciona con los péptidos, un grupo denominado “reporter” que presenta una masa específica y que se emplea para identificar a un péptido concreto y un grupo de balance de masa que se emplea para ajustar la masa de cada péptido marcado de tal forma que todos los péptidos marcados isobáricamente tengan la misma masa. Así, se consigue que los péptidos presenten propiedades fisicoquímicas idénticas y que coeluyan cromatográficamente. Por último, tras una ruptura en la celda de colisión del espectrómetro, los diferentes *reporters* son liberados y son inequívocamente asignados a cada péptido para su cuantificación, la cual se produce por comparación de señales/intensidades. La gran ventaja de esta estrategia es su capacidad para determinar uno o más péptidos en múltiples muestras, destacando la reciente aplicación de esta estrategia para determinar 18 muestras diferentes simultáneamente¹⁴¹.

Por último, el análisis elemental a través de LC acoplado a ICP-MS ha sido empleado ampliamente en proteómica cuantitativa, a pesar de que los principales elementos constituyentes de las proteínas (C, H, O y N) no son susceptibles de ser medidos con esta técnica^{142,143}. Las estrategias de cuantificación se basan en medir heteroátomos que se

encuentren de forma natural en las proteínas, como el selenio, el azufre o el fósforo¹⁴⁴, o elementos que son añadidos a través de marcaje químico¹⁴⁵ o con técnicas de bioconjugación¹⁴⁶. Estos procedimientos se han empleado, por ejemplo, para determinar proteínas portadoras de hierro, como la transferrina, la apoferritina o la hemoglobina¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. La principal limitación de estas metodologías es que no son capaces de proporcionar información estructural y, por lo tanto, la identificación de las especies moleculares que generan las señales detectadas sólo se puede inferir de los tiempos de retención cromatográficos. Es por ello que la mayoría de las aplicaciones de cuantificación sean inespecíficas empleando patrones genéricos del elemento a monitorizar añadido después de la separación cromatográfica (Dilución Isotópica en línea), si bien es también posible llevar a cabo determinaciones específicas empleando para ello proteínas sintéticas marcadas en heteroátomos¹⁵⁰.

5. METABOLÓMICA

La metabolómica es el campo de estudio científico dedicado a estudiar el metaboloma, esto es, el conjunto de moléculas de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en un sistema biológico. Entre esas moléculas se encuentran los substratos, los productos metabólicos y los productos intermediarios. La metabolómica también encuentra aplicación en el estudio de sistemas ecológicos y en otras áreas, como son la industria alimentaria o la industria farmacéutica¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Los diferentes campos que aborda y los diferentes enfoques en las investigaciones hacen que exista un elevado número de estrategias y de técnicas analíticas empleadas para llevar a cabo estudios en metabolómica, aunque la mayoría de los estudios se llevan a cabo empleando la Espectrometría de Masas. De hecho, al igual que en proteómica, esta ciencia no se habría desarrollado hasta tal punto de no ser por la Espectrometría de Masas, los diferentes acoplamientos instrumentales y el empleo de otras herramientas como son los isótopos estables enriquecidos.

5.1. Metabolómica no dirigida

Como se ha comentado previamente, los estudios no dirigidos son aquellos en los que no se buscan analitos concretos y donde, por lo general, no se realizan cuantificaciones absolutas.

Concretamente, en el campo de la metabolómica, los ensayos no dirigidos suelen llevarse a cabo mediante diferentes plataformas analíticas, ya que la información que puede proporcionar una única plataforma o técnica analítica es limitada, por las propias características de la técnica o de los metabolitos. Por lo tanto, es frecuente encontrar investigaciones que emplean una o más técnicas de separación como la cromatografía de gases, de líquidos o la electroforesis capilar. Por otro lado, independientemente de las configuraciones instrumentales, los estudios en metabolómica no dirigida presentan un aspecto común y único: el elevado volumen de datos obtenidos y su, generalmente, complejo tratamiento.

El tratamiento de datos en metabolómica no dirigida suele constar de un primer preprocesado de los datos, un pretratamiento y el tratamiento final de los datos, que por lo general suele ser un estudio estadístico de los mismos. Las etapas que presentan mayor dificultad son las dos primeras y ahí es donde se están llevando a cabo actualmente la mayoría de los avances en metabolómica no dirigida. En el preprocesado de datos se lleva a cabo la identificación de rasgos característicos o *features* (valores de m/z que se asignan a un único compuesto), el filtrado de datos (eliminar aquellos picos o m/z que no sean robustos y que puedan pertenecer al blanco o al ruido instrumental), la correlación de picos entre diferentes muestras, la corrección o alineación en los tiempos de retención y, por último, el llenado de los valores vacíos o “espacios huecos” (gaps) en los datos entre muestras. A continuación, en el pretratamiento de los datos se lleva a cabo una normalización de los mismos, su escalado y una transformación para corregir la heterocedasticidad¹.

Entre los diferentes programas dedicados al tratamiento de datos en metabolómica no dirigida se encuentran MZmine¹⁵⁵, MetaboAnalyst¹⁵⁶ y SIMCA. Aquí es interesante resaltar que, más allá del tratamiento estadístico, estos programas también suelen llevar a cabo una identificación (anotación) de los picos, ya sea durante el tratamiento de datos o al final, cuando se han obtenido características metabólicas estadísticamente relevantes. Por otro lado, además de programas dedicados, actualmente se encuentra en auge el empleo de lenguajes de programación, principalmente R y Python, para el tratamiento de datos de metabolómica no dirigida.

¹ En estadística se dice que un modelo de regresión lineal presenta heterocedasticidad cuando la varianza de los errores no es constante en todas las observaciones realizadas.

5.1.1. Tratamiento de datos con comandos

Se suele decir que en metabolómica el tratamiento de datos, su procesado y su limpieza ocupa un 80% del tiempo de una investigación: desde el diseño experimental y la preparación de muestra hasta la obtención de conclusiones a partir de los resultados. Si bien esta afirmación puede ser excesiva, es cierto que ello va a depender de las herramientas y de los conocimientos de los que se dispongan.

Para el tratamiento de datos hay en general dos opciones: el software “click” (e.g., Excel) y el software funcionalizado (e.g., RStudio). En el primer caso se emplea principalmente un ratón que selecciona elementos de una interfaz gráfica de usuario (GUI) y sobre los que se escriben fórmulas, mientras que en el último se opera sobre la GUI, principalmente, a través de un código de programación continuo (comandos). El software de comandos emplea lenguajes de programación y presenta una serie de particularidades que lo hacen ser la herramienta de preferencia en el análisis de macrodatos (*big data*):

- 1) Son de acceso libre.
- 2) Presentan la mayoría de los últimos avances en métodos estadísticos.
- 3) Están apoyados por una red internacional de usuarios que desarrollan constantemente mejoras y nuevas funcionalidades.
- 4) Permiten una mayor libertad en funcionalidades para tratar los datos.
- 5) Permiten al usuario definir funciones y procedimientos (desarrollo) a través de un código que queda escrito y puede ser revisado al detalle.
- 6) El tratamiento de datos es más reproducible y los errores en el cálculo pueden ser corregidos revisando el código (script), al contrario de lo que sucede en las hojas de cálculo, donde no hay un texto que describe cada paso y resulta más difícil seguir y reproducir las operaciones realizadas.
- 7) Permite trabajar con grandes volúmenes de datos sin perder eficacia, lo que se traduce en rapidez.

La gran desventaja del software de comandos es que requiere mucho más tiempo de aprendizaje que las herramientas guiadas por interfaz gráfica.

De entre las diferentes opciones de lenguajes (Phyton, Java, Julia, R, etc.), R y Phyton se presentan como las dos opciones más frecuentes en el tratamiento de datos de metabolómica.

Aquí es importante resaltar que, debido a su construcción, Python está más orientado a objetos y es más adecuado para desarrolladores, el aprendizaje automatizado de máquinas y el desarrollo a gran escala de webs. En metabolómica, Python es la primera opción si lo que se desea es obtener una red molecular (paquete *networkx*) y operar y obtener información de ella. Sin embargo, para el tratamiento de datos rectangulares o tubulares, R se presenta como la primera opción, pues está más orientado a funciones. Aunque los conceptos “orientado a objetos” y “orientado a funciones” son complejos y tienen su base en la ciencia de datos, se refieren al diseño del tratamiento de los datos: un objeto es una neurona (informática), mientras que una función es una expresión matemática.

5.1.2. Paquetes en R

Un paquete es una colección de funciones predefinidas, datos y código R que se almacenan en una carpeta conforme a una estructura bien definida y de fácil accesibilidad. Las funcionalidades básicas de R se encuentran inicialmente en un entorno sin paquetes conocido como R-Base. A pesar de que este entorno cuenta con la función “data.frame” para trabajar con datos masivos, el procesamiento de datos no es muy eficiente, por lo que se suele emplear el paquete “data.table”. Así mismo, el entorno de paquetes “tidyverse” presenta paquetes adicionales para un tratamiento de datos avanzado y eficaz, esto último debido a que han sido desarrollados por el mismo equipo y los paquetes trabajan en armonía entre sí. A continuación, se describen brevemente cuatro paquetes de “tidyverse” muy empleados:

- **Tibble:** Paquete complementario para el tratamiento básico de datos en tablas. Además de las funcionalidades, permite emplear una sintaxis mucho más sencilla e intuitiva.
- **Dplyr:** Herramienta avanzada para transformar tablas y operar con ellas de forma intuitiva. Presenta 7 funciones principales que sirven para seleccionar filas que cumplan una o varias condiciones, reordenar filas, cambiar los nombres de las columnas, seleccionar columnas, crear nuevas columnas a partir de las existentes, resumir valores (crear medias) y agrupar filas en función de determinadas condiciones. Dado que cada función hace una sola cosa se requiere emplear el operador pipe `%>%`, que concatena una función con otra.

- Stringr: Paquete para trabajar con cadenas de caracteres, esto es, un nombre, una frase o una fórmula molecular. Permite, entre otras cosas, detectar elementos, transformarlos y/o extraerlos, aunque probablemente es más importante por permitir trabajar con *expresiones regulares*: lenguaje conciso para describir patrones. Por ejemplo, la expresión “/!” significa: encuentra el símbolo “!”.
- Ggplot2: “Grammar of graphics”. Paquete básico y más importante para generar representaciones gráficas que operan como funciones con lenguaje propio. Presenta tres elementos básicos sobre los que se construye el gráfico: los datos, las características estéticas (posición, ejes, color, tipo de línea, etc.) y los objetos geométricos (puntos, líneas, histograma, barras, etc.). El gráfico y sus elementos de describen como funciones.

En lo que respecta a paquetes concretos para metabolómica, cabría destacar dos paquetes que resultan interesantes:

- Ggpmisc: Paquete accesorio de ggplot2 (misc=misceláneo). Amplía las funciones de ggplot2. Permite, entre otras cosas, integrar una tabla en un gráfico.
- EnviPat: Este paquete es específico para química. Opera con fórmulas moleculares, isótopos, aductos y otros parámetros y proporciona información como la masa monoisotópica o la distribución isotópica de una molécula.

5.2. Calidad en metabolómica

En 2005 se creó la Iniciativa de Estándares en Metabolómica, MSI¹⁵⁷, dedicada a generar un consenso global sobre estándares de calidad y buenas prácticas en metabolómica. Entre estas prácticas se encuentra, por ejemplo, que en los estudios de metabolómica se incluya una clara descripción del sistema biológico y de los demás componentes del estudio (metodología, finalidad, etc.). El objetivo último de esta iniciativa es que, en las investigaciones, los resultados y el contenido de estas puedan ser compartidos y reutilizados. Las guías y protocolos de medida en metabolómica son imprescindibles para una armonización e intercomparación de los resultados obtenidos. Sin embargo, la trazabilidad y la calidad de las medidas solo puede ser asegurada a través de ejercicios de intercomparación o del análisis

de materiales de referencia (RMs). En 2018 se estableció el Consorcio para la Garantía y el Control de Calidad en metabolómica (mQACC)¹⁵⁸. Esta iniciativa va en la misma línea que la MSI: ofrecer una plataforma de estudio, comparación y evaluación de estrategias, procedimientos normalizados de trabajo (SOPs) y materiales de referencia. La guía ISO 9000:2015 define la garantía de calidad como las actividades que un laboratorio lleva a cabo para cumplir los requisitos de calidad. Además, define el control de calidad como las medidas concretas que un laboratorio toma para cumplir los requisitos de calidad¹⁵⁹. Los RMs en metabolómica permiten, además de mejorar las identificaciones, obtener cuantificaciones de mayor confianza y aumentar la reproducibilidad de los resultados y, por ende, su comparación entre laboratorios y entre otras técnicas analíticas, lo cual es esencial para el desarrollo de la metabolómica y de la ciencia¹⁶⁰. De hecho, recientemente se han publicado dos estudios donde, para una muestra analizada por 148 laboratorios, se confirmó que menos del 50% de los laboratorios de metabolómica usaban RMs en sus procedimientos o se atenían a SOPs y otras prácticas de QA^{161,162}.

En lo que respecta a la identidad y naturaleza de los RMs para metabolómica, en la bibliografía se pueden encontrar mezclas sintéticas, mezclas certificadas y mezclas de muestras agrupadas (*pooled samples*), tanto comerciales como caseras y de “corto” o “largo” plazo (materiales estables de los que se dispone de mucha cantidad)¹⁶³. Por otro lado, dentro de las diferentes opciones son de especial interés las muestras con matriz. De hecho, el primer material de referencia desarrollado por el NIST para metabolómica consiste en una matriz de plasma humano (NIST SRM 1950)¹⁶⁴ y, a pesar de que no está destinado a garantizar la calidad de las medidas en metabolómica no dirigida¹⁶⁵, esta mezcla ha sido empleada con frecuencia por laboratorios como material de control de calidad, ya que es estable, proviene de un centro de metrología y presenta una matriz biológica¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Adicionalmente, en el mercado se encuentran algunas otras mezclas de metabolitos con matriz biológica para estudios en metabolómica¹⁶⁸ y el NIST está desarrollando nuevas mezclas dada la elevada demanda estando algunas de ellas ya caracterizadas por laboratorios de investigación: RM 8231¹⁶⁹ (plasma), RM 8232 (orina) y RM 8462 (tejido).

Debido al elevado precio de los RMs, recientemente se ha descrito una metodología para generar RMs biológicos caseros de largo plazo basada en el alicuotado iterativo de pequeños lotes de material de partida, los cuales se mezclan con sucesivos lotes recurrentemente de tal

forma que constantemente se generan nuevos RMs de muestras agrupadas análogas¹⁷⁰. Un procedimiento similar ha sido empleado para generar el primer material de referencia biológico diseñado para metabolómica¹⁷¹. Actualmente solo Cambridge Isotope Laboratories (CIL) comercializa mezclas de metabolitos marcados isotópicamente para metabolómica-QC/QA (QReSS kits, 18 metabolitos).

El futuro de la metabolómica se encuentra en aportar calidad a los estudios no dirigidos^{58,172}. Para ello, el material de referencia empleado debe: 1) proceder idealmente de la misma matriz biológica que las muestras a determinar, 2) tener una complejidad similar, 3) ser producido de forma reproducible y asequible, y 4) facilitar la anotación de compuestos conocidos y desconocidos. Así mismo, los métodos no dirigidos carecen por lo general de resultados cuantitativos y trazables¹⁷³ y, si lo que se pretende es aumentar la cobertura y la fiabilidad de los resultados cuantitativos de las medidas no dirigidas, se requiere obtener mezclas de metabolitos, preferiblemente marcados isotópicamente, que sean estables y que puedan ser empleadas para llevar a cabo estandarizaciones y cuantificaciones trazables. En esta tarea el empleo de moléculas marcadas isotópicamente es especialmente adecuado, al tratarse de un patrón interno ideal. Sin embargo, en pocas ocasiones se ha empleado material marcado dada la dificultad de su caracterización en ensayos no dirigidos. En ese sentido, el grupo de investigación de la profesora Gunda Koellensperger es pionero en el desarrollo de mezclas de metabolitos marcados empleando la levadura *pichia pastoris*, así como en su aplicación en lipidómica y metabolómica^{7,26,174-188}.

6. METABOLOMICA DIRIGIDA: ENFERMEDADES METABÓLICAS CONGÉNITAS

Las enfermedades congénitas metabólicas (ECMs) son errores genéticos heredados relacionados con la deficiencia o desregulación de una enzima, de sus cofactores o de las moléculas de transporte o receptoras involucradas, y que resultan en la acumulación de un sustrato o el déficit de un producto, desembocando en el desarrollo de una enfermedad¹⁸⁹. Las ECMs pueden clasificarse de diferentes formas, siendo una de ellas la que emplea como criterio la causa de la patología: 1) acumulación de un sustrato tóxico (aminoacidopatías, acidurias orgánicas y defectos en el metabolismo de carbohidratos), 2) deficiencia de un

producto (defectos en el metabolismo de carbohidratos, trastornos mitocondriales y defectos en la oxidación de ácidos grasos), y 3) acumulación crónica de metabolitos por catabolismo defectuoso (enfermedades peroxisomales y por depósito lisosomal)¹⁹⁰.

Aunque la incidencia de ECMs es muy variable y depende de la enfermedad y de la región geográfica, el desarrollo de métodos analíticos para llevar a cabo un diagnóstico temprano y su implantación en los sistemas nacionales de salud fue de gran importancia en el siglo pasado, reduciendo el número de muertes y la morbilidad causada por las ECMs. Así, la Organización Mundial de la Salud (WHO) estableció en 1968 una serie de requisitos o consideraciones a la hora de establecer métodos de diagnóstico (cribado) de enfermedades, los cuales incluyen: 1) una evaluación de la prevalencia de la enfermedad en la población, 2) que exista un tratamiento, 3) que exista un test de determinación aceptable para la población, así como las instalaciones y el equipamiento necesario, y 4) que la relación beneficio-coste sea balanceada y que sea reevaluada continuamente¹⁹¹. Por otro lado, las EMC presentan una gran variedad de síntomas y pueden manifestarse a cualquier edad. Por ello, algunos autores diferencian entre las EMC de aparición temprana y las de aparición tardía¹⁹².

6.1. Cribado neonatal

Las ECMs de aparición temprana son monitorizadas mediante las pruebas de cribado neonatal (NBS, por sus siglas en inglés), siendo la fenilcetonuria (PKU) la primera enfermedad congénita para la que se desarrolló un método de análisis. Este método, desarrollado por Robert Guthrie en 1961 era cualitativo y consistía en la inhibición del crecimiento de un cultivo bacteriano¹⁹³. Desde entonces se han ido desarrollando métodos espectrofotométricos, fluorimétricos e inmunoensayos¹⁹⁴ y en la década de los 90 se implementaron metodologías con Espectrometría de Masas en tándem, lo que aumentó las capacidades del cribado a diversas enfermedades en una misma determinación¹⁹⁵. Aunque hay excepciones, hoy en día la mayoría de EMCs conocidas pueden determinarse por MS, con capacidad para determinar hasta unas 50 patologías¹⁹⁶. Por otro lado, cabe resaltar que el cribado neonatal, como su propio nombre indica, no es una prueba de diagnóstico definitiva y los individuos que resultan positivos en las pruebas deben someterse a diagnósticos específicos antes de recibir un tratamiento.

La Sociedad Internacional para el Cribado Neonatal (ISNS) junto a otras instituciones, como el Instituto Clínico y de Estándares de Laboratorio (CLSI), son en general los encargados de establecer pautas, proporcionar asesoramiento a nivel global, organizar encuentros entre sociedades e instituciones y desarrollar guías sobre procedimientos en el cribado neonatal¹⁹⁷. Este trabajo es fundamental para la armonización de resultados y la Garantía de Calidad en el NBS, ya que, debido a las diferencias políticas, culturales y económicas de cada país, los programas de cribado neonatal pueden llegar a ser muy diferentes. Incluso dentro de España no hay uniformidad, salvo en las siete ECMs descritas en la Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, que modifica el Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, el cual establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud. Esto se debe a que Comunidad Autónoma puede gestionar de manera independiente los servicios de salud. Por lo general, y a nivel internacional, aunque la espectrometría de masas es la técnica por excelencia en el cribado neonatal, no hay una homogenización de métodos, lo cual repercute en incoherencias en los resultados entre laboratorios y en el establecimiento de valores de referencia o bien “locales” o bien con rangos de diagnóstico muy amplios^{198,199}. En España, actualmente, más de la mitad de las Comunidades Autónomas presentan programas de cribado neonatal expandido, llegando algunas a determinar hasta un total de 40 EMCs²⁰⁰.

6.2. Tipos de muestras en el cribado neonatal

La sangre es el fluido básico de distribución de sustancias en el cuerpo, generando lo que se denomina *integración sistémica*. Por otro lado, la orina es el fluido corporal de excreción de sustancias, regulando la homeostasis. Esto, junto a la elevada cantidad de ambos líquidos en el cuerpo y a su accesibilidad, hace que sean las muestras más empleadas en el análisis clínico. El empleo de muestras de sangre o de orina depende del tipo de análisis, la instrumentación disponible, la patología y los analitos a determinar. A su vez, la propia composición de las muestras es importante, sobre todo para la preparación de la muestra. Así, la orina está compuesta mayormente por agua y sales, mientras que la sangre presenta aproximadamente un 45% de células sanguíneas y un 55% de plasma, el cual tiene un menor porcentaje de agua que la orina y más proteínas. Por otro lado, la sangre puede ser vascular o capilar, dependiendo de su obtención. Generalmente, la sangre capilar se emplea en

aquellos estudios donde no se requiere un gran volumen de muestra y es preferible emplear un método menos invasivo. Por otro lado, la toma de muestra de orina no es invasiva.

Por estas características en el cribado neonatal se suele emplear sangre impregnada en tiras de papel (DBS, por sus siglas en inglés). Además, esto permite obtener una muestra que, tras su secado, es más limpia y fácil de manipular, transportar y almacenar. Sin embargo, en los primeros estudios donde se determinó la PKU (Følling y Centerwall) se realizaron con muestras de orina^{201,202}. Concretamente, Centerwall requirió orina obtenida tras varias semanas después del nacimiento para determinar la enfermedad, lo que impedía un diagnóstico y corrección temprana de la enfermedad, esto último de vital importancia. Podría decirse que los métodos de los que disponían Følling, Centerwall y Guthrie requerían una muestra que a las pocas horas/días del parto presentaran una elevada concentración y por ello se estableció la toma de muestra y análisis sobre DBS. En España se suele tomar más de una muestra por individuo y en algunas Comunidades Autónomas también se toman muestras de orina líquida o impregnada en papel (DUS) como medida complementaria, lo cual mejora sustancialmente el NBS, ya que algunas patologías no se expresan en la sangre, como la cistinuria o la deficiencia de galactoquinasa, y para otras se obtienen valores de confirmación²⁰³. Dado que las técnicas han mejorado mucho en sensibilidad, hoy en día se puede emplear sangre u orina casi de forma indiferente.

Recientemente se han publicado varias revisiones y estudios sobre el empleo de un tipo de muestra u otro en el ámbito de la metabolómica^{204,205} y en todos ellos se concluyó que la estabilidad de DBS y de DUS es superior a la de muestras líquidas. Drolet *et al.*²⁰⁶ realizó un estudio en metabolómica y encontró una pérdida de un 12% de analitos detectados al almacenar las muestras sobre papel. Este mismo fenómeno ha sido descrito en multitud de ocasiones para muestras de sangre, donde hay más estudios^{199,207,208}. Sin embargo, Palmer *et al.*²⁰⁹ no obtuvo una pérdida de analitos en muestras de orina pareadas. Como se ha comentado previamente, el empleo de tiras de papel como recipiente de toma de muestra hace de “filtro de limpieza”, sobre todo para las muestras de sangre, por lo que no es de extrañar que en ese procedimiento se puedan perder analitos. Por todo ello, aunque en general haya una buena concordancia entre los resultados, se recomienda emplear un factor de corrección por tira de papel, que depende de los analitos, del tipo de papel de filtro, del método de extracción y de los protocolos de calibración, tomando siempre como valor más

exacto el de las muestras líquidas²¹⁰. Adicionalmente, cabe resaltar que, dada la versatilidad de las muestras recogidas en tiras de papel, cada vez más científicos encuentran interés en este tipo de muestras, empleándolas en nuevos campos como la toxicología (dopaje) y los estudios medioambientales^{211,212}.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Rodríguez-Gonzalez, P.; García-Alonso, J. I. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*; 2013.
- (2) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Isotope Dilution Analysis for Elemental Speciation: A Tutorial Review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.01.005>.
- (3) Brun, V.; Masselon, C.; Garin, J.; Dupuis, A. Isotope Dilution Strategies for Absolute Quantitative Proteomics. *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V. July 21, 2009, pp 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.03.007>.
- (4) Pickup, J. F.; McPherson, K. Theoretical Considerations in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry for Organic Analysis. *Anal Chem* **1976**, *48* (13). <https://doi.org/10.1021/ac50007a019>.
- (5) Kohen, A.; Limbach, H. H. *Isotope Effects in Chemistry and Biology*; 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420028027>.
- (6) Berglund, M.; Wieser, M. E. Isotopic Compositions of the Elements 2009 (IUPAC Technical Report). In *Pure and Applied Chemistry*; 2011; Vol. 83. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-06-02>.
- (7) Rampler, E.; Coman, C.; Hermann, G.; Sickmann, A.; Ahrends, R.; Koellensperger, G. LILY-Lipidome Isotope Labeling of Yeast:: In Vivo Synthesis of ¹³C Labeled Reference Lipids for Quantification by Mass Spectrometry. *Analyst* **2017**, *142* (11). <https://doi.org/10.1039/c7an00107j>.
- (8) Pouteau, E.; Meirim, I.; Métairon, S.; Fay, L. B. Acetate, Propionate and Butyrate in Plasma: Determination of the Concentration and Isotopic Enrichment by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Positive Chemical Ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36* (7). <https://doi.org/10.1002/jms.181>.
- (9) van Eijk, H. M. H.; Rooyakkers, D. R.; Soeters, P. B.; Deutz, N. E. P. Determination of Amino Acid Isotope Enrichment Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **1999**, *271* (1). <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4112>.
- (10) Ouerdane, L.; Meija, J.; Bakirdere, S.; Yang, L.; Mester, Z. Nonlinear Signal Response in Electrospray Mass Spectrometry: Implications for Quantitation of Arsenobetaine Using Stable Isotope Labeling by Liquid Chromatography and Electrospray Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (9). <https://doi.org/10.1021/ac203137n>.

- (11) González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J. M.; Ferrero, M.; Ignacio Garcia Alonso, J. Synthesis Of⁸¹Br-Labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Characterization Using GC(EI)MS and GC(ICP)MS. *Anal Chem* **2010**, 82 (7). <https://doi.org/10.1021/ac902889u>.
- (12) Böcker, S.; Letzel, M. C.; Lipták, Z.; Pervukhin, A. SIRIUS: Decomposing Isotope Patterns for Metabolite Identification. *Bioinformatics* **2009**, 25 (2). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn603>.
- (13) Midani, F. S.; Wynn, M. L.; Schnell, S. The Importance of Accurately Correcting for the Natural Abundance of Stable Isotopes. *Analytical Biochemistry*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.011>.
- (14) Kubinyi, H. Calculation of Isotope Distributions in Mass Spectrometry. A Trivial Solution for a Non-Trivial Problem. *Anal Chim Acta* **1991**, 247 (1). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83059-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83059-7).
- (15) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I. Determination of the Enrichment of Isotopically Labelled Molecules by Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, 49 (8). <https://doi.org/10.1002/jms.3397>.
- (16) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; García Alonso, J. I. Evaluation of Minimal ¹³C-Labeling for Stable Isotope Dilution in Organic Analysis. *Analyst* **2010**, 135 (5). <https://doi.org/10.1039/b924432h>.
- (17) Castillo, Á.; Gracia-Lor, E.; Roig-Navarro, A. F.; Sancho, J. V.; Rodríguez-González, P.; Alonso, J. I. G. Isotope Pattern Deconvolution-Tandem Mass Spectrometry for the Determination and Confirmation of Diclofenac in Wastewaters. *Anal Chim Acta* **2013**, 765. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.033>.
- (18) Fabregat-Cabello, N.; Pitarch-Motellón, J.; Sancho, J. v.; Ibáñez, M.; Roig-Navarro, A. F. Method Development and Validation for the Determination of Selected Endocrine Disrupting Compounds by Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Isotope Pattern Deconvolution in Water Samples. Comparison of Two Extraction Techniques. *Analytical Methods* **2016**, 8 (14). <https://doi.org/10.1039/c6ay00221h>.
- (19) Pitarch-Motellón, J.; Bijlsma, L.; Sancho Llopis, J. V.; Roig-Navarro, A. F. Isotope Pattern Deconvolution as a Successful Alternative to Calibration Curve for Application in Wastewater-Based Epidemiology. *Anal Bioanal Chem* **2021**, 413 (13). <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03287-7>.

- (20) Pitarch-Motellón, J.; Roig-Navarro, A. F.; Sancho, J. v.; Ibáñez, M.; Fabregat-Cabello, N.; Pozo, O. J.; Ventura, R.; García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P.; González Gago, A.; Ereño Artabe, A.; van Eenoo, P.; Deventer, K.; Dehnes, Y.; Rzeppa, S. Evaluation of Uncertainty Sources in the Determination of Testosterone in Urine by Calibration-Based and Isotope Dilution Quantification Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2017**, *1508*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.072>.
- (21) Fabregat-Cabello, N.; Zomer, P.; Sancho, J. v.; Roig-Navarro, A. F.; Mol, H. G. J. Comparison of Approaches to Deal with Matrix Effects in LC-MS/MS Based Determinations of Mycotoxins in Food and Feed. *World Mycotoxin J* **2016**, *9* (2). <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1872>.
- (22) Fabregat-Cabello, N.; Sancho, J. v.; Vidal, A.; González, F. v.; Roig-Navarro, A. F. Development and Validation of a Liquid Chromatography Isotope Dilution Mass Spectrometry Method for the Reliable Quantification of Alkylphenols in Environmental Water Samples by Isotope Pattern Deconvolution. *J Chromatogr A* **2014**, *1328*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.077>.
- (23) Fabregat-Cabello, N.; Castillo, Á.; Sancho, J. v.; González, F. v.; Roig-Navarro, A. F. Fast Methodology for the Reliable Determination of Nonylphenol in Water Samples by Minimal Labeling Isotope Dilution Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2013**, *1301*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.033>.
- (24) Pitarch-Motellón, J.; Sancho, J. v.; Ibáñez, M.; Pozo, O.; Roig-Navarro, A. F. Determination of Selected Endogenous Anabolic Androgenic Steroids and Ratios in Urine by Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Isotope Pattern Deconvolution. *J Chromatogr A* **2017**, *1515*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.006>.
- (25) Pitarch-Motellón, J.; Fabregat-Cabello, N.; le Goff, C.; Roig-Navarro, A. F.; Sancho-Llopis, J. v.; Cavalier, E. Comparison of Isotope Pattern Deconvolution and Calibration Curve Quantification Methods for the Determination of Estrone and 17 β -Estradiol in Human Serum. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, *171*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.013>.
- (26) Schwaiger-Haber, M.; Hermann, G.; el Abiead, Y.; Rampler, E.; Wernisch, S.; Sas, K.; Pennathur, S.; Koellensperger, G. Proposing a Validation Scheme for ¹³C Metabolite Tracer Studies in High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (14). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01773-7>.
- (27) Grebe, M.; Pröfrock, D.; Kakuschke, A.; Estella Del Castillo Busto, M.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A.; Broekaert, J. A. C.; Prange, A. Comparison of Different Methods for the Absolute

Quantification of Harbour Seal Transferrin Glycoforms Using HPLC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* **2012**, 27 (3). <https://doi.org/10.1039/c2ja10287k>.

- (28) González Iglesias, H.; Fernández Sánchez, M. L.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Use of Enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in Combination with Isotope Pattern Deconvolution to Differentiate and Determine Endogenous and Supplemented Selenium in Lactating Rats. *Anal Bioanal Chem* **2007**, 389 (3). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1499-1>.
- (29) Sommer, Y. L.; Verdon, C. P.; Fresquez, M. R.; Ward, C. D.; Wood, E. B.; Pan, Y.; Caldwell, K. L.; Jones, R. L. Measurement of Mercury Species in Human Blood Using Triple Spike Isotope Dilution with SPME-GC-ICP-DRC-MS. *Anal Bioanal Chem* **2014**, 406 (20). <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7907-4>.
- (30) Beach, D. G.; Kerrin, E. S.; Giddings, S. D.; Quilliam, M. A.; McCarron, P. Differential Mobility-Mass Spectrometry Double Spike Isotope Dilution Study of Release of β -Methylaminoalanine and Proteinogenic Amino Acids during Biological Sample Hydrolysis. *Sci Rep* **2018**, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18392-w>.
- (31) Pagliano, E.; Meija, J.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Dulivo, A. Negative Chemical Ionization GC/MS Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater Using Exact Matching Double Spike Isotope Dilution and Derivatization with Triethyloxonium Tetrafluoroborate. *Anal Chem* **2012**, 84 (5). <https://doi.org/10.1021/ac2030128>.
- (32) Fernández-Fernández, M.; Rodríguez-González, P.; Añón Álvarez, M. E.; Rodríguez, F.; Álvarez Menéndez, F. v.; García Alonso, J. I. Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Anal Chem* **2015**, 87 (7). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00769>.
- (33) Patacq, C.; Chaudet, N.; Létisse, F. Absolute Quantification of PpGpp and PppGpp by Double-Spike Isotope Dilution Ion Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2018**, 90 (18). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00829>.
- (34) Queipo Abad, S.; Rodríguez-González, P.; Davis, W. C.; García Alonso, J. I. Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2017**, 89 (12). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00966>.

- (35) Fraser, I.; Meier-Augenstein, W.; Kalin, R. M. The Role of Stable Isotopes in Human Identification: A Longitudinal Study into the Variability of Isotopic Signals in Human Hair and Nails. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20* (7). <https://doi.org/10.1002/rcm.2424>.
- (36) Font, L.; van der Peijl, G.; van Wetten, I.; Vroon, P.; van der Wagt, B.; Davies, G. Strontium and Lead Isotope Ratios in Human Hair: Investigating a Potential Tool for Determining Recent Human Geographical Movements. *J Anal At Spectrom* **2012**, *27* (5). <https://doi.org/10.1039/c2ja10361c>.
- (37) Thompson, D. R.; Bury, S. J.; Hobson, K. A.; Wassenaar, L. I.; Shannon, J. P. Stable Isotopes in Ecological Studies. In *Oecologia*; 2005; Vol. 144. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0171-8>.
- (38) Davies, P. S. W. Stable Isotopes: Their Use and Safety in Human Nutrition Studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0580-0>.
- (39) *Mass Spectrometry and Stable Isotopes in Nutritional and Pediatric Research*; 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119341185>.
- (40) Ding, J.; Ji, J.; Rabow, Z.; Shen, T.; Folz, J.; Brydges, C. R.; Fan, S.; Lu, X.; Mehta, S.; Showalter, M. R.; Zhang, Y.; Araiza, R.; Bower, L. R.; Lloyd, K. C. K.; Fiehn, O. A Metabolome Atlas of the Aging Mouse Brain. *Nat Commun* **2021**, *12* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26310-y>.
- (41) Lopes, M.; Brejchova, K.; Riecan, M.; Novakova, M.; Rossmeisl, M.; Cajka, T.; Kuda, O. Metabolomics Atlas of Oral ¹³C-Glucose Tolerance Test in Mice. *Cell Rep* **2021**, *37* (2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109833>.
- (42) Lee, D. K.; Na, E.; Park, S.; Park, J. H.; Lim, J.; Kwon, S. W. In Vitro Tracking of Intracellular Metabolism-Derived Cancer Volatiles via Isotope Labeling. *ACS Cent Sci* **2018**, *4* (8). <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00296>.
- (43) Gisbert, J. P.; Pajares, J. M. Review Article: ¹³C-Urea Breath Test in the Diagnosis of Helicobacter Pylori Infection - A Critical Review. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02203.x>.
- (44) Bodamer, O. A. F.; Halliday, D. Uses of Stable Isotopes in Clinical Diagnosis and Research in the Paediatric Population. *Arch Dis Child* **2001**, *84* (5). <https://doi.org/10.1136/adc.84.5.444>.
- (45) Tea, I.; de Luca, A.; Schiphorst, A. M.; Grand, M.; Barillé-Nion, S.; Mirallié, E.; Drui, D.; Krempf, M.; Hankard, R.; Tcherkez, G. Stable Isotope Abundance and Fractionation in Human Diseases. *Metabolites*. 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11060370>.

- (46) Keller, J.; Hammer, H. F.; Afolabi, P. R.; Benninga, M.; Borrelli, O.; Dominguez-Munoz, E.; Dumitrascu, D.; Goetze, O.; Haas, S. L.; Hauser, B.; Pohl, D.; Salvatore, S.; Sonyi, M.; Thapar, N.; Verbeke, K.; Fox, M. R. European Guideline on Indications, Performance and Clinical Impact of ¹³C-Breath Tests in Adult and Pediatric Patients: An EAGEN, ESNM, and ESPGHAN Consensus, Supported by EPC. *United European Gastroenterology Journal*. 2021. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12099>.
- (47) Dunn, W. B.; Broadhurst, D. I.; Atherton, H. J.; Goodacre, R.; Griffin, J. L. Systems Level Studies of Mammalian Metabolomes: The Roles of Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (1). <https://doi.org/10.1039/b906712b>.
- (48) Schoenheimer, R.; Rittenberg, D. Deuterium as an Indicator in the Study of Intermediary Metabolism. *Science (1979)* **1935**, *82* (2120). <https://doi.org/10.1126/science.82.2120.156>.
- (49) Klein, S.; Heinzle, E. Isotope Labeling Experiments in Metabolomics and Fluxomics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2012**, *4* (3). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1167>.
- (50) Lee, W. D.; Mukha, D.; Aizenshtein, E.; Shlomi, T. Spatial-Fluxomics Provides a Subcellular-Compartmentalized View of Reductive Glutamine Metabolism in Cancer Cells. *Nat Commun* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09352-1>.
- (51) Chen, W. W.; Freinkman, E.; Wang, T.; Birsoy, K.; Sabatini, D. M. Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism. *Cell* **2016**, *166* (5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.040>.
- (52) Cordova, L. T.; Cipolla, R. M.; Swarup, A.; Long, C. P.; Antoniewicz, M. R. ¹³C Metabolic Flux Analysis of Three Divergent Extremely Thermophilic Bacteria: *Geobacillus* Sp. LC300, *Thermus Thermophilus* HB8, and *Rhodothermus Marinus* DSM 4252. *Metab Eng* **2017**, *44*. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.10.007>.
- (53) Kreuzer-Martin, H. W.; Ehleringer, J. R.; Hegg, E. L. Oxygen Isotopes Indicate Most Intracellular Water in Log-Phase *Escherichia Coli* Is Derived from Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (48). <https://doi.org/10.1073/pnas.0506531102>.
- (54) Liu, L.; Shah, S.; Fan, J.; Park, J. O.; Wellen, K. E.; Rabinowitz, J. D. Malic Enzyme Tracers Reveal Hypoxia-Induced Switch in Adipocyte NADPH Pathway Usage. *Nat Chem Biol* **2016**, *12* (5). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2047>.

- (55) Nilsson, R.; Jain, M. Simultaneous Tracing of Carbon and Nitrogen Isotopes in Human Cells. *Mol Biosyst* **2016**, *12* (6). <https://doi.org/10.1039/c6mb00009f>.
- (56) Xu, J.; Martien, J.; Gilbertson, C.; Ma, J.; Amador-Noguez, D.; Park, J. O. Metabolic Flux Analysis and Fluxomics-Driven Determination of Reaction Free Energy Using Multiple Isotopes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.018>.
- (57) Hegeman, A. D.; Schulte, C. F.; Cui, Q.; Lewis, I. A.; Huttlin, E. L.; Eghbalnia, H.; Harms, A. C.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Sussman, M. R. Stable Isotope Assisted Assignment of Elemental Compositions for Metabolomics. *Anal Chem* **2007**, *79* (18). <https://doi.org/10.1021/ac070346t>.
- (58) Rampler, E.; Abiead, Y. el; Schoeny, H.; Ruzs, M.; Hildebrand, F.; Fitz, V.; Koellensperger, G. Recurrent Topics in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics - Standardization, Coverage, and Throughput. *Analytical Chemistry*. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04698>.
- (59) Leblanc, K. L.; Le, P. M.; Meija, J.; Ding, J.; Melanson, J. E.; Mester, Z. Preparation and Certification of Natural and ⁸²Se-Labelled Selenomethionine Reference Materials. *J Anal At Spectrom* **2021**, *36* (2), 416–428. <https://doi.org/10.1039/d0ja00411a>.
- (60) Madhavan, A.; Arun, K. B.; Sindhu, R.; Krishnamoorthy, J.; Reshmy, R.; Sirohi, R.; Pugazhendi, A.; Awasthi, M. K.; Szakacs, G.; Binod, P. Customized Yeast Cell Factories for Biopharmaceuticals: From Cell Engineering to Process Scale Up. *Microbial Cell Factories*. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>.
- (61) Ji, X. J.; Ledesma-Amaro, R. Microbial Lipid Biotechnology to Produce Polyunsaturated Fatty Acids. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd August 1, 2020, pp 832–834. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.003>.
- (62) Lam, M. K.; Lee, K. T. Microalgae Biofuels: A Critical Review of Issues, Problems and the Way Forward. *Biotechnology Advances*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>.
- (63) Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1* (5). <https://doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200>.
- (64) Fernandez, E.; Galvan, A. Inorganic Nitrogen Assimilation in Chlamydomonas. In *Journal of Experimental Botany*; 2007; Vol. 58. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm106>.

- (65) Caut, S.; Angulo, E.; Courchamp, F. Variation in Discrimination Factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): The Effect of Diet Isotopic Values and Applications for Diet Reconstruction. *Journal of Applied Ecology* **2009**, *46* (2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01620.x>.
- (66) Skaar, E. P.; Humayun, M.; Bae, T.; DeBord, K. L.; Schneewind, O. Iron-Source Preference of *Staphylococcus Aureus* Infections. *Science* (1979) **204**, 305 (5690). <https://doi.org/10.1126/science.1099930>.
- (67) Fernández-García, J.; Altea-Manzano, P.; Pranzini, E.; Fendt, S. M. Stable Isotopes for Tracing Mammalian-Cell Metabolism In Vivo. *Trends in Biochemical Sciences*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.12.002>.
- (68) Giner Martínez-Sierra, J.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Biosynthesis of Sulfur-34 Labelled Yeast and Its Characterisation by Multicollector-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* **2007**, *22* (9). <https://doi.org/10.1039/b706217f>.
- (69) Reyes, L. H.; Sanz, F. M.; Espílez, P. H.; Marchante-Gayón, J. M.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Meder, A. Biosynthesis of Isotopically Enriched Selenomethionine: Application to Its Accurate Determination in Selenium-Enriched Yeast by Isotope Dilution Analysis-HPLC-ICP-MS. In *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*; 2004; Vol. 19. <https://doi.org/10.1039/b403662j>.
- (70) Hinojosa Reyes, L.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Application of Isotope Dilution Analysis for the Evaluation of Extraction Conditions in the Determination of Total Selenium and Selenomethionine in Yeast-Based Nutritional Supplements. *J Agric Food Chem* **2006**, *54* (5). <https://doi.org/10.1021/jf0523768>.
- (71) Galilea San Blas, O.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Prieto García, B.; Álvarez Menéndez, F. v.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Determination of Free Methionine in Human Blood Plasma by Species-Specific Isotope Dilution HPLC-ICP-MS Using ^{34}S -Labelled Methionine. *J Anal At Spectrom* **2016**, *31* (9). <https://doi.org/10.1039/c6ja00125d>.
- (72) Giner Martínez-Sierra, J.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Santamaria-Fernandez, R.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Evaluation of Different Analytical Strategies for the Quantification of Sulfur-Containing Biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the Characterisation of ^{34}S -Labelled Yeast. *J Anal At Spectrom* **2010**, *25* (7). <https://doi.org/10.1039/b925366a>.
- (73) Galilea San Blas, O.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Sainz Menéndez, R. M.; Mayo Barallo, J. C.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Evaluation of Sulfur Isotopic Enrichment of Urine

Metabolites for the Differentiation of Healthy and Prostate Cancer Mice after the Administration of ³⁴S Labelled Yeast. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2017**, *39*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.09.006>.

- (74) San Blas, O. G.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Evaluation of Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (MC-ICP-MS) for Sulfur Metabolic Studies Using ³⁴S-Labelled Yeast. *J Anal At Spectrom* **2015**, *30* (8). <https://doi.org/10.1039/c4ja00383g>.
- (75) Martínez-Sierra, J. G.; Sanz, F. M.; Espílez, P. H.; Gayón, J. M. M.; Fernández, J. R.; Alonso, J. I. G. Sulphur Tracer Experiments in Laboratory Animals Using ³⁴S- Labelled Yeast. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (9). <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6420-x>.
- (76) Nicolás Carcelén, J.; Marchante-Gayón, J. M.; González, P. R.; Valledor, L.; Cañal, M. J.; Alonso, J. I. G. A Cost-Effective Approach to Produce ¹⁵N-Labelled Amino Acids Employing *Chlamydomonas Reinhardtii* CC503. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0759-9>.
- (77) Rodas Sánchez, L. C. Estudios Metabólicos En Orina de Ratones Con Cáncer de Próstata Empleando Espectrometría de Masas Multiplataforma y Glucosa Marcada Isotópicamente, Universidad de Oviedo, 2021.
- (78) Fernández-Fernández, M.; Rodríguez-González, P.; Hevia Sánchez, D.; González-Menéndez, P.; Sainz Menéndez, R. M.; García Alonso, J. I. Accurate and Sensitive Determination of Molar Fractions of ¹³C-Labeled Intracellular Metabolites in Cell Cultures Grown in the Presence of Isotopically-Labeled Glucose. *Anal Chim Acta* **2017**, *969*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.019>.
- (79) Mahmood, T.; Yang, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* **2012**, *4* (9). <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- (80) Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem* **2005**, *51* (12). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>.
- (81) Fenn, J. B. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). In *Angewandte Chemie - International Edition*; 2003; Vol. 42. <https://doi.org/10.1002/anie.200300605>.
- (82) Ong, S. E.; Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics Turns Quantitative. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (5). <https://doi.org/10.1038/nchembio736>.
- (83) Moseley, M. A. Current Trends in Differential Expression Proteomics: Isotopically Coded Tags. *Trends in biotechnology*. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(01\)01793-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(01)01793-0).

- (84) Rao, K. C. S.; Palamalai, V.; Dunlevy, J. R.; Miyagi, M. Peptidyl-Lys Metalloendopeptidase-Catalyzed 18O Labeling for Comparative Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, *4* (10). <https://doi.org/10.1074/mcp.M500150-MCP200>.
- (85) Desiderio, D. M.; Kai, M. Preparation of Stable Isotope-incorporated Peptide Internal Standards for Field Desorption Mass Spectrometry Quantification of Peptides in Biologic Tissue. *Biol Mass Spectrom* **1983**, *10* (8). <https://doi.org/10.1002/bms.1200100806>.
- (86) Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. Quantitative Analysis of Complex Protein Mixtures Using Isotope-Coded Affinity Tags. *Nat Biotechnol* **1999**, *17* (10). <https://doi.org/10.1038/13690>.
- (87) Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, *3* (12). <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>.
- (88) Wiese, S.; Reidegeld, K. A.; Meyer, H. E.; Warscheid, B. Protein Labeling by ITRAQ: A New Tool for Quantitative Mass Spectrometry in Proteome Research. *Proteomics* **2007**, *7* (3). <https://doi.org/10.1002/pmic.200600422>.
- (89) Brönstrup, M. Absolute Quantification Strategies in Proteomics Based on Mass Spectrometry. *Expert Review of Proteomics*. 2004. <https://doi.org/10.1586/14789450.1.4.503>.
- (90) Bantscheff, M.; Kuster, B. Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6261-7>.
- (91) Wang, X.; Liang, Y.; Liu, L.; Shi, J.; Zhu, H. J. Targeted Absolute Quantitative Proteomics with SILAC Internal Standards and Unlabeled Full-Length Protein Calibrators (TAQSI). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, *30* (5), 553–561. <https://doi.org/10.1002/rcm.7482>.
- (92) Singh, S.; Springer, M.; Steen, J.; Kirschner, M. W.; Steen, H. FLEXIQuant: A Novel Tool for the Absolute Quantification of Proteins, and the Simultaneous Identification and Quantification of Potentially Modified Peptides. *J Proteome Res* **2009**, *8* (5), 2201–2210. <https://doi.org/10.1021/pr800654s>.

- (93) Hanke, S.; Besir, H.; Oesterhelt, D.; Mann, M. Absolute SILAC for Accurate Quantitation of Proteins in Complex Mixtures down to the Attomole Level. *J Proteome Res* **2008**, *7* (3), 1118–1130. <https://doi.org/10.1021/pr7007175>.
- (94) Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J. Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2007**, *6* (12). <https://doi.org/10.1074/mcp.M700163-MCP200>.
- (95) Keshishian, H.; Addona, T.; Burgess, M.; Kuhn, E.; Carr, S. A. Quantitative, Multiplexed Assays for Low Abundance Proteins in Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Molecular and Cellular Proteomics* **2007**, *6* (12), 2212–2229. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700354-MCP200>.
- (96) Ezan, E.; Dubois, M.; Becher, F. Bioanalysis of Recombinant Proteins and Antibodies by Mass Spectrometry. *Analyst*. 2009. <https://doi.org/10.1039/b819706g>.
- (97) Huillet, C.; Adrait, A.; Lebert, D.; Picard, G.; Trauchessec, M.; Louwagie, M.; Dupuis, A.; Hittinger, L.; Ghaleh, B.; le Corvoisier, P.; Jaquinod, M.; Garin, J.; Bruley, C.; Brun, V. Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) and Selected Reaction Monitoring. *Molecular and Cellular Proteomics* **2012**, *11* (2). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.008235>.
- (98) Wheeler, J. X.; Thelwell, C.; Rigsby, P.; Whiting, G. Quantitation of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Human Plasma by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **2022**, *638*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114413>.
- (99) Dupuis, A.; Hennekinne, J. A.; Garin, J.; Brun, V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for Improved Investigation of Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks. *Proteomics* **2008**, *8* (22). <https://doi.org/10.1002/pmic.200800326>.
- (100) Hoffmann, M. M.; Bugert, P.; Seelhorst, U.; Wellnitz, B.; Winkelmann, B. R.; Boehm, B. O.; März, W. A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for The Quantification of Urinary Albumin using a Novel ¹⁵N-Isotopically Labeled Albumin Internal Standard. *Clinical Chemistry*. March 2007, pp 539–540. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.084756>.
- (101) Adrait, A.; Lebert, D.; Trauchessec, M.; Dupuis, A.; Louwagie, M.; Masselon, C.; Jaquinod, M.; Chevalier, B.; Vandenesch, F.; Garin, J.; Bruley, C.; Brun, V. Development of a Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) Assay for the Quantification of Staphylococcus Aureus Enterotoxin A in Serum. *J Proteomics* **2012**, *75* (10). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.031>.

- (102) Gilquin, B.; Jaquinod, M.; Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Kraut, A.; Ferro, M.; Becher, F.; Brun, V. A Proteomics Assay to Detect Eight CBRN-Relevant Toxins in Food. *Proteomics* **2017**, *17* (1–2). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600357>.
- (103) Gilquin, B.; Louwagie, M.; Jaquinod, M.; Cez, A.; Picard, G.; el Kholly, L.; Surin, B.; Garin, J.; Ferro, M.; Kofman, T.; Barau, C.; Plaisier, E.; Ronco, P.; Brun, V. Multiplex and Accurate Quantification of Acute Kidney Injury Biomarker Candidates in Urine Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and Targeted Proteomics. *Talanta* **2017**, *164*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.023>.
- (104) Picard, G.; Lebert, D.; Louwagie, M.; Adrait, A.; Huillet, C.; Vandenesch, F.; Bruley, C.; Garin, J.; Jaquinod, M.; Brun, V. PSAQ™ Standards for Accurate MS-Based Quantification of Proteins: From the Concept to Biomedical Applications. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47* (10). <https://doi.org/10.1002/jms.3106>.
- (105) Pritchard, C.; Quaglia, M.; Ashcroft, A. E.; O'Connor, G. Considering the Advantages and Pitfalls of the Use of Isotopically Labeled Protein Standards for Accurate Protein Quantification. *Bioanalysis* **2011**, *3* (24), 2797–2802. <https://doi.org/10.4155/bio.11.281>.
- (106) Jaquinod, M.; Trauchessec, M.; Huillet, C.; Louwagie, M.; Lebert, D.; Picard, G.; Adrait, A.; Dupuis, A.; Garin, J.; Brun, V.; Bruley, C. Mass Spectrometry-Based Absolute Protein Quantification: PSAQ™ Strategy Makes Use of “Noncanonical” Proteotypic Peptides. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1217–1221. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100538>.
- (107) Davidson, S. M.; Jonas, O.; Keibler, M. A.; Hou, H. W.; Luengo, A.; Mayers, J. R.; Wyckoff, J.; del Rosario, A. M.; Whitman, M.; Chin, C. R.; Condon, K. J.; Lammers, A.; Kellersberger, K. A.; Stall, B. K.; Stephanopoulos, G.; Bar-Sagi, D.; Han, J.; Rabinowitz, J. D.; Cima, M. J.; Langer, R.; vander Heiden, M. G. Direct Evidence for Cancer-Cell-Autonomous Extracellular Protein Catabolism in Pancreatic Tumors. *Nat Med* **2017**, *23* (2). <https://doi.org/10.1038/nm.4256>.
- (108) Pritchard, C.; Groves, K. J.; Biesenbruch, S.; Oconnor, G.; Ashcroft, A. E.; Arsene, C.; Schulze, D.; Quaglia, M. Quantification of Human Growth Hormone in Serum with a Labeled Protein as an Internal Standard: Essential Considerations. *Anal Chem* **2014**, *86* (13). <https://doi.org/10.1021/ac501032q>.
- (109) Barr, J. R.; Maggio, V. L.; Patterson, D. G.; Cooper, G. R.; Henderson, L. O.; Turner, W. E.; Smith, S. J.; Hannon, W. H.; Needham, L. L.; Sampson, E. J. Isotope Dilution-Mass Spectrometric

- Quantification of Specific Proteins: Model Application with Apolipoprotein A-I. *Clin Chem* **1996**, *42* (10). <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.10.1676>.
- (110) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (12). <https://doi.org/10.1073/pnas.0832254100>.
- (111) Arsene, C. G.; Ohlendorf, R.; Burkitt, W.; Pritchard, C.; Henrion, A.; O'Connor, G.; Bunk, D. M.; Güttler, B. Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. *Anal Chem* **2008**, *80* (11). <https://doi.org/10.1021/ac7024738>.
- (112) Arsene, C.; Henrion, A.; Diekmann, N.; Manolopoulou, J.; Bidlingmaier, M. Quantification of Growth Hormone in Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Nature Precedings* **2009**. <https://doi.org/10.1038/npre.2009.4050.1>.
- (113) Kuzyk, M. A.; Smith, D.; Yang, J.; Cross, T. J.; Jackson, A. M.; Hardie, D. B.; Anderson, N. L.; Borchers, C. H. Multiple Reaction Monitoring-Based, Multiplexed, Absolute Quantitation of 45 Proteins in Human Plasma. *Molecular and Cellular Proteomics* **2009**, *8* (8). <https://doi.org/10.1074/mcp.M800540-MCP200>.
- (114) Arsene, C. G.; Henrion, A.; Diekmann, N.; Manolopoulou, J.; Bidlingmaier, M. Quantification of Growth Hormone in Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **2010**, *401* (2). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.005>.
- (115) Kettenbach, A. N.; Rush, J.; Gerber, S. A. Absolute Quantification of Protein and Post-Translational Modification Abundance with Stable Isotope-Labeled Synthetic Peptides. *Nat Protoc* **2011**, *6* (2). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.196>.
- (116) Sturm, R.; Sheynkman, G.; Booth, C.; Smith, L. M.; Pedersen, J. A.; Li, L. Absolute Quantification of Prion Protein (90-231) Using Stable Isotope-Labeled Chymotryptic Peptide Standards in a Lc-Mrm Aqua Workflow. *J Am Soc Mass Spectrom* **2012**, *23* (9). <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0411-1>.
- (117) Whiting, G.; Ferguson, J.; Fang, M.; Pepin, D.; Donahoe, P.; Matejtschuk, P.; Burns, C.; Wheeler, J. X. Quantification of Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone Polypeptide by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **2018**, *560*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.05.006>.
- (118) Huynh, H.-H.; Boeuf, A.; Derbez-Morin, M.; Dupuy, A.-M.; Lalere, B.; Delatour, V.; Vinh, J. Development of an Antibody-Free ID-LC MS Method for the Quantification of Procalcitonin in

Human Serum at Sub-Microgram per Liter Level Using a Peptide-Based Calibration. *Anal Bioanal Chem* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03361-0>/Published.

- (119) Pierce-Ruiz, C.; Santana, W. I.; Sutton, W. J. H.; Fischler, D. A.; Cooper, H. C.; Marc, L. R.; Barr, J. R.; Williams, T. L. Quantification of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Vaccine* **2021**, *39* (36), 5106–5115. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.07.066>.
- (120) Siepen, J. A.; Keevil, E. J.; Knight, D.; Hubbard, S. J. Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics. *J Proteome Res* **2007**, *6* (1). <https://doi.org/10.1021/pr060507u>.
- (121) Gerber, S. A.; Kettenbach, A. N.; Rush, J.; Gygi, S. P. The Absolute Quantification Strategy; 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-255-7_5.
- (122) Suárez-Fernández, A.; González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Alonso, J. I. G. Determination of Cystatin C in Human Urine by Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *177*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112889>.
- (123) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Ohlendorf, R.; Henrion, A.; Delatour, V.; García Alonso, J. I. Determination of Cystatin C in Human Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry Using Mass Overlapping Peptides. *J Proteomics* **2014**, *112*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.005>.
- (124) Fernández, A. S.; Rodríguez-González, P.; Álvarez, L.; García, M.; Iglesias, H. G.; García Alonso, J. I. Multiple Heart-Cutting Two Dimensional Liquid Chromatography and Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry for the Absolute Quantification of Proteins in Human Serum. *Anal Chim Acta* **2021**, *1184*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339022>.
- (125) Pratt, J. M.; Simpson, D. M.; Doherty, M. K.; Rivers, J.; Gaskell, S. J.; Beynon, R. J. Multiplexed Absolute Quantification for Proteomics Using Concatenated Signature Peptides Encoded by QconCAT Genes. *Nat Protoc* **2006**, *1* (2). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.129>.
- (126) Brownridge, P.; Holman, S. W.; Gaskell, S. J.; Grant, C. M.; Harman, V. M.; Hubbard, S. J.; Lanthaler, K.; Lawless, C.; O'cualain, R.; Sims, P.; Watkins, R.; Beynon, R. J. Global Absolute Quantification of a Proteome: Challenges in the Deployment of a QconCAT Strategy. *Proteomics*. 2011. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100039>.

- (127) Johnson, J.; Harman, V. M.; Franco, C.; Emmott, E.; Rockliffe, N.; Sun, Y.; Liu, L. N.; Takemori, A.; Takemori, N.; Beynon, R. J. Construction of à La Carte QconCAT Protein Standards for Multiplexed Quantification of User-Specified Target Proteins. *BMC Biol* **2021**, *19* (1). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01135-9>.
- (128) Rivers, J.; Simpson, D. M.; Robertson, D. H. L.; Gaskell, S. J.; Beynon, R. J. Absolute Multiplexed Quantitative Analysis of Protein Expression during Muscle Development Using QconCAT. *Molecular and Cellular Proteomics* **2007**, *6* (8). <https://doi.org/10.1074/mcp.M600456-MCP200>.
- (129) Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed Absolute Quantification in Proteomics Using Artificial QCAT Proteins of Concatenated Signature Peptides. *Nat Methods* **2005**, *2* (8), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth774>.
- (130) Mirzaei, H.; McBee, J. K.; Watts, J.; Aebersold, R. Comparative Evaluation of Current Peptide Production Platforms Used in Absolute Quantification in Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2008**, *7* (4), 813–823. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700495-MCP200>.
- (131) Keil, B. *Specificity of Proteolysis*; 1992. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-48380-6>.
- (132) Scott, K. B.; Turko, I. v.; Phinney, K. W. Quantitative Performance of Internal Standard Platforms for Absolute Protein Quantification Using Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2015**, *87* (8). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00331>.
- (133) Lu, P.; Vogel, C.; Wang, R.; Yao, X.; Marcotte, E. M. Absolute Protein Expression Profiling Estimates the Relative Contributions of Transcriptional and Translational Regulation. *Nat Biotechnol* **2007**, *25* (1). <https://doi.org/10.1038/nbt1270>.
- (134) Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially Modified Protein Abundance Index (EmPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, *4* (9). <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>.
- (135) Sánchez, B. J.; Lahtvee, P. J.; Campbell, K.; Kasvandik, S.; Yu, R.; Domenzain, I.; Zelezniak, A.; Nielsen, J. Benchmarking Accuracy and Precision of Intensity-Based Absolute Quantification of Protein Abundances in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proteomics* **2021**, *21* (6). <https://doi.org/10.1002/pmic.202000093>.

- (136) Megger, D. A.; Bracht, T.; Meyer, H. E.; Sitek, B. Label-Free Quantification in Clinical Proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>.
- (137) Grossmann, J.; Roschitzki, B.; Panse, C.; Fortes, C.; Barkow-Oesterreicher, S.; Rutishauser, D.; Schlapbach, R. Implementation and Evaluation of Relative and Absolute Quantification in Shotgun Proteomics with Label-Free Methods. *J Proteomics* **2010**, *73* (9). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.011>.
- (138) Thompson, A.; Schäfer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Hamon, C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem* **2003**, *75* (8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
- (139) Frost, D. C.; Greer, T.; Li, L. High-Resolution Enabled 12-Plex DiLeu Isobaric Tags for Quantitative Proteomics. *Anal Chem* **2015**, *87* (3). <https://doi.org/10.1021/ac503276z>.
- (140) Yu, Q.; Shi, X.; Greer, T.; Lietz, C. B.; Kent, K. C.; Li, L. Evaluation and Application of Dimethylated Amino Acids as Isobaric Tags for Quantitative Proteomics of the TGF- β /Smad3 Signaling Pathway. *J Proteome Res* **2016**, *15* (9). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00641>.
- (141) Li, J.; Cai, Z.; Bomgarden, R. D.; Pike, I.; Kuhn, K.; Rogers, J. C.; Roberts, T. M.; Gygi, S. P.; Paulo, J. A. TMTpro-18plex: The Expanded and Complete Set of TMTpro Reagents for Sample Multiplexing. *J Proteome Res* **2021**, *20* (5). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00168>.
- (142) Calderón-Celis, F.; Encinar, J. R. A Reflection on the Role of ICP-MS in Proteomics: Update and Future Perspective. *J Proteomics* **2019**, *198*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.010>.
- (143) Sanz-Medel, A.; Montes-Bayón, M.; de La Campa, M. D. R. F.; Encinar, J. R.; Bettmer, J. Elemental Mass Spectrometry for Quantitative Proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1615-2>.
- (144) Fernández, S. D.; Sugishama, N.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A. Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. *Anal Chem* **2012**, *84* (14). <https://doi.org/10.1021/ac3009516>.
- (145) Ahrends, R.; Pieper, S.; Kühn, A.; Weisshoff, H.; Hamester, M.; Lindemann, T.; Scheler, C.; Lehmann, K.; Taubner, K.; Linscheid, M. W. A Metal-Coded Affinity Tag Approach to Quantitative Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2007**, *6* (11). <https://doi.org/10.1074/mcp.M700152-MCP200>.

- (146) Cid-Barrio, L.; Calderón-Celis, F.; Abásolo-Linares, P.; Fernández-Sánchez, M. L.; Costa-Fernández, J. M.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A. Advances in Absolute Protein Quantification and Quantitative Protein Mapping Using ICP-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.024>.
- (147) del Castillo Busto, M. E.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool. *Anal Chem* **2006**, 78 (24). <https://doi.org/10.1021/ac060956d>.
- (148) Pan, M.; Feng, L.; Li, H. Absolute Quantification of Haemoglobin in Whole Blood by Species-Unspecific Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities* **2020**, 41 (9). <https://doi.org/10.7503/cjcu20200321>.
- (149) Konz, T.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. Incorporation of ⁵⁷Fe-Isotopically Enriched in Apoferritin: Formation and Characterization of Isotopically Enriched Fe Nanoparticles for Metabolic Studies. *Analyst* **2014**, 139 (21). <https://doi.org/10.1039/c4an01187b>.
- (150) Hoppler, M.; Meile, L.; Walczyk, T. Biosynthesis, Isolation and Characterization of ⁵⁷Fe-Enriched Phaseolus Vulgaris Ferritin after Heterologous Expression in Escherichia Coli. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 390 (1). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1691-3>.
- (151) Wishart, D. S. Emerging Applications of Metabolomics in Drug Discovery and Precision Medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.32>.
- (152) Hamany Djande, C. Y.; Pretorius, C.; Tugizimana, F.; Piater, L. A.; Dubery, I. A. Metabolomics: A Tool for Cultivar Phenotyping and Investigation of Grain Crops. *Agronomy*. 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060831>.
- (153) Razzaq, A.; Sadia, B.; Raza, A.; Hameed, M. K.; Saleem, F. Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. *Metabolites*. 2019. <https://doi.org/10.3390/metabo9120303>.
- (154) Kim, S.; Kim, J.; Yun, E. J.; Kim, K. H. Food Metabolomics: From Farm to Human. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.004>.
- (155) Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Orešič, M. MZmine: Toolbox for Processing and Visualization of Mass Spectrometry Based Molecular Profile Data. *Bioinformatics* **2006**, 22 (5). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039>.

- (156) Xia, J.; Psychogios, N.; Young, N.; Wishart, D. S. MetaboAnalyst: A Web Server for Metabolomic Data Analysis and Interpretation. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>.
- (157) Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; van der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; Fostel, J.; Kristal, B.; Kaddurah-Daouk, R.; Mendes, P.; van Ommen, B.; Lindon, J. C.; Sansone, S. A. The Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3* (3). <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>.
- (158) Beger, R. D.; Dunn, W. B.; Bandukwala, A.; Bethan, B.; Broadhurst, D.; Clish, C. B.; Dasari, S.; Derr, L.; Evans, A.; Fischer, S.; Flynn, T.; Hartung, T.; Herrington, D.; Higashi, R.; Hsu, P. C.; Jones, C.; Kachman, M.; Karuso, H.; Kruppa, G.; Lippa, K.; Maruvada, P.; Mosley, J.; Ntai, I.; O'Donovan, C.; Playdon, M.; Raftery, D.; Shaughnessy, D.; Souza, A.; Spaeder, T.; Spalholz, B.; Tayyari, F.; Ubhi, B.; Verma, M.; Walk, T.; Wilson, I.; Witkin, K.; Bearden, D. W.; Zanetti, K. A. Towards Quality Assurance and Quality Control in Untargeted Metabolomics Studies. *Metabolomics* **2019**, *15* (1). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1460-7>.
- (159) International Standard Organization. Quality Management Systems - Fundamentals and Vocabulary (ISO 9000:2015). *English*. 2015.
- (160) Munafò, M. R.; Nosek, B. A.; Bishop, D. V. M.; Button, K. S.; Chambers, C. D.; Percie Du Sert, N.; Simonsohn, U.; Wagenmakers, E. J.; Ware, J. J.; Ioannidis, J. P. A. A Manifesto for Reproducible Science. *Nature Human Behaviour*. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41562-016-0021>.
- (161) Bowden, J. A.; Ulmer, C. Z.; Jones, C. M.; Koelmel, J. P.; Yost, R. A. NIST Lipidomics Workflow Questionnaire: An Assessment of Community-Wide Methodologies and Perspectives. *Metabolomics* **2018**, *14* (5). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1340-1>.
- (162) Evans, A. M.; O'Donovan, C.; Playdon, M.; Beecher, C.; Beger, R. D.; Bowden, J. A.; Broadhurst, D.; Clish, C. B.; Dasari, S.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Hartung, T.; Hsu, P. C.; Huan, T.; Jans, J.; Jones, C. M.; Kachman, M.; Kleensang, A.; Lewis, M. R.; Monge, M. E.; Mosley, J. D.; Taylor, E.; Tayyari, F.; Theodoridis, G.; Torta, F.; Ubhi, B. K.; Vuckovic, D. Dissemination and Analysis of the Quality Assurance (QA) and Quality Control (QC) Practices of LC-MS Based Untargeted Metabolomics Practitioners. *Metabolomics* **2020**, *16* (10). <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01728-5>.
- (163) Lippa, K. A.; Aristizabal-Henao, J. J.; Beger, R. D.; Bowden, J. A.; Broeckling, C.; Beecher, C.; Clay Davis, W.; Dunn, W. B.; Flores, R.; Goodacre, R.; Gouveia, G. J.; Harms, A. C.; Hartung, T.; Jones,

C. M.; Lewis, M. R.; Ntai, I.; Percy, A. J.; Raftery, D.; Schock, T. B.; Sun, J.; Theodoridis, G.; Tayyari, F.; Torta, F.; Ulmer, C. Z.; Wilson, I.; Ubhi, B. K. Reference Materials for MS-Based Untargeted Metabolomics and Lipidomics: A Review by the Metabolomics Quality Assurance and Quality Control Consortium (MQACC). *Metabolomics*. Springer April 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11306-021-01848-6>.

- (164) Phinney, K. W.; Ballihaut, G.; Bedner, M.; Benford, B. S.; Camara, J. E.; Christopher, S. J.; Davis, W. C.; Dodder, N. G.; Eppe, G.; Lang, B. E.; Long, S. E.; Lowenthal, M. S.; McGaw, E. A.; Murphy, K. E.; Nelson, B. C.; Prendergast, J. L.; Reiner, J. L.; Rimmer, C. A.; Sander, L. C.; Schantz, M. M.; Sharpless, K. E.; Sniegoski, L. T.; Tai, S. S. C.; Thomas, J. B.; Vetter, T. W.; Welch, M. J.; Wise, S. A.; Wood, L. J.; Guthrie, W. F.; Hagwood, C. R.; Leigh, S. D.; Yen, J. H.; Zhang, N. F.; Chaudhary-Webb, M.; Chen, H.; Fazili, Z.; Lavoie, D. J.; McCoy, L. F.; Momin, S. S.; Paladugula, N.; Pendergrast, E. C.; Pfeiffer, C. M.; Powers, C. D.; Rabinowitz, D.; Rybak, M. E.; Schleicher, R. L.; Toombs, B. M. H.; Xu, M.; Zhang, M.; Castle, A. L. Development of a Standard Reference Material for Metabolomics Research. *Anal Chem* **2013**, *85* (24). <https://doi.org/10.1021/ac402689t>.
- (165) <https://www.nist.gov/mml/csd/organic-chemical-metrology/primary-focus-areas/chemical-metrology-biosciences/products-and>.
- (166) Siskos, A. P.; Jain, P.; Römisch-Margl, W.; Bennett, M.; Achaintre, D.; Asad, Y.; Marney, L.; Richardson, L.; Koulman, A.; Griffin, J. L.; Raynaud, F.; Scalbert, A.; Adamski, J.; Prehn, C.; Keun, H. C. Interlaboratory Reproducibility of a Targeted Metabolomics Platform for Analysis of Human Serum and Plasma. *Anal Chem* **2017**, *89* (1). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02930>.
- (167) Bowden, J. A.; Heckert, A.; Ulmer, C. Z.; Jones, C. M.; Koelmel, J. P.; Abdullah, L.; Ahonen, L.; Alnouti, Y.; Armando, A. M.; Asara, J. M.; Bamba, T.; Barr, J. R.; Bergquist, J.; Borchers, C. H.; Brandsma, J.; Breitkopf, S. B.; Cajka, T.; Cazenave-Gassiot, A.; Checa, A.; Cinel, M. A.; Colas, R. A.; Cremers, S.; Dennis, E. A.; Evans, J. E.; Fauland, A.; Fiehn, O.; Gardner, M. S.; Garrett, T. J.; Gotlinger, K. H.; Han, J.; Huang, Y.; Neo, A. H.; Hyötyläinen, T.; Izumi, Y.; Jiang, H.; Jiang, H.; Jiang, J.; Kachman, M.; Kiyonami, R.; Klavins, K.; Klose, C.; Köfeler, H. C.; Kolmert, J.; Koal, T.; Koster, G.; Kuklennyik, Z.; Kurland, I. J.; Leadley, M.; Lin, K.; Maddipati, K. R.; McDougall, D.; Meikle, P. J.; Mellett, N. A.; Monnin, C.; Moseley, M. A.; Nandakumar, R.; Oresic, M.; Patterson, R.; Peake, D.; Pierce, J. S.; Post, M.; Postle, A. D.; Pugh, R.; Qiu, Y.; Quehenberger, O.; Ramrup, P.; Rees, J.; Rembiesa, B.; Reynaud, D.; Roth, M. R.; Sales, S.; Schuhmann, K.; Schwartzman, M. L.; Serhan, C. N.; Shevchenko, A.; Somerville, S. E.; St John-Williams, L.; Surma, M. A.; Takeda, H.; Thakare, R.; Thompson, J. W.; Torta, F.; Triebel, A.; Trötzmüller, M.; Ubhayasekera, S. J. K.;

- Vuckovic, D.; Weir, J. M.; Welti, R.; Wenk, M. R.; Wheelock, C. E.; Yao, L.; Yuan, M.; Zhao, X. H.; Zhou, S. Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics Using SRM 1950-Metabolites in Frozen Human Plasma. *J Lipid Res* **2017**, *58* (12). <https://doi.org/10.1194/jlr.M079012>.
- (168) Liu, K. H.; Nellis, M.; Uppal, K.; Ma, C.; Tran, V. L.; Liang, Y.; Walker, D. I.; Jones, D. P. Reference Standardization for Quantification and Harmonization of Large-Scale Metabolomics. *Anal Chem* **2020**, *92* (13). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00338>.
- (169) Aristizabal-Henao, J. J.; Jones, C. M.; Lippa, K. A.; Bowden, J. A. Nontargeted Lipidomics of Novel Human Plasma Reference Materials: Hypertriglyceridemic, Diabetic, and African-American. *Anal Bioanal Chem* **2020**, *412* (27). <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02910-3>.
- (170) Gouveia, G. J.; Shaver, A. O.; Garcia, B. M.; Morse, A. M.; Andersen, E. C.; Edison, A. S.; McIntyre, L. M. Long-Term Metabolomics Reference Material. *Anal Chem* **2021**, *93* (26). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01294>.
- (171) Wasito, H.; Hermann, G.; Fitz, V.; Troyer, C.; Hann, S.; Koellensperger, G. Yeast-Based Reference Materials for Quantitative Metabolomics. *Anal Bioanal Chem* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03694-w>.
- (172) Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Reinke, S. N.; Kuligowski, J.; Wilson, I. D.; Lewis, M. R.; Dunn, W. B. Guidelines and Considerations for the Use of System Suitability and Quality Control Samples in Mass Spectrometry Assays Applied in Untargeted Clinical Metabolomic Studies. *Metabolomics*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>.
- (173) Lutz, N. W.; Sweedler, J. v.; Wevers, R. A. *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques*; 2010. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511996634>.
- (174) Neubauer, S.; Haberhauer-Troyer, C.; Klavins, K.; Russmayer, H.; Steiger, M. G.; Gasser, B.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Hann, S.; Koellensperger, G. U13C Cell Extract of *Pichia Pastoris* - A Powerful Tool for Evaluation of Sample Preparation in Metabolomics. *J Sep Sci* **2012**, *35* (22). <https://doi.org/10.1002/jssc.201200447>.
- (175) Schwaiger, M.; Schoeny, H.; el Abiead, Y.; Hermann, G.; Rampler, E.; Koellensperger, G. Merging Metabolomics and Lipidomics into One Analytical Run. *Analyst* **2019**, *144* (1). <https://doi.org/10.1039/c8an01219a>.

- (176) Rampler, E.; Schoeny, H.; Mitic, B. M.; el Abiead, Y.; Schwaiger, M.; Koellensperger, G. Simultaneous Non-Polar and Polar Lipid Analysis by on-Line Combination of HILIC, RP and High Resolution MS. *Analyst* **2018**, *143* (5). <https://doi.org/10.1039/c7an01984j>.
- (177) Schoeny, H.; Rampler, E.; el Abiead, Y.; Hildebrand, F.; Zach, O.; Hermann, G.; Koellensperger, G. A Combined Flow Injection/Reversed-Phase Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Workflow for Accurate Absolute Lipid Quantification with ¹³C Internal Standards. *Analyst* **2021**, *146* (8). <https://doi.org/10.1039/d0an02443k>.
- (178) Rampler, E.; Hermann, G.; Grabmann, G.; el Abiead, Y.; Schoeny, H.; Baumgartinger, C.; Köcher, T.; Koellensperger, G. Benchmarking Non-targeted Metabolomics Using Yeast-Derived Libraries. *Metabolites* **2021**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/metabo11030160>.
- (179) Schoeny, H.; Rampler, E.; Binh Chu, D.; Schoeberl, A.; Galvez, L.; Blaukopf, M.; Kosma, P.; Koellensperger, G. Achieving Absolute Molar Lipid Concentrations: A Phospholipidomics Cross-Validation Study. *Anal Chem* **2022**, *94* (3). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03743>.
- (180) Rampler, E.; Egger, D.; Schoeny, H.; Rusz, M.; Pacheco, M. P.; Marino, G.; Kasper, C.; Naegele, T.; Koellensperger, G. The Power of LC-MS Based Multiomics: Exploring Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Molecules* **2019**, *24* (19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193615>.
- (181) Rampler, E.; Criscuolo, A.; Zeller, M.; el Abiead, Y.; Schoeny, H.; Hermann, G.; Sokol, E.; Cook, K.; Peake, D. A.; Delanghe, B.; Koellensperger, G. A Novel Lipidomics Workflow for Improved Human Plasma Identification and Quantification Using RPLC-MSⁿ Methods and Isotope Dilution Strategies. *Anal Chem* **2018**, *90* (11). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05382>.
- (182) Hermann, G.; Schwaiger, M.; Volejnik, P.; Koellensperger, G. ¹³C-Labelled Yeast as Internal Standard for LC-MS/MS and LC High Resolution MS Based Amino Acid Quantification in Human Plasma. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *155*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.050>.
- (183) Schwaiger, M.; Rampler, E.; Hermann, G.; Miklos, W.; Berger, W.; Koellensperger, G. Anion-Exchange Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Merging Targeted and Non-Targeted Metabolomics. *Anal Chem* **2017**, *89* (14). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01624>.
- (184) Mairinger, T.; Steiger, M.; Nocon, J.; Mattanovich, D.; Koellensperger, G.; Hann, S. Gas Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Determination of

- Isotopologue and Tandem Mass Isotopomer Fractions of Primary Metabolites for ¹³C-Metabolic Flux Analysis. *Anal Chem* **2015**, *87* (23). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03173>.
- (185) Mairinger, T.; Wegscheider, W.; Peña, D. A.; Steiger, M. G.; Koellensperger, G.; Zanghellini, J.; Hann, S. Comprehensive Assessment of Measurement Uncertainty in ¹³C-Based Metabolic Flux Experiments. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (14). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1017-7>.
- (186) Guerrasio, R.; Haberhauer-Troyer, C.; Mattanovich, D.; Koellensperger, G.; Hann, S. Metabolic Profiling of Amino Acids in Cellular Samples via Zwitterionic Sub-2 Mm Particle Size HILIC-MS/MS and a Uniformly ¹³C Labeled Internal Standard Amino Acid Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2014**, *406* (3). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7456-2>.
- (187) Guerrasio, R.; Haberhauer-Troyer, C.; Steiger, M.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Koellensperger, G.; Hann, S. Measurement Uncertainty of Isotopologue Fractions in Fluxomics Determined via Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (15). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6910-5>.
- (188) Klavins, K.; Neubauer, S.; al Chalabi, A.; Sonntag, D.; Haberhauer-Troyer, C.; Russmayer, H.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Hann, S.; Koellensperger, G. Interlaboratory Comparison for Quantitative Primary Metabolite Profiling in *Pichia Pastoris* Metabolomics and Metabolite Profiling. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (15). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6964-4>.
- (189) Ezgu, F. Recent Advances in the Molecular Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. *Clin Biochem* **2014**, *47* (9). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.05.048>.
- (190) Saudubray, J. M.; Sedel, F.; Walter, J. H. Clinical Approach to Treatable Inborn Metabolic Diseases: An Introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0358-0>.
- (191) Dembert, M. L.; Brownstein, A. H.; Keith, J. F. Principles and Practices of Screening for Disease. *Mil Med* **1988**, *153* (1). <https://doi.org/10.1093/milmed/153.1.16>.
- (192) Vassili, V.; Bwee Tien, P. T. Diagnostic Work-up in Acute Conditions of Inborn Errors of Metabolism and Storage Diseases. In *Handbook of Clinical Neurology*; 2013; Vol. 113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00025-3>.
- (193) Guthrie, R. Blood Screening for Phenylketonuria. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1961. <https://doi.org/10.1001/jama.1961.03040470079019>.
- (194) Clague, A.; Thomas, A. Neonatal Biochemical Screening for Disease. *Clinica Chimica Acta*. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00716-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00716-1).

- (195) Millington, D. S.; Kodo, N.; Norwood, D. L.; Roe, C. R. Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism. *J Inherit Metab Dis* **1990**, *13* (3). <https://doi.org/10.1007/BF01799385>.
- (196) Therrell, B. L.; Padilla, C. D.; Loeber, J. G.; Kneisser, I.; Saadallah, A.; Borrajo, G. J. C.; Adams, J. Current Status of Newborn Screening Worldwide: 2015. *Seminars in Perinatology*. 2015. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.03.002>.
- (197) Hoffman, G. L.; DeMartino, J. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening: CLSI Solves the Puzzle MS/MS in NBS Labs. *Laboratory Medicine*. 2010. <https://doi.org/10.1309/LM7FZ6Y4MZXTNUCL>.
- (198) Groselj, U.; Murko, S.; Zerjav Tansek, M.; Kovac, J.; Trampus Bakija, A.; Repic Lampret, B.; Battelino, T. Comparison of Tandem Mass Spectrometry and Amino Acid Analyzer for Phenylalanine and Tyrosine Monitoring-Implications for Clinical Management of Patients with Hyperphenylalaninemia. *Clin Biochem* **2015**, *48* (1–2). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.014>.
- (199) Stroup, B. M.; Held, P. K.; Williams, P.; Clayton, M. K.; Murali, S. G.; Rice, G. M.; Ney, D. M. Clinical Relevance of the Discrepancy in Phenylalanine Concentrations Analyzed Using Tandem Mass Spectrometry Compared with Ion-Exchange Chromatography in Phenylketonuria. *Mol Genet Metab Rep* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.01.001>.
- (200) Salud Año, N. de; Vicenta Labrador Cañadas Marta Navarro Gómez, M. *INFORME DE EVALUACIÓN DEL PROGRAMA DE CRIBADO NEONATAL DEL SISTEMA Comunidades y Ciudades Autónomas*. <https://cpage.mpr.gob.es/>.
- (201) Centerwall, S. A.; Centerwall, W. R. The Discovery of Phenylketonuria: The Story of a Young Couple, Two Retarded Children, and a Scientist. *Pediatrics*. 2000. <https://doi.org/10.1542/peds.105.1.89>.
- (202) Følling, I. The Discovery of Phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* **1994**, *407*.
- (203) Couce, M. L.; Castiñeiras, D. E.; Bóveda, M. D.; Baña, A.; Cocho, J. A.; Iglesias, A. J.; Colón, C.; Alonso-Fernández, J. R.; Fraga, J. M. Evaluation and Long-Term Follow-up of Infants with Inborn Errors of Metabolism Identified in an Expanded Screening Programme. *Mol Genet Metab* **2011**, *104* (4). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.09.021>.

- (204) González-Domínguez, R.; González-Domínguez, Á.; Sayago, A.; Fernández-Recamales, Á. Recommendations and Best Practices for Standardizing the Pre-Analytical Processing of Blood and Urine Samples in Metabolomics. *Metabolites*. 2020. <https://doi.org/10.3390/metabo10060229>.
- (205) Niu, Z.; Zhang, W.; Yu, C.; Zhang, J.; Wen, Y. Recent Advances in Biological Sample Preparation Methods Coupled with Chromatography, Spectrometry and Electrochemistry Analysis Techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- (206) Drolet, J.; Tolstikov, V.; Williams, B. A.; Greenwood, B. P.; Hill, C.; Vishnudas, V. K.; Sarangarajan, R.; Narain, N. R.; Kiebish, M. A. Integrated Metabolomics Assessment of Human Dried Blood Spots and Urine Strips. *Metabolites* **2017**, 7 (3). <https://doi.org/10.3390/metabo7030035>.
- (207) Moat, S. J.; Schulenburg-Brand, D.; Lemonde, H.; Bonham, J. R.; Weykamp, C. W.; Mei, J. v.; Shortland, G. S.; Carling, R. S. Performance of Laboratory Tests Used to Measure Blood Phenylalanine for the Monitoring of Patients with Phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2020. <https://doi.org/10.1002/jimd.12163>.
- (208) Demirev, P. A. Dried Blood Spots: Analysis and Applications. *Analytical Chemistry*. 2013. <https://doi.org/10.1021/ac303205m>.
- (209) Palmer, E. A.; Cooper, H. J.; Dunn, W. B. Investigation of the 12-Month Stability of Dried Blood and Urine Spots Applying Untargeted UHPLC-MS Metabolomic Assays. *Anal Chem* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02577>.
- (210) van Vliet, K.; van Ginkel, W. G.; van Dam, E.; de Blaauw, P.; Koehorst, M.; Kingma, H. A.; van Spronsen, F. J.; Heiner-Fokkema, M. R. Dried Blood Spot versus Venous Blood Sampling for Phenylalanine and Tyrosine. *Orphanet J Rare Dis* **2020**, 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1343-7>.
- (211) Thevis, M.; Kuuranne, T.; Dib, J.; Thomas, A.; Geyer, H. Do Dried Blood Spots (DBS) Have the Potential to Support Result Management Processes in Routine Sports Drug Testing? *Drug Test Anal* **2020**, 12 (6). <https://doi.org/10.1002/dta.2790>.
- (212) Jacobson, T. A.; Kler, J. S.; Bae, Y.; Chen, J.; Ladrór, D. T.; Iyer, R.; Nunes, D. A.; Montgomery, N. D.; Pleil, J. D.; Funk, W. E. A State-of-the-Science Review and Guide for Measuring Environmental Exposure Biomarkers in Dried Blood Spots. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. Springer Nature 2022. <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00460-7>.

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis doctoral es la síntesis, purificación, caracterización y aplicación analítica de compuestos marcados isotópicamente relacionados con procesos biológicos. Con el fin de abarcar un elevado espectro de compuestos, se pretende este objetivo se va a concretar a través de objetivos parciales, dedicados cada uno de ellos a un analito o a un grupo de analitos biológicos diferentes: aminoácidos yodados, aminoácidos proteinogénicos, un péptido, nucleósidos y metabolitos intracelulares. Para ello se plantea el desarrollo de diferentes estrategias de síntesis, desde la síntesis en fase sólida (automatizada) hasta la biosíntesis, pasando por la síntesis orgánica. Así mismo, los diferentes compuestos marcados sintetizados serán purificados empleando diferentes estrategias como la extracción selectiva, la precipitación selectiva o la cromatografía preparativa. Por otro lado, una vez aislados los compuestos sintetizados se deberá realizar una adecuada caracterización, principalmente relacionada con su posterior uso como reactivos de Dilución Isotópica, lo que implica la determinación de su enriquecimiento isotópico y de su concentración. Por último, se desarrollarán métodos analíticos para la aplicación de los patrones sintetizados en diferentes campos del análisis químico, como son la cuantificación de metabolitos de interés clínico, la trazabilidad o la identificación (anotación) de compuestos naturales.

El objetivo de la presente Tesis se divide, por lo tanto, en cuatro objetivos parciales, concretados por un compuesto marcado o más de un compuesto, perteneciendo estos a la misma familia de compuestos. La producción y el empleo de cada uno de estos compuestos marcados se recogerá en capítulos.

CAPÍTULO 1

Síntesis, purificación, caracterización y aplicación de 3-monoyodotirosina y 3,5-diyodotirosina marcada a la determinación de muestras de orina de neonatos

I. 1. INTRODUCCIÓN

I 1.1. Hipotiroidismo congénito

El hipotiroidismo congénito (HC) es una enfermedad cuyas principales causas incluyen defectos del desarrollo de la glándula tiroidea (disgenesia tiroidea), déficits en la producción de hormonas tiroideas (dishormonogénesis tiroidea), o defectos en la unión o en la señal de transducción de la hormona estimulante de la glándula tiroidea (TSH). El HC es una de las principales causas prevenibles de la discapacidad intelectual y fue la segunda ECM incluida en el cribado neonatal¹. Típicamente, para su determinación se mide la concentración de la hormona tirotrópica y/o la hormona tiroxina (T4) en sangre por medio de métodos inmunológicos². Sin embargo, la determinación de TSH y T4 no sirve para diagnosticar algunas variantes de la enfermedad. A nivel molecular, para la biosíntesis de hormonas tiroideas se requiere yodo, yoduro peroxidasa (TPO), una fuente de peróxido de hidrógeno, una proteína aceptora de yoduro (tiroglobulina, TG) y un sistema de captación y reciclaje de yodo (desyodasas)³. Mutaciones en cualquiera de los genes relacionados en este proceso puede desembocar en el desarrollo de HC.

El hipotiroidismo por deficiencia de yodotirosina dehalogenasa 1 (ITDD) es un tipo de hipotiroidismo congénito relacionado con el fallo de la enzima yodotirosina dehalogenasa 1 (DEHAL1), la cual desyoda la 3-monoyodotirosina y la 3,5-diyodotirosina (MIT y DIT, respectivamente) y recicla el yodo para la síntesis efectiva de hormonas tiroideas⁴. Este tipo de HC fue estudiado por primera vez en humanos con la mutación en el gen que codifica DEHAL1 (IYD, OMIM #612025) en 2008⁵ y, más tarde, otros autores encontraron concentraciones significativamente altas de MIT y DIT en orina en personas con mutaciones en el gen IYD^{6,7}. Este tipo de patologías, cuyo diagnóstico molecular no está muy estudiado, suelen ser determinadas mediante estudios genéticos. Así, en el cribado neonatal el estudio genético también es importante y se emplea para determinadas patologías^{8,9}. De hecho, en lo que respecta a HC, en determinadas poblaciones (consanguinidad, deficiencia de yodo) el estudio genético puede ser de vital importancia, tal y como ha puesto de manifiesto un reciente estudio sobre la población de Sudán¹⁰. Esto sugiere que, independientemente del tipo de análisis, aun cuando un método pueda no ser asumible a gran escala, sí puede ser interesante para determinadas patologías y poblaciones. Esta asunción, respaldada por el creciente campo de la medicina personalizada¹¹, también aplica al cribado neonatal y, en ese sentido, sería interesante disponer de un método validado para estudiar los niveles de MIT y DIT en muestras de orina¹².

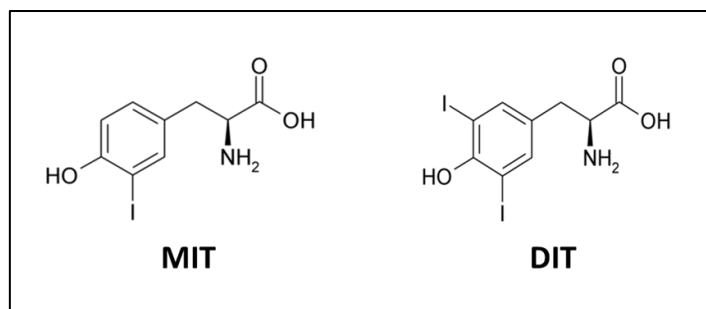


Figura 1. Estructuras de la 3-monoyodotirosina y la 3,5-diyodotirosina

I. 1.2. Determinación de metabolitos del tiroides por HPLC-MS

Como se ha comentado previamente, niveles altos de MIT y DIT en orina son una posible manifestación del ITDD. En general, los metabolitos del tiroides (THMs, siglas en inglés) son una fuente importante de información y son ampliamente estudiados en endocrinología¹³. Estos compuestos se forman a partir del aminoácido tirosina (en TG), mediante la adición de átomos de yodo en los anillos aromáticos y reacciones de acoplamiento. La determinación de THMs y de hormonas tiroideas ha sido llevada a cabo en una gran variedad de muestras clínicas y biológicas empleando HPLC-MS^{6,7,14-23} y GC-MS^{24,25}. Sin embargo, pocos métodos han sido desarrollados para determinar MIT y DIT y ninguno de ellos ha sido aplicado a estudiar ITDD en neonatos. El descubrimiento de nuevos THMs y su interés clínico se ha visto ralentizado debido a la inestabilidad térmica y a la fotosensibilidad de esta familia de moléculas. Así, Hansen et al.¹⁴ publicó recientemente un artículo donde mostraba la fotólisis y degradación de triyodotironina a diyodo- y monoyodo-tironina bajo condiciones estándares de trabajo en laboratorio. Por esta razón, algunos investigadores han intentado emplear antioxidantes inespecíficos durante la preparación de la muestra para evitar posibles degradaciones, sin mostrar resultados concluyentes¹⁵.

La cromatografía líquida de alta resolución junto a la dilución isotópica ha sido descrita como el método analítico por excelencia en la investigación del metabolismo tiroideo por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad²⁶. Así, se han desarrollado y validado métodos de referencia para la medida de hormonas tiroideas por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)^{27,28} de Estados Unidos y por la Federación Internacional de química clínica y medicina de laboratorio (IFCC)²⁹. Por otro lado, estos métodos han sido refrendados por el Comité de Trazabilidad en Medicina de Laboratorio (JCTLM)³⁰. Adicionalmente, en el análisis de THMs los métodos presentan diferentes procedimientos para el tratamiento de muestra con el fin de: 1) evitar la supresión de la ionización en la fuente de ionización por electrospray, 2) eliminar compuestos abundantes, los cuales podrían interferir en la determinación y 3) incrementar la cantidad de analito inyectada a través de una preconcentración o una derivatización de la muestra.

Sin embargo, una revisión reciente sobre los métodos de análisis de metabolitos tiroideos indicaba la ausencia de patrones marcados isotópicamente, lo que implica una escasa (o inexistente) corrección de los efectos de matriz y evaluación de la eficacia de extracción y/o derivatización durante la preparación de la muestra¹³. Actualmente no se pueden adquirir patrones comerciales de DIT marcados isotópicamente y solo una empresa comercializa ¹³C₆-MIT (precio: 1000\$/10 mg), lo que limita el desarrollo de métodos fiables para la determinación de estos analitos y en consecuencia la calidad de los resultados obtenidos.

I. 2. OBJETIVO

El objetivo del primer capítulo de esta Tesis Doctorales la síntesis de dos metabolitos del tiroides marcados isotópicamente, la 3-monoyodotirosina (MIT) y la 3,5-diyodotirosina (DIT), y su purificación, caracterización analítica y aplicación al análisis de MIT y DIT en muestras de orina líquida e impregnadas en tiras de papel (DUS) utilizando el análisis por Dilución Isotópica y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (HPLC-MS/MS). La consecución de este objetivo requiere el desarrollo de un procedimiento de preparación de muestra, de un método de medida de la distribución isotópica un método de análisis por HPLC-MS/MS y la validación del mismo.

I. 3. EXPERIMENTAL

I. 3.1. Reactivos y materiales

La L-tirosina marcada con un átomo de ^{15}N (^{15}N -tirosina) y la creatinina marcada con un átomo de ^{13}C (grupo metilo) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La L-tirosina marcada con dos átomos de ^{13}C (posiciones 3 y 5 del anillo aromático) se adquirió en Cambridge Isotope Laboratories (MA, USA). El HBF_4 se compró en Sigma-Aldrich. El reactivo tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I), abreviado IPy_2BF_4 , fue sintetizado y proporcionado por el Grupo de Síntesis Orgánica Selectiva del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo. Los patrones de 3-monoyodotirosina y 3,5-diyodotirosina se compraron en Acros Organics (Geel, Bélgica). El ácido fórmico (FA), el ácido trifluoroacético (TFA), el hidróxido sódico (NaOH) y el butanol-clorhídrico se adquirieron en Sigma-Aldrich. El acetonitrilo (ACN) calidad “optima LC-MS” se adquirió en Fischer Scientific (MA, USA). El agua ultrapura empleada en la preparación de las fases móviles y de las disoluciones se obtuvo con un sistema de destilación PureLab Flex 4 de ELGA Labwater (Lane End, Reino Unido).

Las muestras de orina líquida e impregnadas en tiras de papel (DUS, por sus siglas en inglés) se obtuvieron en el Laboratorio de Metabolopatías del Hospital Universitario de Santiago de Compostela. Estas muestras se enviaron congeladas y se mantuvieron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Las muestras en tiras de papel se recogieron en papel SS903 (Schleicher & Schuell, Alemania). Los tubos Eppendorf® de 1,5 mL se adquirieron en Sigma. Los viales de cristal de 2 mL se adquirieron en DISMED (Asturias, España).

I. 3.2. Instrumentación

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) de Agilent series 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El sistema de UPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent modelo 6460, equipado con una fuente de ionización “jet-stream”. Se trabajó en modo de ionización positivo. El sistema de cromatografía preparativa utilizado a lo largo de este capítulo fue un Agilent modelo Infinity 1260. Se empleó un horno HERAEUS® de Thermo (MA, USA) para los estudios de estabilidad a $50\text{ }^\circ\text{C}$ y una balanza analítica modelo AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Suiza) para la preparación gravimétrica de todas las disoluciones. Para llevar a cabo las centrifugaciones se empleó una centrífuga Micro STAR 17 de VWR (PA, USA), mientras que las evaporaciones se realizaron en un evaporador MiVac de Supelco (St. Louis, MO, USA). Todas las disoluciones se homogeneizaron empleando un agitador tipo Vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italia). Para la evaporación de los crudos de reacción se empleó un rotavapor

Büchi (Flawil, Suiza). Así mismo, también se empleó un pH-metro Basic 20 de Crison (Barcelona, España) para ajustar el pH de las disoluciones y fases móviles y también para llevar a cabo la precipitación del DIT sintetizado.

I. 3.3. Procedimientos

I. 3.3.1. Síntesis, purificación y caracterización de ¹⁵N-monoyodotirosina y ¹³C₂-diyodotirosina.

Aproximadamente 100 mg de ¹⁵N-tirosina se introducen en un matraz de 50 mL y se añaden 5 mL de acetonitrilo. A continuación, se añaden 0,37 mL de HBF₄ 48% (p/p) y se disuelve el sólido mediante agitación. Por último, se añaden 200 mg de IPyBF₄ lentamente, en una atmosfera de nitrógeno y con una agitación suave. La reacción tiene lugar rápidamente, observándose un cambio de color del incoloro al amarillo. Seguidamente, se evapora el disolvente empleando vacío ($8 \cdot 10^{-3}$ mbar) para purificar el producto de algunos sub-productos como el yodo elemental o la piridina. La purificación del sólido se lleva a cabo por cromatografía preparativa. Para ello, se disuelve el sólido en 2 mL de ACN 10% (v/v) y TFA 0,1% (v/v) (fase móvil inicial) y se inyectan alícuotas de 100 µL en el equipo. Las condiciones de separación se detallan en la Tabla 1.

Aproximadamente 100 mg de ¹⁵N-tirosina se introducen en un matraz de 50 mL y se añaden 5 mL de acetonitrilo. A continuación, 0,37 mL de HBF₄ 48% (p/p) se añaden y se disuelve el sólido con agitación. Por último, se añaden 490 mg de IPyBF₄ rápidamente, en una atmosfera de nitrógeno y con una agitación fuerte. La reacción tiene lugar rápidamente, observándose un cambio de color del incoloro al naranja. Seguidamente, se evapora el disolvente empleando vacío ($8 \cdot 10^{-3}$ mbar) para purificar el producto de algunos sub-productos como el yodo elemental o la piridina. En este caso, la purificación se realiza mediante la precipitación del DIT al ajustar el pH al punto isoeléctrico del compuesto (pH=4,29). Para ello, el crudo de reacción se disuelve en 5 mL de agua, se filtra y se le añade, gota a gota y bajo agitación, una disolución de NaOH 3 M hasta que aparece un precipitado abundante. El precipitado se filtra y se lava con agua desionizada. Seguidamente, el sólido se disuelve en 5 mL de HCl 1% (v/v) y se repite la precipitación del DIT. Tras su filtración y secado, el sólido se guarda en oscuridad, bajo atmosfera de nitrógeno y a 4 °C.

Tabla 1. Parámetros seleccionados para la purificación cromatográfica de ¹⁵N-MIT.

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1260	
Columna	AerisPeptide XB-C18 (Phenomenex)	
Dimensiones	250x4,6mm x5µm	
Temperatura	25 °C	
Longitud de onda	280 nm	
Volumen de inyección	100 µL	
Flujo	2 mL/min	
Fase A	0,1% ácido fórmico en agua	
Fase B	ACN, 0,1% ácido fórmico	
Método de separación	Tiempo (min) - % B	
	0	8
	5	8
	24	70
	29	70
	29,5	8
	49,5	8

I. 3.3.2. Preparación de las muestras de orina líquida y de orina impregnada en tiras de papel

Las muestras de orina se transportaron y almacenaron congeladas a -20°C para asegurar su preservación. Para el análisis, las muestras se descongelan y se centrifugan (14000 rpm) a 4 °C durante 10 minutos. Después, se pesan 0,2 g de orina en un vial de cristal y se añaden aproximadamente 0,1 g de una disolución de 100 µg·g⁻¹ de creatinina y 0,1 g de una disolución que contiene una mezcla de 2,5 ng·g⁻¹ de ¹⁵N-MIT y ¹³C₂-DIT. Tras mezclar mediante agitación vigorosa, las disoluciones resultantes se evaporan y se reconstituyen con una disolución de HCl 3M en butanol. A continuación, los viales se centrifugan a 14000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfiere a otro vial de cristal para completar la derivatización a 70°C durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se evaporan, se reconstituyen en 50 µL de ácido fórmico al 0,1%, se centrifugan y el sobrenadante se trasvasa a un vial de cromatografía.

Las muestras de orina impregnadas en papel también se transportaron y almacenaron congeladas a -20°C. Para el análisis, las muestras se descongelan a temperatura ambiente y se toman 12 secciones de 1/8 de pulgada por muestra empleando un cortador circular. A continuación, las secciones de papel son tratadas con 300 µL de H₂O en tubos Eppendorf® de 1,5 mL mediante

agitación a 700 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retira el papel y los tubos se vuelven a centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se transfieren 200 μL del sobrenadante a viales de cristal de 2 mL. Finalmente, al extracto se añaden aproximadamente 0,1 g de una disolución de $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ^{13}C -creatinina y 0,1 g de una disolución que contiene una mezcla de $2,5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT siguiendo, a continuación, el procedimiento ya descrito anteriormente para las orinas líquidas. Este proceso se resume en la Figura 2.

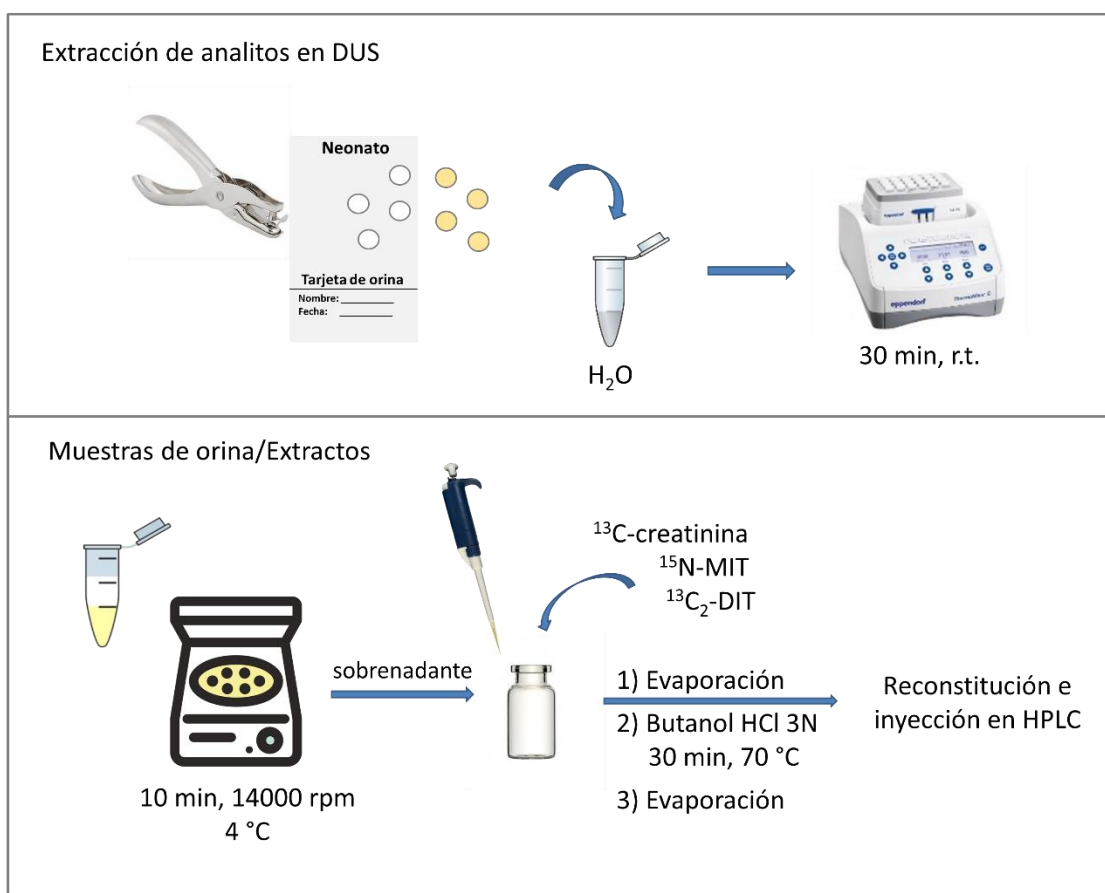


Figura 2. Ilustración del procedimiento de preparación de muestra para el análisis de MIT y DIT por Dilución Isotópica-HPLC-MS/MS en muestras de DUS y de orina.

I. 3.3.3. Análisis LC-MS/MS de las muestras

La separación cromatográfica de creatinina, MIT y DIT se llevó a cabo usando una columna de fase reversa Zorbax C18 eclipse plus (2,1mm x 50mm and $1,8 \mu\text{m}$). Para los análisis se empleó una separación en gradiente, con dos fases móviles A (0,1 % (v/v) FA) y B (0,1 % (v/v) FA en ACN). Las condiciones experimentales para la separación cromatográfica se presentan en la Tabla 2. Las medidas por MS/MS se realizaron con ionización positiva y con el modo de medida de monitorización de reacción seleccionada o *Selected Reaction Monitoring* (SRM). Los parámetros

instrumentales para la detección de los compuestos se optimizaron mediante la inyección directa de una disolución de MIT y DIT de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en una mezcla 1:1 de las fases móviles A y B. La adquisición y el tratamiento de datos se realizó empleando el programa Agilent MassHunter Workstation versión B.06.00. Las condiciones experimentales optimizadas del espectrómetro de masas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 2. Parámetros seleccionados para la separación cromatográfica de MIT y DIT.

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1290	
Columna	Zorbax Eclipse C18	
Dimensiones	50 x 2,1mm x 1,6 μm	
Temperatura	25 °C	
Volumen de inyección	10 μL	
Flujo	0,4 mL/min	
Fase A	0,1% ácido fórmico en agua	
Fase B	ACN, 0,1% ácido fórmico	
Separación cromatográfica	Tiempo (min) - % B	
	0	2
	9	35
	10	80
	11	80
	12	2
	15	2

Tabla 3. Parámetros seleccionados para la detección de MIT y DIT

Espectrómetro de masas	Agilent 6460	
Fuente de ionización	Electrospray jet stream	
Modo de ionización	Positivo	
Temperatura del gas	250 °C	
Flujo del gas	9 mL/min	
Temperatura del gas envolvente	400 °C	
Flujo del gas envolvente	11 mL/min	
Presión del nebulizador	25 psi	
Voltaje del capilar	4000 V	
Voltaje de la entrada	1000 V	

	Transición	Energía de colisión, CE (V)	Fragmentor (V)
Creatinina	114→86	5	135
	115→87	5	135
	116→88	5	135
MIT	364→262	5	135
	365→263	5	135
	366→264	5	135
	367→265	5	135
DIT	490→388	10	135
	491→389	10	135
	492→390	10	135
	493→391	10	135

I. 3.3.4. Cálculo de concentraciones mediante IDMS con doble trazador

El modelo matemático empleado en este capítulo está basado en el descrito en la introducción para el cálculo de moles de compuestos naturales empleando trazadores isotópicos múltiples e IPD.

A la muestra (s), que contiene 3-monoyodotirosina (MIT) y 3,5-diyodotirosina (DIT), se le añade una cantidad conocida de ¹⁵N-MIT (trazador 1, t1) y ¹³C₂-DIT (trazador 2, t2). El número de moles (N) de MIT y DIT en la mezcla (m) viene dado por las ecuaciones (13) y (14):

$$N_m^{MIT} = N_s^{MIT} + N_{t1}^{MIT} + N_{t2}^{MIT} \quad (13)$$

$$N_m^{DIT} = N_s^{DIT} + N_{t1}^{DIT} + N_{t2}^{DIT} \quad (14)$$

Donde N_m^{MIT} , N_s^{MIT} , N_{t1}^{MIT} y N_{t2}^{MIT} son el número de moles de MIT en la mezcla, muestra, trazador 1 y trazador 2 (impureza ¹³C₂-MIT), respectivamente, y N_m^{DIT} , N_s^{DIT} , N_{t1}^{DIT} y N_{t2}^{DIT} son el número de moles de DIT en la mezcla, muestra, trazador 1 (impureza ¹⁵N-DIT) y trazador 2, respectivamente.

Tras la adición y homogenización de la muestra una fracción de MIT podría convertirse en DIT, o viceversa, durante cualquiera de las etapas de la preparación de muestra. Si se asume que el equilibrio isotópico tiene lugar antes de que ocurra cualquiera de las reacciones de

interconversión, se pueden establecer nuevas ecuaciones para los balances de masa, (15) y (16), donde F1 refiere a la fracción de MIT transformada en DIT y F2 a la fracción de DIT transformada en MIT:

$$N_m^{MIT} = (N_s^{MIT} + N_{t1}^{MIT} + N_{t2}^{MIT}) \times (1 - F1) + (N_s^{DIT} + N_{t1}^{DIT} + N_{t2}^{DIT}) \times F2 \quad (15)$$

$$N_m^{DIT} = (N_s^{DIT} + N_{t1}^{DIT} + N_{t2}^{DIT}) \times (1 - F2) + (N_s^{MIT} + N_{t1}^{MIT} + N_{t2}^{MIT}) \times F1 \quad (16)$$

Estas nuevas ecuaciones se pueden transformar en fracciones molares (x) para cada isotópologo ($x_s=N_s/N_m$, $x_{t1}=N_{t1}/N_m$ y $x_{t2}=N_{t2}/N_m$) usando balances de masas parciales de las ecuaciones (15) y (16), lo que generaría las ecuaciones (17), (18) y (19) para MIT y (20), (21) y (22) para DIT:

$$x_s^{MIT} = \frac{N_s^{MIT}(1-F1)+N_s^{DIT}F2}{N_m^{MIT}} \quad (17)$$

$$x_{t1}^{MIT} = \frac{N_{t1}^{MIT}(1-F1)+N_{t1}^{DIT}F2}{N_m^{MIT}} \quad (18)$$

$$x_{t2}^{MIT} = \frac{N_{t2}^{MIT}(1-F1)+N_{t2}^{DIT}F2}{N_m^{MIT}} \quad (19)$$

$$x_s^{DIT} = \frac{N_s^{DIT}(1-F2)+N_s^{MIT}F1}{N_m^{DIT}} \quad (20)$$

$$x_{t1}^{DIT} = \frac{N_{t1}^{DIT}(1-F2)+N_{t1}^{MIT}F1}{N_m^{DIT}} \quad (21)$$

$$x_{t2}^{DIT} = \frac{N_{t2}^{DIT}(1-F2)+N_{t2}^{MIT}F1}{N_m^{DIT}} \quad (22)$$

La composición isotópica medida para cada compuesto se expresa como una función de tres perfiles isotópicos, el del compuesto natural, el del compuesto marcado en ^{15}N y el del compuesto marcado en $^{13}\text{C}_2$ como se describe en las ecuaciones (23) y (24). Así, se pueden obtener los sistemas de ecuaciones descritos en (15) y (16) para MIT y DIT, respectivamente, y, tal y como se ha detallado previamente, al aplicar una regresión lineal múltiple se obtiene seis fracciones molares (3 para MIT y 3 para DIT), las cuales se emplearían para resolver las ecuaciones (17) a (22).

$$\begin{bmatrix} A_1^{m,MIT} \\ A_2^{m,MIT} \\ A_3^{m,MIT} \\ A_4^{m,MIT} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1^{s,MIT} & A_1^{t1,MIT} & A_1^{t2,MIT} \\ A_2^{s,MIT} & A_2^{t1,MIT} & A_2^{t2,MIT} \\ A_3^{s,MIT} & A_3^{t1,MIT} & A_3^{t2,MIT} \\ A_4^{s,MIT} & A_4^{t1,MIT} & A_4^{t2,MIT} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^{MIT} \\ x_{t1}^{MIT} \\ x_{t2}^{MIT} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \end{bmatrix} \quad (23)$$

$$\begin{bmatrix} A_1^{m,DIT} \\ A_2^{m,DIT} \\ A_3^{m,DIT} \\ A_4^{m,DIT} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1^{s,DIT} & A_1^{t1,DIT} & A_1^{t2,DIT} \\ A_2^{s,DIT} & A_2^{t1,DIT} & A_2^{t2,DIT} \\ A_3^{s,DIT} & A_3^{t1,DIT} & A_3^{t2,DIT} \\ A_4^{s,DIT} & A_4^{t1,DIT} & A_4^{t2,DIT} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^{DIT} \\ x_{t1}^{DIT} \\ x_{t2}^{DIT} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \end{bmatrix} \quad (24)$$

En las ecuaciones (23) y (24), A_i^s , A_i^{t1} y A_i^{t2} son las distribuciones isotópicas para cada compuesto en las 4 masas medidas. La distribución isotópica de los fragmentos moleculares, A_i^m , se midieron a 4 masas diferentes usando las transiciones para MIT y DIT que se detallan en la Tabla 3, integrando las áreas de los picos cromatográficos correspondientes y dividiendo cada área de pico por la suma de las áreas de las 4 transiciones SRM. Una vez se han calculado las fracciones molares, los factores de interconversión F1 y F2 se pueden calcular dividiendo las ecuaciones (18) y (19) para MIT y (21) y (22) para DIT. De esa forma, se obtienen las ecuaciones (25) y (26), donde las únicas incógnitas son F1 y F2:

$$F1(x_{t2}^{MIT} N_{t1}^{MIT} - x_{t1}^{MIT} N_{t2}^{MIT}) + F2(x_{t1}^{MIT} N_{t2}^{DIT} - x_{t2}^{MIT} N_{t1}^{DIT}) = (x_{t2}^{MIT} N_{t1}^{MIT} - x_{t2}^{MIT} N_{t1}^{DIT}) \quad (25)$$

$$F1(x_{t2}^{DIT} N_{t1}^{MIT} - x_{t1}^{DIT} N_{t2}^{MIT}) + F2(x_{t1}^{DIT} N_{t2}^{DIT} - x_{t2}^{DIT} N_{t1}^{DIT}) = (x_{t1}^{DIT} N_{t2}^{DIT} - x_{t2}^{DIT} N_{t1}^{DIT}) \quad (26)$$

Es importante resaltar que estas dos ecuaciones se simplifican notablemente cuando los trazadores empleados son puros, ya que $N_{t2}^{MIT}=0$ y $N_{t1}^{DIT}=0$. Una vez se calculan los factores F1 y F2, las cantidades de MIT y DIT corregidas con la posible interconversión se calculan dividiendo las ecuaciones (17) y (18) para MIT y (20) y (22) para DIT, de tal forma que de las dos ecuaciones con dos incógnitas finales N_s^{MIT} y N_s^{DIT} se obtienen las concentraciones corregidas de MIT y de DIT:

$$N_s^{MIT} (1 - F1) + N_s^{DIT} F2 = \frac{x_s^{MIT}}{x_{t1}^{MIT}} (N_{t1}^{MIT} (1 - F1) + N_{t1}^{DIT} F2) \quad (27)$$

$$N_s^{MIT} F1 + N_s^{DIT} (1 - F2) = \frac{x_s^{DIT}}{x_{t2}^{DIT}} (N_{t2}^{DIT} (1 - F2) + N_{t2}^{MIT} F1) \quad (28)$$

Adicionalmente, estas ecuaciones se reducen a la ecuación convencional de la Dilución Isotópica cuando los factores de interconversión son cero, tal como se puede observar en las ecuaciones (17) y (18):

$$N_s^{MIT} = \frac{X_s^{MIT}}{X_{t1}^{MIT}} N_{t1}^{MIT} \quad (29)$$

$$N_s^{DIT} = \frac{X_s^{DIT}}{X_{t2}^{DIT}} N_{t2}^{DIT} \quad (30)$$

Para convertir el número de moles N_s a concentraciones C_s se deben tener en cuenta los pesos tomados y los pesos moleculares de los compuestos, tal como se ha descrito previamente en la introducción.

I. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. 4.1. Síntesis y purificación de tirosinas marcadas

Durante el desarrollo de este trabajo no estaban comercialmente disponibles patrones de MIT y DIT marcados isotópicamente. Por ello, se llevó a cabo su síntesis empleando la yodación de tirosina marcada. La reacción de yodación de anillos aromáticos a temperatura ambiente requiere el uso de reactivos específicos como el IPy₂BF₄. Los esquemas de reacción para la síntesis de ¹⁵N-MIT y de ¹³C₂-DIT se presenta en la Figura 3.

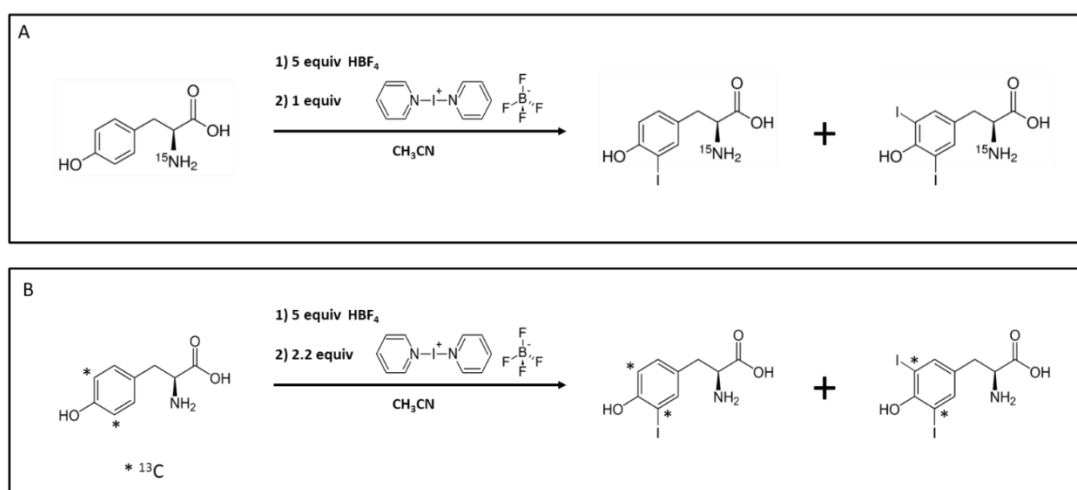


Figura 3. Esquemas de reacción para la síntesis de A) ¹⁵N-MIT y B) ¹³C₂-DIT

Para la síntesis de ¹³C₂-DIT se empleó un exceso de agente yodante para garantizar que no quedara ¹³C₂-tirosina sin reaccionar y evitar la formación del producto monoyodado (¹³C₂-MIT), lo que conduce a un elevado rendimiento de la reacción (71%). La purificación se llevó a cabo empleando una precipitación a pH 4,30 que se corresponde con el punto isoeléctrico del DIT. En la Figura 4 se presentan los cromatogramas obtenidos por MS en modo SCAN antes y después de la purificación. La relación entre las áreas de pico de MIT y DIT disminuyó desde 1:60 a 1:90 después de la purificación.

Por otro lado, la reacción de yodación de la ¹⁵N-tirosina para obtener la ¹⁵N-MIT presentó un rendimiento de reacción menor (44%), ya que el control de la formación del producto diyodado se basa en la velocidad de agitación y de adición del reactivo yodante, el cual se usó en una cantidad estequiométrica 1:1. La relación de áreas de pico MIT:DIT tras la reacción fue 3:2. En este caso se llevó a cabo una purificación por cromatografía preparativa, al haber requerido la precipitación de MIT oscuridad y varios meses a 4 °C. Tras la purificación, el ratio MIT:DIT en el producto final obtenido fue de 1:350. En la Figura 4 se presentan los cromatogramas obtenidos

por MS en modo SCAN antes y después de la purificación del crudo de la síntesis $^{13}\text{C}_2$ -DIT mientras que en la Figura 5 se presentan los cromatogramas obtenidos por MS en modo SCAN antes y después de la purificación del crudo de la síntesis de ^{15}N -MIT. La Figura 6 muestra una imagen de los productos sólidos obtenidos en su forma cristalina.

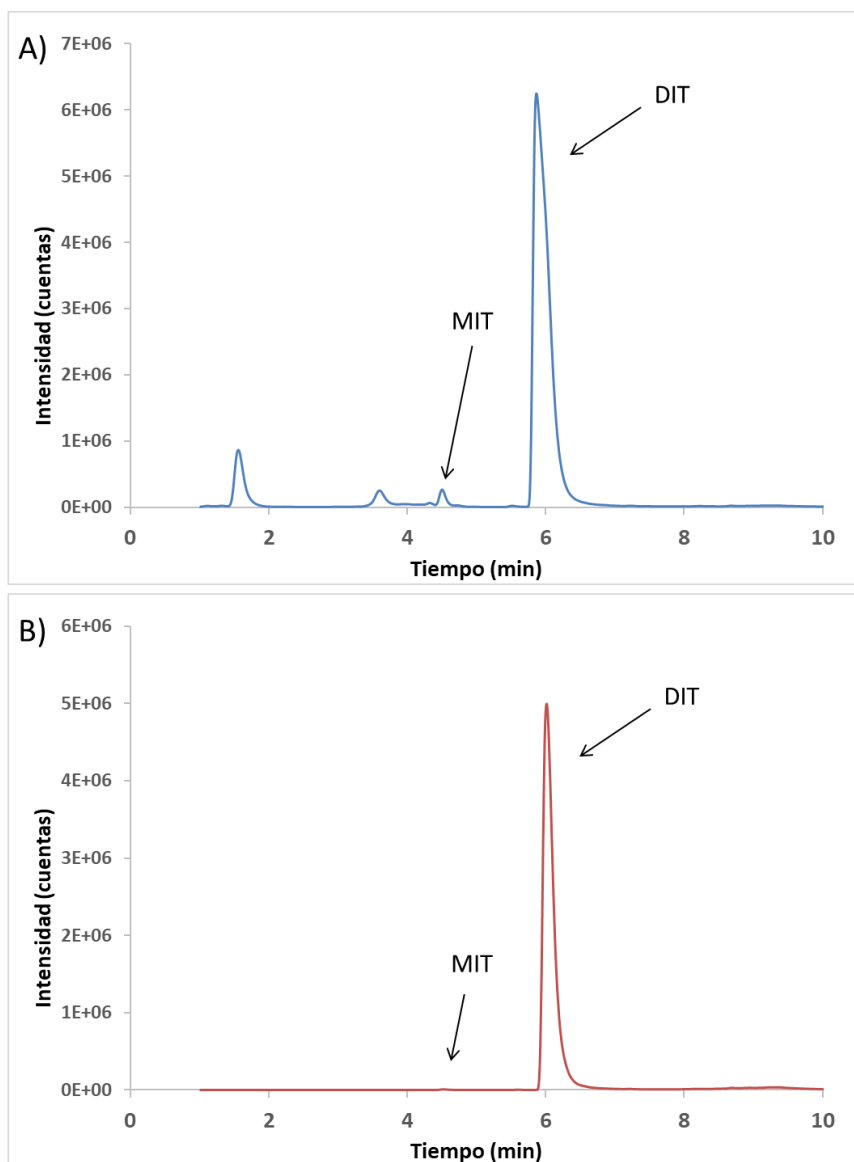


Figura 4. Cromatograma LC-ESI-MS en modo SCAN del producto de síntesis $^{13}\text{C}_2$ -DIT (A) antes y (B) después de su purificación.

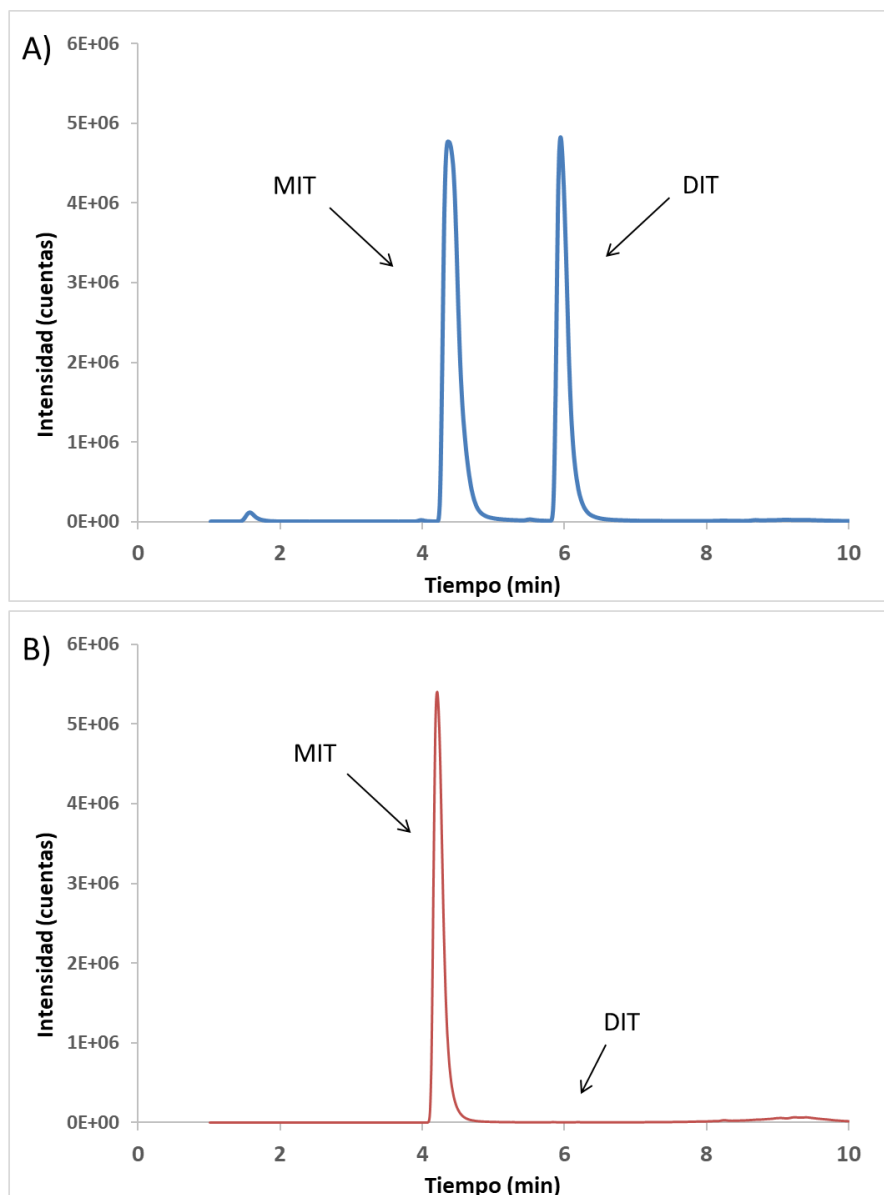


Figura 5. Cromatograma LC-ESI-MS en modo SCAN del producto de síntesis ^{15}N -MIT (A) antes y (B) después de su purificación.

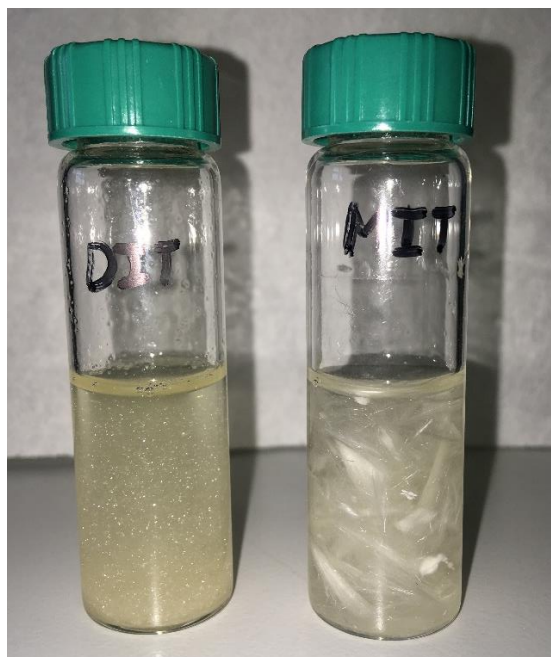


Figura 6. Imagen de viales conteniendo DIT y MIT en estado sólido.

I. 4.2. Medida de la composición isotópica de MIT y DIT mediante HPLC-ESI-MS/MS

Con las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 2, los tiempos de retención para creatinina, MIT y DIT fueron 0,5, 7,8 y 8,8 minutos, respectivamente. Se utilizó el valor de creatinina para normalizar los valores de las concentraciones de MIT y DIT medidas en muestras de orina líquida y de orina impregnada. Se seleccionó el ion molecular protonado $[M+H]^+$ como ion precursor para los tres compuestos debido a su elevada intensidad. Los iones producto $[(M+H)-102]^+$, provenientes de la pérdida de C_4H_8 , H_2O y CO por disociación inducida por colisión (CID), se seleccionaron tanto para MIT como DIT debido a su elevada intensidad. Por otro lado, el ion producto más abundante para la creatinina fue la pérdida de CO . Las energías de colisión y el voltaje del “fragmentor” fueron 5 V y 135 V para MIT, y 10 V y 135 V para DIT. Todos los parámetros instrumentales del espectrómetro de masas se detallan en la Tabla 3.

La medida de la composición isotópica de compuestos de abundancia natural se estudió inyectando $1 \mu g g^{-1}$ de las disoluciones de cada compuesto. Los resultados experimentales obtenidos se compararon con las distribuciones isotópicas teóricas obtenidas para las transiciones MRM seleccionadas empleando el software IsoPatrn®³¹. En la Tabla 5 se puede comprobar que los valores experimentales coinciden con los valores teóricos salvo en la transición 490-388 de $^{13}C_2$ -DIT debido a una impureza del producto natural que aparece en los sucesivos análisis, por lo que, para DIT, a la hora de hacer los ajustes se emplearon los valores experimentales, ya que emplear los teóricos induciría a un error en la determinación.

Tabla 5. Comparación de las distribuciones isotópicas teóricas y experimentales para MIT y DIT naturales y marcados.

Compuesto	Transición	Valor teórico	Valor experimental	Desviación estándar (n=5)
MIT	364→262	0,91104	0,91142	0,00016
	365→263	0,08345	0,08311	0,00017
	366→264	0,00521	0,00526	0,00003
	367→264	0,00025	0,00025	0,00000
¹⁵ N-MIT	364→262	0,00823	0,00777	0,00006
	365→263	0,90686	0,90900	0,00050
	366→264	0,07973	0,07838	0,00047
	367→265	0,00494	0,00485	0,00012
DIT	490→388	0,91115	0,91164	0,00034
	491→389	0,08335	0,08287	0,00032
	492→390	0,00525	0,00524	0,00001
	493→391	0,00025	0,00024	0,00000
¹³ C ₂ -DIT	490→388	0,00008	0,02132	0,00024
	491→389	0,01668	0,01885	0,00018
	492→390	0,91906	0,90019	0,00048
	493→391	0,06418	0,05963	0,00034

I. 4.3. Cálculo del enriquecimiento isotópico, concentración y pureza de ¹⁵N-MIT y ¹³C₂-DIT

El uso de IDMS y regresión lineal múltiple permite la determinación de los analitos sin recurrir a un calibrado metodológico. Sin embargo, esta metodología requiere la caracterización previa de los patrones marcados. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un procedimiento para determinar el enriquecimiento isotópico de moléculas basado en la medida de la distribución isotópica obtenida empleando espectrometría de baja resolución. Para lograr esto, se inyectaron disoluciones individuales de los patrones marcados, a una concentración de 1 µg·g⁻¹, en el equipo (n=5). Los enriquecimientos isotópicos obtenidos para los productos sintetizados y purificados fueron 99,13 ± 0,06 % y 99,10 ± 0,02 % para ¹⁵N-MIT y ¹³C₂-DIT, respectivamente.

Por otro lado, la concentración de los patrones se calculó por dilución isotópica inversa usando compuestos de abundancia isotópica natural. Así mismo, la pureza de los productos sintetizados

se determinó midiendo las impurezas de ^{15}N -DIT en ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -MIT en $^{13}\text{C}_2$ -DIT. Los porcentajes obtenidos fueron 0,07% (p/p) y 1,32% (p/p) para ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT, respectivamente. Estos valores se tuvieron en cuenta en los cálculos IDMS con trazador doble, tal y como se indica en las ecuaciones de la Sección I. 3.3.4.

I. 4.4. Estudios de estabilidad de MIT y DIT en disolución

Algunos estudios previos realizados por otros autores han demostrado la degradación de moléculas con yodo y sugieren el empleo de antioxidantes para prevenir tal efecto^{27,28}. Recientemente, Hansen *et al.*¹⁴ describieron la degradación de diferentes metabolitos tiroideos a diferentes pH, así como su degradación fotolítica. Sin embargo, Richards *et al.*¹⁵ demostraron la estabilidad de estos compuestos detrás varias etapas de congelación y descongelación. No obstante, la estabilidad de MIT y DIT no ha sido estudiada hasta la fecha. Para solventar esta situación se realizó un experimento de dilución isotópica inversa con el fin de determinar la concentración de ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT en disoluciones almacenadas bajo diferentes condiciones con el fin de evaluar su posible comercialización. El primer experimento consistió en un estudio de estabilidad acelerado de disoluciones individuales de los patrones marcados de $1\ \mu\text{g g}^{-1}$ a diferentes pH, de acuerdo con la guía 111 de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD).

El estudio de estabilidad consistió en medir por triplicado la concentración de las disoluciones tamponadas a pH 4, 7 y 9 y almacenadas a una temperatura de 50°C y oscuridad durante 5 días. Para el ajuste del pH se emplearon disoluciones reguladoras compatibles con la fuente ESI: formato amónico 10 mM, bicarbonato amónico 10 mM y acetato amónico 10 mM. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7. Los valores obtenidos se presentan como el porcentaje de la concentración medida con respecto a la concentración inicial ($t=0$). Como se puede observar, en todos los casos se observó una disminución entre el 10 y el 20% con respecto a la concentración inicial. Además, estos resultados concuerdan con los publicados por Hansen *et al.*, al observarse una mayor degradación de DIT en medio ácido.

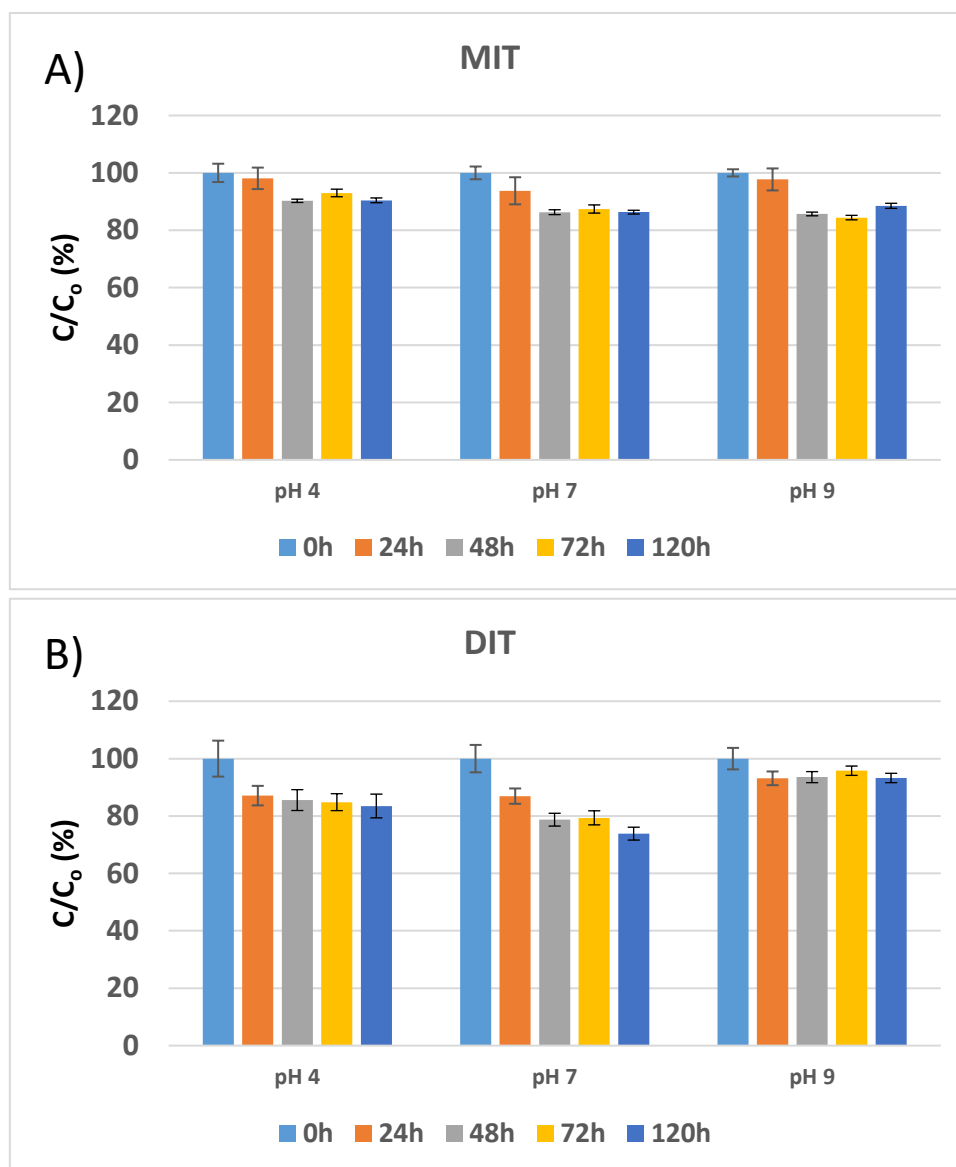


Figura 7. Porcentaje de la concentración medida con respecto a la concentración inicial ($t=0$) para A) MIT y B) DIT en disoluciones de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT tamponadas a pH 4, 7 y 9, almacenadas a 50°C en oscuridad y medidas por triplicado durante 5 días.

Por último, se estudió la estabilidad a largo plazo (6 meses) de disoluciones individuales de ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT ($1 \mu\text{g}/\text{g}$) en 0,1 % ácido fórmico y almacenadas a 4°C y en oscuridad a lo largo de 180 días. Los resultados se presentan en la Figura 8. Con el fin de poder comparar mejor los resultados se representa en el eje de ordenadas la relación en porcentaje entre la concentración medida en cada momento y la concentración inicial. Como se puede observar, los resultados variaron entre un 93 y un 104% a lo largo de todo el proceso, indicando que las disoluciones de los patrones eran estables, al menos durante 6 meses, cuando se conservaban tal como se ha indicado.

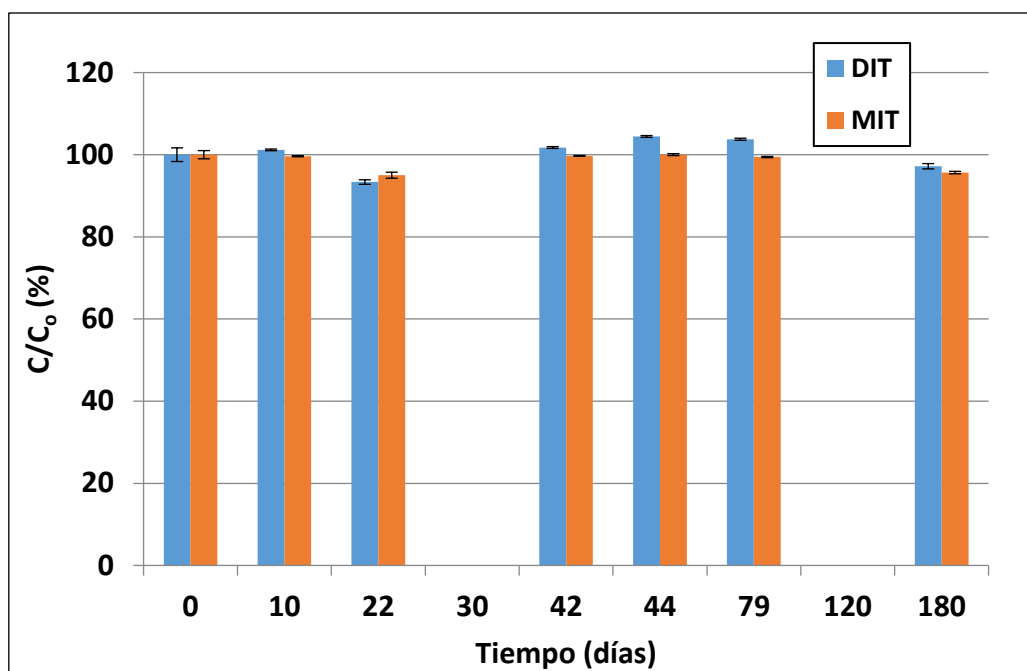


Figura 8. Porcentaje de la concentración medida con respecto a la concentración inicial ($t=0$) para MIT y DIT de disoluciones individuales de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ^{15}N -MIT y $^{13}\text{C}_2$ -DIT en ácido fórmico 0.1% almacenadas a 4°C y en oscuridad a lo largo de 180 días.

I. 4.5. Efectos de matriz en la determinación de MIT y DIT en muestras de orina por LC-MS/MS

Los efectos de matriz en la fuente ESI se estudiaron para cada compuesto evaluando el efecto de la cantidad inicial de orina empleada, el volumen de inyección y el contenido en creatinina.

Para la evaluación de la cantidad inicial de muestra se añadieron 50 ng de MIT y DIT sobre 2 mL de orina con una concentración de $1,3 \text{ mg g}^{-1}$ de creatinina. De esta muestra se tomaron diferentes cantidades (50, 100, 200 y 250 mg) y se analizaron de acuerdo con procedimiento ya descrito empleando un volumen de inyección de $1 \mu\text{L}$. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9. Como se puede observar, a partir de 200 mg de orina se observa una supresión en la señal de los analitos.

Para el siguiente experimento se tomaron 200 mg de esta disolución de orina fortificada en MIT y DIT, se preparó tal como se ha descrito previamente y se inyectaron diferentes volúmenes (1, 2, 5, 10 y $20 \mu\text{L}$). La variación de señales obtenida se presenta en la Figura 10. Como se puede observar, para 10 y $20 \mu\text{L}$ se obtuvieron señales similares alcanzándose una meseta. Por ello, se decidió tomar $10 \mu\text{L}$ como volumen óptimo, ya que un volumen mayor no supone un incremento de la señal, pero sí un incremento en la matriz introducida en la fuente lo que puede afectar al funcionamiento de la fuente ESI en secuencias largas de análisis.

Finalmente, se estudió el efecto de dilución de la muestra en la señal. Para ello se prepararon 5 diluciones de la muestra inicial de 200 mg: sin dilución, dilución 1:1, dilución 1:2, dilución 1:5, dilución 1:10 y dilución 1:24. Todas estas disoluciones se fortificaron con la cantidad suficiente de MIT y DIT para tener una concentración de $2,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ tras la dilución. Se utilizó un volumen de inyección de $10 \mu\text{L}$ y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11. En ella se puede comprobar que las señales obtenidas por LC-ESI-MSMS para MIT y DIT aumentan con el factor de dilución. Este resultado demuestra el efecto que tiene la matriz en la supresión de la ionización en la fuente de ionización, lo que justifica sobradamente la necesidad de utilizar compuestos análogos marcados isotópicamente a los que se va a determinar para compensar los efectos de matriz, tal como se demostrará en las siguientes secciones.

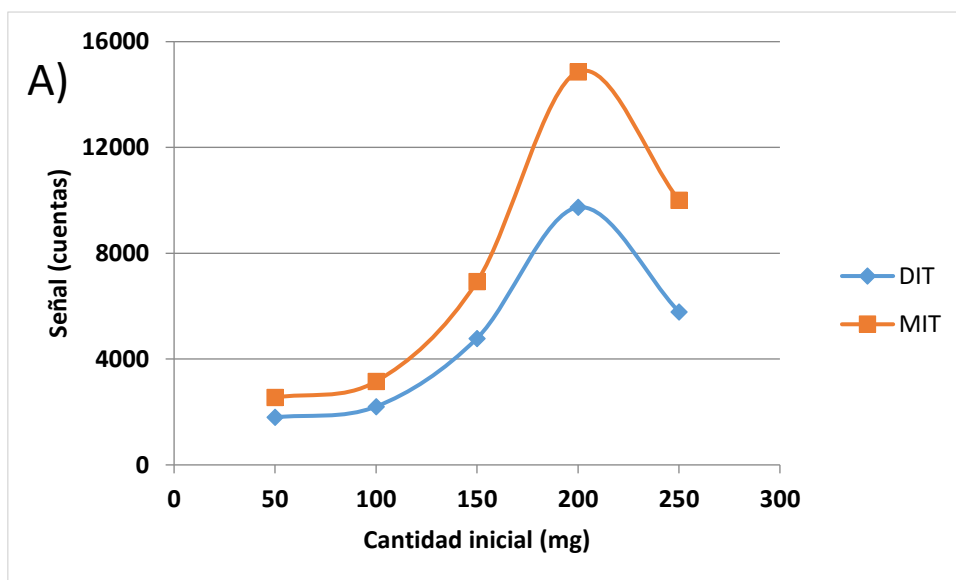


Figura 9. Variación de la señal de MIT y DIT obtenida por LC-ESI-MS/MS con la cantidad de muestra inicial.

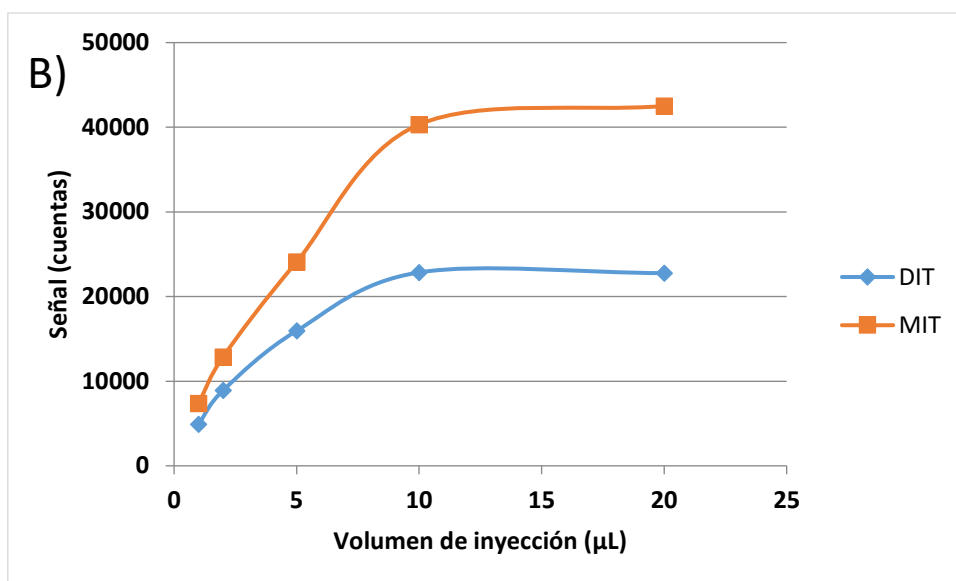


Figura 10. Variación de la señal de MIT y DIT obtenida por LC-ESI-MS/MS con el volumen de inyección.

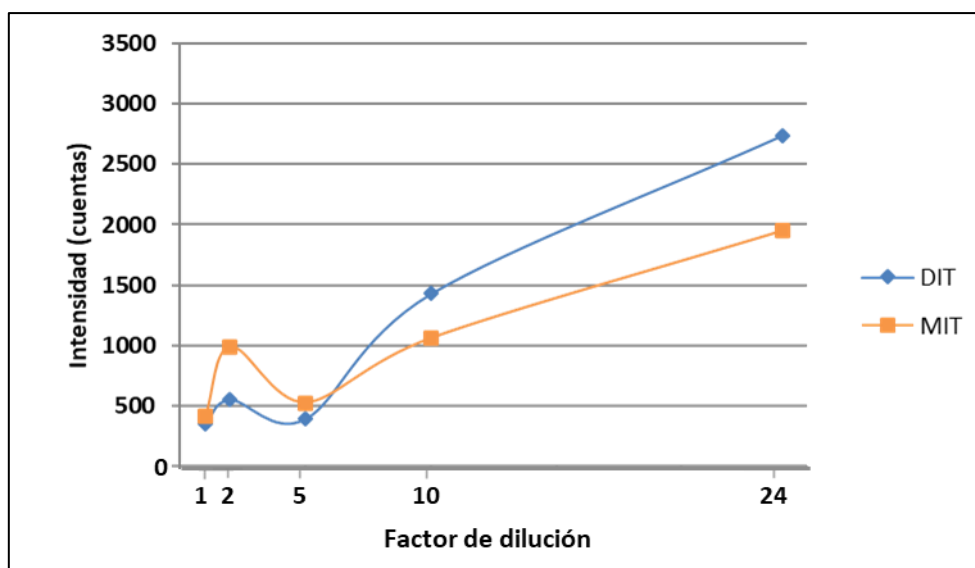


Figura 11. Variación de la señal de MIT y DIT obtenida por LC-ESI-MS/MS con el factor de dilución de la muestra.

I. 4.6. Estudios de recuperación para el análisis de muestras líquidas.

Se realizaron estudios de recuperación empleando una misma muestra de orina humana a partir de la cual se prepararon diluciones 1:2, 1:5, 1:10 y 1:24. Estas disoluciones se fortificaron con MIT y DIT a tres diferentes niveles de concentración (0,25, 0,625 y 1,25 ng·g⁻¹) y se analizaron según se describe en la sección 3.3.2. Los resultados obtenidos se procesaron empleando las ecuaciones de la Dilución Isotópica sencilla y múltiple, con el fin de comparar ambos métodos.

Los resultados obtenidos para las diferentes fortificaciones y factores de dilución ensayados se presentan en la Tabla 6. Los valores de recuperación globales se obtuvieron como la pendiente de la curva obtenida al representar la concentración añadida obtenida experimentalmente frente a la concentración teórica añadida. Así mismo, las cantidades endógenas de MIT y DIT en la muestra sin diluir se obtuvieron a partir de los factores de dilución y de la ordenada en el origen. Para la muestra sin diluir (1,3 mg creatinina/g orina) se obtuvo, en promedio, 2,0 ng·g⁻¹ de MIT y 0,50 ng·g⁻¹ de DIT. Como se puede observar en la Tabla 6 los valores de recuperación se pueden considerar satisfactorios para todas las diluciones ensayadas salvo para la determinación de MIT en la muestra sin diluir. Además, aparentemente no hay diferencias en los resultados obtenidos al emplear la dilución isotópica sencilla o doble, a excepción de la determinación de MIT en la muestra sin diluir, donde se observa un factor de desyodación de DIT (F1, formación de ¹³C₂-MIT) cercano al 20%. Por otro lado, no se observó yodación de MIT (F2, formación de ¹⁵N-DIT) en ninguna de las muestras. Esto era de esperar puesto que las reacciones de yodación no suelen ocurrir de forma espontánea en la naturaleza.

Adicionalmente, es importante resaltar que los valores de recuperación obtenidos en la orina sin diluir son probablemente debidos a que la concentración endógena de MIT en la muestra sin diluir (2,0 ng·g⁻¹) era demasiado alta para las adicciones empleadas (0,25, 0,625 y 1,25 ng·g⁻¹), ya que la incertidumbre de la pendiente es de un 20%, tanto para el cálculo por dilución isotópica sencilla como doble. Para un factor de dilución de 2 la incertidumbre disminuye, aunque sigue siendo alta (8-10%). Dado que el factor de desyodación F1 empieza a ser ya importante para un factor de dilución 2 (3,7%), se decidió no repetir los experimentos empleando cantidades de MIT superiores. En su lugar, dada la elevada concentración de creatinina en la muestra sin diluir, se optó por recomendar una dilución 1:5 de la muestra con el fin de obtener recuperaciones cuantitativas y evitar que ocurran reacciones de interconversión. Del mismo modo, esta recomendación implica que las concentraciones pueden ser determinadas a través de un cálculo de dilución isotópica sencilla sin necesidad de corregir interconversiones, poco probables bajo las condiciones ensayadas.

Tabla 6. Valores de recuperación obtenidos en el análisis de muestras de orina líquida fortificadas a 0,25, 0,625 y 1,25 ng·g⁻¹ de MIT y DIT con diferentes factores de dilución y factores de interconversión promedio F1 (% de desyodación de DIT) y F2 (% de yodación de MIT) obtenidos mediante dilución isotópica doble. Los valores de incertidumbre se corresponden con el error de la pendiente del ajuste de las concentraciones encontradas frente a las concentraciones añadidas.

Cálculo	Factor de dilución	Recuperación MIT (%)	Recuperación DIT (%)	F1 (%) DIT→MIT	F2 (%) MIT→DIT
IDMS sencillo	24	99,7 ± 0,7	98,6 ± 1,2	----	----
	10	102,2 ± 1,3	105,0 ± 1,9	----	----
	5	102,5 ± 1,6	97,2 ± 4,3	----	----
	2	88,8 ± 8,2	88,7 ± 1,7	----	----
	Sin diluir	33,9 ± 20,6	90,0 ± 8,4	----	----
IDMS doble trazador	24	102,7 ± 4,2	97,6 ± 9,6	-3,6	0,9
	10	104,5 ± 0,9	95,2 ± 3,9	-2,7	1,0
	5	101,5 ± 1,3	98,0 ± 3,8	-0,6	-4,7
	2	87,4 ± 10,2	92,7 ± 4,2	3,7	-0,4
	Sin diluir	43,0 ± 18,7	94,0 ± 4,9	18,7	-0,3

I. 4.7. Estudios de recuperación para el análisis de orina impregnada en tiras de papel (DUS)

En el análisis de DUS la cantidad de muestra tomada depende de la cantidad y la distribución de la orina impregnada en la superficie del papel, así como del número y las dimensiones de los puntos (en inglés *spots*) tomados para el análisis. Por lo tanto, los valores de concentración de MIT y DIT en los DUS requieren ser expresados siempre de forma relativa al contenido de creatinina, ya que la cantidad exacta de orina tomada de la muestra es desconocida y variable. Por otro lado, el contenido de la matriz en las muestras extraídas de DUS es mucho menor que en la muestra de orina original debido al efecto de dilución del proceso de extracción y de la propia extracción de matriz por parte de la celulosa del material.

Para los estudios de estabilidad se emplearon dos orinas de recién nacidos fortificadas con MIT y DIT a tres diferentes niveles de concentración entre 0,15 y 0,9 ng g⁻¹. Una vez impregnados los papeles con las muestras fortificadas se secaron en oscuridad, durante 3h a temperatura ambiente antes de su posterior extracción utilizando el protocolo descrito en la sección de procedimientos. La principal diferencia con el método descrito para muestras líquidas es que los patrones marcados sólo pueden ser añadidos a la muestra líquida tras la extracción de los compuestos naturales de las tiras de papel. La Figura 12 muestra un cromatograma representativo para una muestra de DUS fortificada con 0,60 ng g⁻¹ de MIT y DIT. Como se puede observar, en las tres transiciones monitorizadas para cada compuesto se obtienen relaciones señal-ruido suficientemente altas como para su correcta integración. Por otro lado, la Tabla 7 muestra los valores de recuperación obtenidos para el análisis de DUS usando los dos procedimientos de cálculo previamente descritos. Para este experimento se emplearon dos muestras conteniendo 1,4 y 2,7 ng de MIT por mg de creatinina y 3,1 y 5,0 ng de DIT por mg de creatinina. Como se puede

observar, las recuperaciones obtenidas se encuentran entre 104 y 132 % para ambos cálculos y para las dos muestras estudiadas. Por lo general, se obtuvieron valores ligeramente mejores empleando el cálculo de IDMS sencillo. Así mismo, los factores de interconversión obtenidos fueron cercanos a cero en todos los casos (en la Tabla 7 se muestran valores promedios), lo que significa que para las muestras de DUS no hay interconversión de ningún tipo, lo cual era de esperar teniendo en cuenta los resultados para la orina líquida y la influencia de la matriz en los resultados.

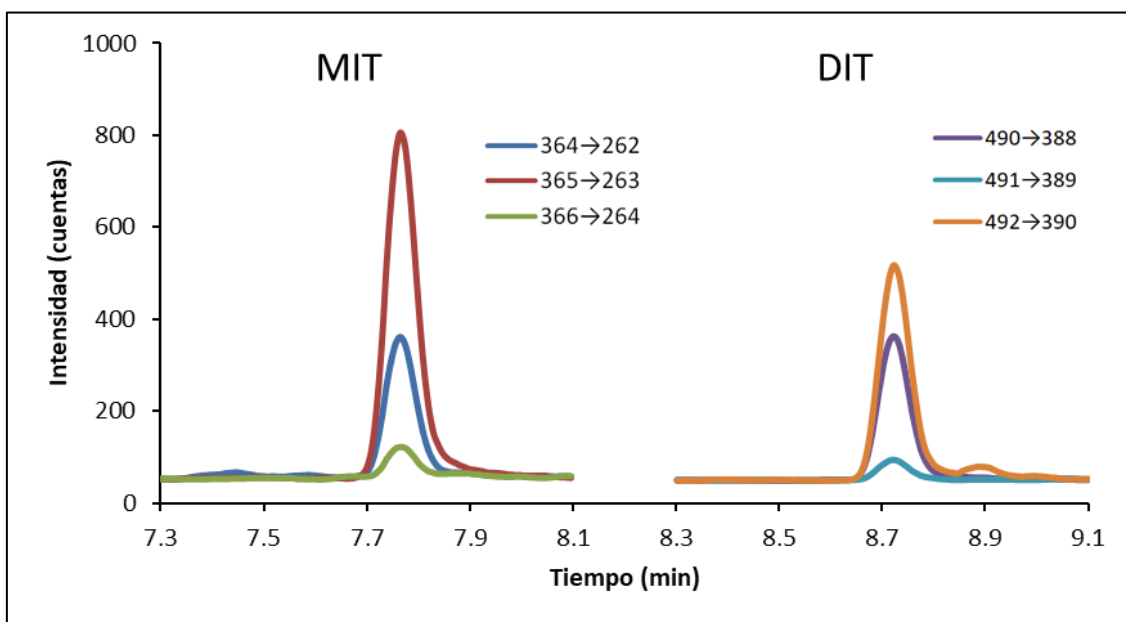


Figura 12. Cromatograma LC-MS/MS adquirido en modo MRM para una muestra artificial de DUS fortificada con $0,60 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ de MIT y de DIT en la muestra original de orina líquida

Tabla 7. Valores de recuperación obtenidos en el análisis de dos muestras de DUS fortificadas en MIT y DIT en concentraciones entre $0,15$ y $0,90 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ y factores de interconversión promedio F1 y F2 obtenidos en el cálculo de doble Dilución Isotópica. Los valores de incertidumbre se corresponden con el error de la pendiente del ajuste de la concentración encontrada frente a la concentración añadida.

Cálculo	Creatinina en el extracto ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Recuperación MIT (%)	Recuperación DIT (%)	F1 (%) DIT→MIT	F2 (%) MIT→DIT
IDMS sencillo	45,5	$112,9 \pm 3,6$	$104,9 \pm 6,2$	-----	-----
	85,6	$113,1 \pm 7,7$	$131,6 \pm 17,9$	-----	-----
IDMS doble trazador	45,5	$117,6 \pm 4,2$	$104,1 \pm 6,1$	-5,0	0,0
	85,6	$120,9 \pm 8,2$	$132,7 \pm 18,6$	-4,0	0,0

I. 4.8. Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección (LOD) se calcularon como tres veces la desviación estándar de seis blancos de agua empleando el procedimiento descrito para las muestras de orina, ya que no se pudieron obtener muestras de orina libres de MIT y DIT. Los límites de detección obtenidos empleando el cálculo de la Dilución Isotópica doble fueron 0,019 ng·g⁻¹ y 0,045 ng·g⁻¹ para MIT y DIT, respectivamente, mientras que empleando el cálculo de Dilución Isotópica sencilla se obtuvieron valores muy similares (0,018 ng·g⁻¹ y 0,046 ng·g⁻¹ para MIT y DIT, respectivamente). Por otro lado, los límites de cuantificación (LODs) se calcularon como diez veces la desviación estándar, obteniéndose valores de 0,06 y 0,015 ng·g⁻¹ para MIT y DIT, respectivamente.

Afink *et al.*⁶ obtuvieron LODs de 0,2 pmol·g⁻¹ para MIT y DIT en disoluciones acuosas, lo que corresponde a 0,061 y 0,087 ng·g⁻¹ para MIT y DIT, respectivamente⁶. Así mismo, Michlake *et al.*²³ obtuvieron valores ligeramente inferiores empleando LC-ICP-MS (0,19 y 0,17 pmol·g⁻¹ para MIT y DIT, respectivamente). Por lo tanto, el método desarrollado en esta Tesis Doctoral presenta LODs entre dos y tres veces inferiores a los publicados por estos otros autores.

Por otro lado, los límites de detección para los DUS se calcularon empleando seis muestras independientes de blancos. Estos experimentos se llevaron a cabo con muestras no impregnadas con orina, de acuerdo al procedimiento descrito previamente. Los valores para cada muestra se obtuvieron de tres inyecciones y el LOD se calculó como tres veces la desviación estándar de la concentración encontrada en los blancos (10 veces para el cálculo del LOQ). Para MIT el LOD y LOQ fueron 0,07 y 0,23 ng·g⁻¹, respectivamente, mientras que para DIT fueron 0,05 y 0,17 ng·g⁻¹, respectivamente.

I. 4.9. Análisis de orinas y DUS de neonato

El método analítico desarrollado y el cálculo de Dilución Isotópica convencional se aplicaron a la medida de 14 muestras pareadas como orina líquida y DUS. Las muestras provenían del programa de cribado neonatal del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y fueron tomadas los primeros días de vida de los recién nacidos y almacenadas a -20 °C hasta su determinación. Cabe destacar que este trabajo se ha llevado a cabo bajo los estándares éticos del CHUS y la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos para la investigación médica en la que intervienen seres humanos, lo cual incluye consentimiento informado en la toma de muestra y anonimizado de las muestras. Con el fin de comparar los resultados obtenidos en los dos tipos de muestras, los resultados se normalizaron utilizando el contenido de creatinina en las muestras de orina, de tal forma que los valores finales se encuentran como ng/mg creatinina. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 13. En ambos grupos de muestras se encontró MIT,

sin embargo, solo unas pocas muestras de DUS presentaron valores de DIT, con lo cual no fue posible la comparación de orina líquida frente a orina impregnada en tira de papel para DIT. En la muestra número 4 (Figura 13) se encontraron valores anormalmente altos de creatinina, tanto en la orina líquida como en los DUS, por lo que fue eliminada del estudio. Por último, como se puede observar en la Figura 13, si tenemos en cuenta las desviaciones de las tres réplicas de inyección, existe una muy buena correlación entre los valores de MIT obtenidos en orina líquida y DUS para todas las muestras. Cabe destacar que la incertidumbre de los resultados es relativamente alta debido a que cada valor proviene de dos medidas independientes, la del analito y la de creatinina.

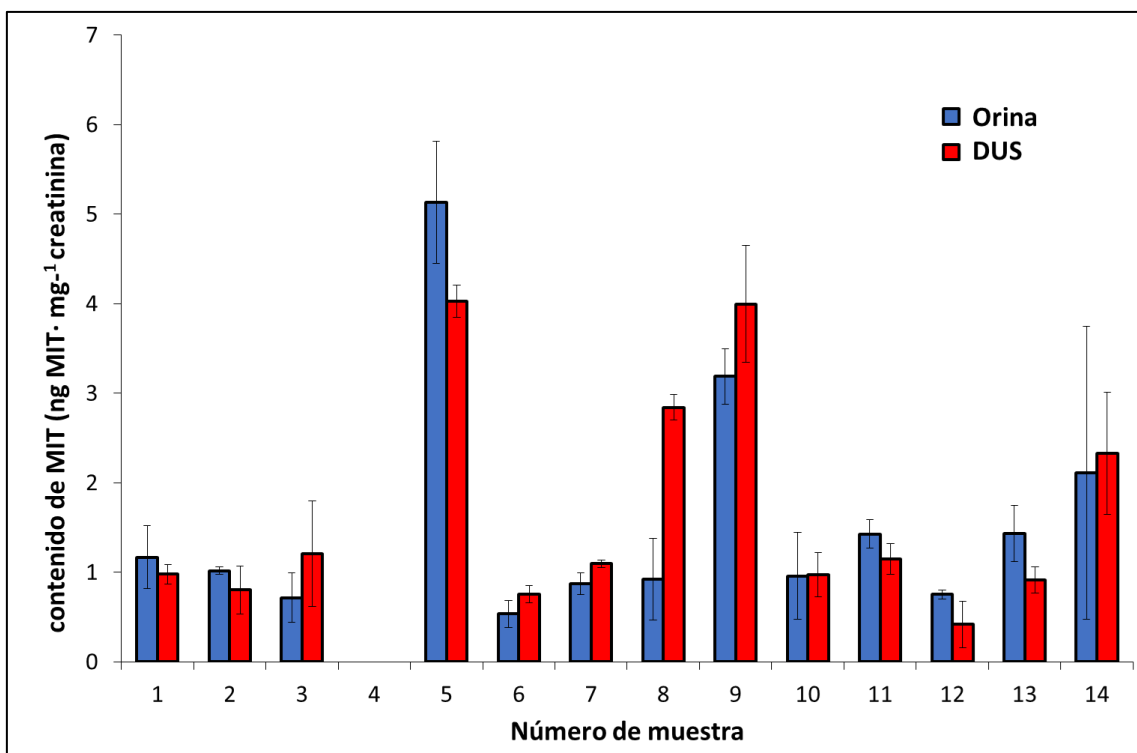


Figura 13. Resultados obtenidos en la determinación de MIT en 14 muestras pareadas como orina líquida y DUS. La concentración está normalizada frente a creatinina (ng MIT · mg⁻¹ creatinina) y las barras de error indican la desviación estándar de 3 medidas independientes.

I. 4.10. Repetibilidad y reproducibilidad en la determinación de MIT en DUS de neonato

Dado que el objetivo último de este método analítico es implementarlo en la determinación de MIT y DIT en cribado neonatal, se decidió llevar a cabo un estudio de repetibilidad y reproducibilidad en muestras de DUS. Para ello, se tomaron tres muestras de DUS con diferentes niveles de MIT y se estudió la repetibilidad (n=9 inyecciones), la reproducibilidad diaria (n=3 preparaciones e inyecciones independientes en el mismo día) y la reproducibilidad entre días. Los

resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8. Para las muestras más concentradas (DUS1 y DUS 2) la repetibilidad varió entre un 1 y 17 % (promedio 7%), mientras que la reproducibilidad diaria varió entre un 2 y un 13% (promedio 7,5 %). Sin embargo, la reproducibilidad entre días presentaba un valor promedio del 15%, siendo esta variable la mayor fuente de incertidumbre en el valor final. Por otro lado, la muestra DUS 3, al presentar un valor de MIT más bajo que el de las otras dos muestras, la incertidumbre en el valor obtenido es dos veces mayor que el de las otras dos muestras. Es importante resaltar que, de acuerdo con estudios previos^{6,7}, los niveles de MIT en personas con ITDD deberían ser unas 50 veces superiores a los de personas sin ninguna patología endocrina, por lo que, de acuerdo con la sensibilidad y variabilidad del método, el mismo debería de ser capaz de discernir entre personas con y sin ITDD.

Tabla 8. Repetibilidad y reproducibilidad diaria y entre días en la determinación de MIT en muestras de DUS. Para cada réplica se llevaron a cabo 3 inyecciones. La incertidumbre se corresponde con la desviación estándar de las tres medidas.

		DUS 1		DUS 2		DUS 3	
		Concentración (ng MIT mg ⁻¹ creatinina)	RSD (%)	Concentración (ng MIT mg ⁻¹ creatinina)	RSD (%)	Concentración (ng MIT mg ⁻¹ creatinina)	RSD (%)
	Réplica 1	4,40±0,62	13,9	5,05±0,65	12,9	0,92±0,14	15,2
Día 1	Réplica 2	4,32±0,11	2,8	4,10±0,35	8,7	1,14±0,19	15,9
	Réplica 3	4,80±0,05	1,0	4,97±0,16	3,5	1,66±0,22	13,8
	Promedio Día 1	4,51±0,27	5,8	4,70±0,52	11,2	1,25±0,38	30,4
	Réplica 1	5,18±0,27	5,1	4,97±0,11	2,4	1,28±0,05	3,8
Día 2	Réplica 2	4,45±0,54	12,3	3,85±0,14	3,6	1,06±0,11	11,3
	Réplica 3	4,59±0,49	10,9	4,15±0,19	4,9	1,14±0,16	14,4
	Promedio Día 2	4,75±0,38	8,1	4,32±0,57	13,3	1,17±0,11	9,4
	Réplica 1	3,37±0,19	5,7	3,66±0,14	3,4	0,87±0,14	14,1
Día 3	Réplica 2	3,50±0,11	3,3	3,94±0,65	16,6	0,65±0,11	21,4
	Réplica 3	3,39±0,19	5,2	3,64±0,33	8,9	0,95±0,11	12,1
	Promedio Día 3	3,42±0,05	2,0	3,75±0,16	4,6	0,84±0,14	17,9
	Promedio	4,23±0,65	15,5	4,26±0,57	13,6	1,09±0,27	26,1

I. 4.11. Determinación de MIT en DUS de recién nacidos

Hasta la fecha, y hasta donde conocemos, no se han publicado valores de MIT ni de DIT en muestras de DUS en recién nacidos. Por ello, en este estudio se midieron 38 muestras de DUS provenientes del programa de cribado neonatal del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela empleando el método desarrollado. Se desconoce si los donantes presentaban ITDD o no. Los resultados se presentan en la Figura 14. En todas las muestras se encontraron valores de MIT, mientras que solo en cuatro de ellas se encontró DIT. Así mismo, dos muestras fueron eliminadas del estudio por presentar valores de creatinina anormalmente bajos. La mediana de todos los valores fue 3,4 ng MIT/mg creatinina, con un rango total comprendido entre 0,4 y 26,4 ng MIT/mg creatinina. Los valores encontrados son cercanos a los empleados en la validación del método (Tabla 7 y 8). Estos resultados pueden dar una idea inicial de los niveles de MIT esperables en este tipo de muestras de recién nacidos, aunque la población no es lo suficientemente grande como para establecer niveles de referencia (control) y, así, estudiar la posible prevalencia de ITDD en recién nacidos.

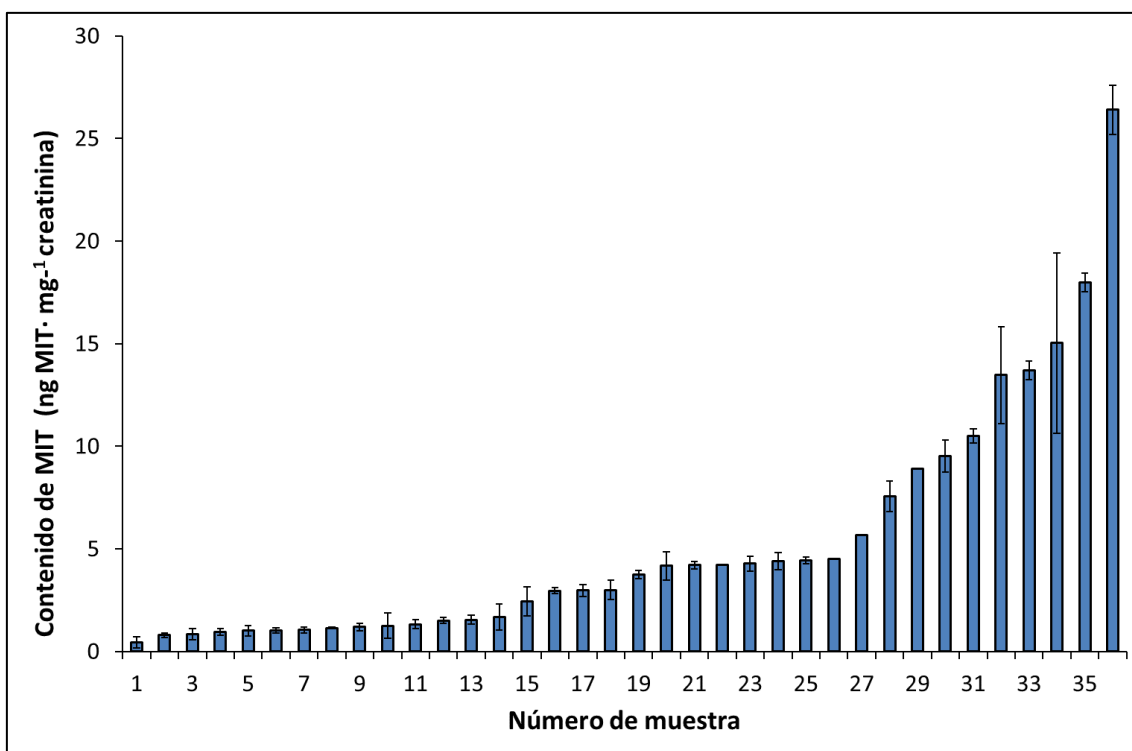


Figura 14. Concentraciones encontradas para MIT (ng MIT · mg⁻¹ creatinina) en muestras de orina impregnada en tiras de papel (DUS) de 36 recién nacidos, ordenadas por aumento de concentración. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 medidas independientes.

I. 5. CONCLUSIONES

El desarrollo de un procedimiento de preparación de muestra de orina y de orina impregnada en tira de papel, junto a un método de determinación por HPLC-MS/MS empleando los aminoácidos 3-monoyodotirosina y 3,5-diyodotirosina marcados isotópicamente ha permitido la cuantificación de estos analitos naturales en muestras de recién nacidos, presentando, por primera vez datos de concentraciones de MIT y DIT para estos individuos.

La metodología desarrollada demuestra que los valores de MIT obtenidos en orina y en DUS son similares y que pueden emplearse ambos tipos de muestras para llevar a cabo la determinación. Así mismo, para muestras de orina sin diluir se han observado transformaciones de DIT a MIT, aunque esta interconversión no ocurre en muestras diluidas ni en muestras de DUS. No obstante, esta interconversión es corregida a través del empleo de diferentes marcas isotópicas y del cálculo de Dilución Isotópica con doble trazador desarrollado por el grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral.

Por otro lado, los límites de detección obtenidos son mejores a los publicados previamente por otros autores y fueron lo suficientemente bajos como para determinar MIT en todas las muestras medidas. Sin embargo, para la mayoría de las muestras no se encontraron contenidos de DIT superiores al LOQ. Este hecho podría explicarse a través de una posible degradación de las muestras durante su conservación, pues no se trataba de muestras frescas, si no de muestras almacenadas durante meses e incluso años. Como se muestra en el estudio de estabilidad acelerada, hay una mayor degradación de DIT que de MIT en condiciones de pH ácido y neutro (orina), por lo que es esperable una mayor degradación del DIT a largo plazo.

En todo caso, es importante resaltar que los niveles de concentración de MIT y DIT esperables en personas con la patología ITDD serían mucho mayores a los recogidos en este trabajo, por lo que consideramos que esta metodología es válida para llevar a cabo un estudio poblacional.

I. 6. PUBLICACIÓN

Analyst



PAPER

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/d1an02203b

Determination of 3-monoiodotyrosine and 3,5-diiodotyrosine in newborn urine and dried urine spots by isotope dilution tandem mass spectrometry†

Jesús Nicolás Carcelén,^a Juan Manuel Marchante-Gayón,^a Pablo Rodríguez-González,^{a,*} Alfredo Ballesteros,^b José M. González,^b José Ángel Cocho de Juan^c and José Ignacio García Alonso^d

High levels of 3-mono- and 3,5-diiodotyrosine (MIT and DIT, respectively) in urine have been related to iodotyrosine dehalogenase 1 deficiency, a type of congenital hypothyroidism. However, the determination of MIT and DIT in urine is not included in newborn screening programs performed in clinical laboratories to detect inborn errors of metabolism. We report here on the development of an analytical method for the determination of MIT and DIT in newborn urine and dried urine spots (DUS) by Liquid Chromatography Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry (LC-IDMS/MS). The development included the synthesis of ¹⁵N-monoiodotyrosine and ¹³C₂-diiodotyrosine through the iodination of ¹⁵N-tyrosine and ¹³C₂-tyrosine, respectively, using bis(pyridine)iodonium(+) tetrafluoroborate (Py₂BF₄). Both labelled analogues were added at the beginning of the sample preparation procedure and used to develop both single- and double-spikes LC-IDMS methods for the determination of MIT and DIT. The developed double spike methodology was able to quantify and correct possible MIT ↔ DIT interconversions throughout the sample preparation, which was observed for concentrated urine samples but not for DUS. Suppression matrix effects on the absolute signals of MIT and DIT were observed in urine samples but did not affect the IDMS results as recoveries on urine samples at different dilution factors could be considered quantitative. Method detection limits were 0.026 and 0.046 ng g⁻¹ (limits of quantification 0.06 and 0.15 ng g⁻¹) by single-spikes IDMS, for MIT and DIT, respectively, in the analysis of urine samples and 0.07 and 0.05 ng g⁻¹ (limits of quantification 0.23 and 0.57 ng g⁻¹) for MIT and DIT, respectively, in the analysis of DUS. No significant differences were obtained for MIT concentrations in the analysis of the same newborn samples stored as liquid urine or DUS when the results were corrected for the creatinine content. Finally, 36 DUS samples from healthy newborns were analyzed and MIT was detected in all samples at low ng mg⁻¹-creatinine levels.

Received 5th December 2021

Accepted 4th March 2022

DOI: 10.1039/d1an02203b

nc/olm

Introduction

Congenital hypothyroidism is the most common preventable cause of intellectual disability. Newborn screening (NBS) programs typically measure the concentration of thyrotropin stimulating hormone (TSH) in blood by immunoassay methods¹

alone or in combination with the hormone thyroxine (T₄). Recently, a new type of congenital hypothyroidism was described² which can be missed by current NBS programs,^{3,4} iodotyrosine dehalogenase 1 deficiency (IYDD). This is a type of congenital hypothyroidism related to the failure of the thyroid enzyme iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1). This enzyme deiodinates 3-mono- and 3,5-diiodotyrosine (MIT and DIT, respectively) and recycles iodide for the efficient synthesis of thyroid hormones.⁵ Thus, mutations in the gene encoding DEHAL1 (IYD, OMIM #613028) result in iodide deficiency, which is associated with hypothyroidism, goit and childhood mental and developmental disorders.^{6–7} High levels of iodine in the form of MIT and DIT have been observed in patients with overt hypothyroidism due to DEHAL1 malfunction.^{8,9} For example, Aftink *et al.*⁸ found significantly higher concen-

^aDepartment of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, 33007 Oviedo, Spain. E-mail: p.rodriguez@uniovi.es

^bDepartment of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, 33007 Oviedo, Spain

^cLaboratory of Metabolic Diseases, Institute de Investigación Biomédica de Oviedo, 33700 Santiago, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1an02203b

I. 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Klein, S.; Heinzle, E. Isotope Labeling Experiments in Metabolomics and Fluxomics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2012**, *4* (3). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1167>.
- (2) P, van T.; A, S.; J, L.; T, R.; C, P.; L, F.; A, C.; C, H.; V, B.; J, P.; P, R.; R, C.; G, S.; P, M.; B, B.; D, L.; M, S.; L, de S.; M, V.; H, K.; L, P.; M, P. Congenital Hypothyroidism: A 2020-2021 Consensus Guidelines Update-An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. *Yearbook of Paediatric Endocrinology* **2021**. <https://doi.org/10.1530/ey.18.3.8>.
- (3) Targovnik, H. M.; Citterio, C. E.; Rivolta, C. M. Iodide Handling Disorders (NIS, TPO, TG, IYD). *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.03.006>.
- (4) Moreno, J. C.; Visser, T. J. Genetics and Phenomics of Hypothyroidism and Goiter Due to Iodotyrosine Deiodinase (DEHAL1) Gene Mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.03.010>.
- (5) Moreno, J. C.; Klootwijk, W.; van Toor, H.; Pinto, G.; D'Alessandro, M.; Lèger, A.; Goudie, D.; Polak, M.; Grüters, A.; Visser, T. J. Mutations in the Iodotyrosine Deiodinase Gene and Hypothyroidism. *New England Journal of Medicine* **2008**, *358* (17). <https://doi.org/10.1056/nejmoa0706819>.
- (6) Afink, G.; Kulik, W.; Overmars, H.; de Randamie, J.; Veenboer, T.; van Cruchten, A.; Craen, M.; Ris-Stalpers, C. Molecular Characterization of Iodotyrosine Dehalogenase Deficiency in Patients with Hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2008**, *93* (12). <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0865>.
- (7) Burniat, A.; Pirson, I.; Vilain, C.; Kulik, W.; Afink, G.; Moreno-Reyes, R.; Corvilain, B.; Abramowicz, M. Iodotyrosine Deiodinase Defect Identified via Genome-Wide Approach. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2012**, *97* (7). <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3314>.
- (8) Greenberg, C. R.; Prasad, A. N.; Dilling, L. A.; Thompson, J. R. G.; Haworth, J. C.; Martin, B.; Wood-Steiman, P.; Seargeant, L. E.; Seifert, B.; Booth, F. A.; Prasad, C. Outcome of the First 3-Years of a DNA-Based Neonatal Screening Program for Glutaric Acidemia Type 1 in Manitoba and Northwestern Ontario, Canada. *Mol Genet Metab* **2002**, *75* (1). <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3270>.

- (9) Borte, S.; Meeths, M.; Liebscher, I.; Krist, K.; Nordenskjöld, M.; Hammarström, L.; von Döbeln, U.; Henter, J. I.; Bryceson, Y. T. Combined Newborn Screening for Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Severe T- and B-Cell Immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2014**, *134* (1). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.026>.
- (10) Bruellman, R. J.; Watanabe, Y.; Ebrahim, R. S.; Creech, M. K.; Abdullah, M. A.; Dumitrescu, A. M.; Refetoff, S.; Weiss, R. E. Increased Prevalence of TG and TPO Mutations in Sudanese Children with Congenital Hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz297>.
- (11) *Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease*; 2012. <https://doi.org/10.17226/13284>.
- (12) Iglesias, A.; García-Nimo, L.; Cocho De Juan, J. A.; Moreno, J. C. Towards the Pre-Clinical Diagnosis of Hypothyroidism Caused by Iodotyrosine Deiodinase (DEHAL1) Defects. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.10.009>.
- (13) Borsò, M.; Agretti, P.; Zucchi, R.; Saba, A. Mass Spectrometry in the Diagnosis of Thyroid Disease and in the Study of Thyroid Hormone Metabolism. *Mass Spectrometry Reviews*. 2022. <https://doi.org/10.1002/mas.21673>.
- (14) Hansen, M.; Luong, X.; Sedlak, D. L.; Helbing, C. C.; Hayes, T. Quantification of 11 Thyroid Hormones and Associated Metabolites in Blood Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408* (20). <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9614-9>.
- (15) Richards, K. H.; Monk, R.; Renko, K.; Rathmann, D.; Rijntjes, E.; Köhrle, J. A Combined LC-MS/MS and LC-MS3 Multi-Method for the Quantification of Iodothyronines in Human Blood Serum. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (21). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01941-9>.
- (16) Jongejan, R. M. S.; Klein, T.; Meima, M. E.; Visser, W. E.; van Heerebeek, R. E. A.; Luider, T. M.; Peeters, R. P.; de Rijke, Y. B. A Mass Spectrometry-Based Panel of Nine Thyroid Hormone Metabolites in Human Serum. *Clin Chem* **2020**, *66* (4). <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa022>.
- (17) Lorenzini, L.; Nguyen, N. M.; Sacripanti, G.; Serni, E.; Borsò, M.; Saponaro, F.; Cecchi, E.; Simoncini, T.; Ghelardoni, S.; Zucchi, R.; Saba, A. Assay of Endogenous 3,5-Diiodo-L-Thyronine (3,5-T2) and 3,3'-Diiodo-L-Thyronine (3,3'-T2) in Human Serum: A Feasibility Study. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00088>.

- (18) Li, Z. M.; Giesert, F.; Vogt-Weisenhorn, D.; Main, K. M.; Skakkebaek, N. E.; Kiviranta, H.; Toppari, J.; Feldt-Rasmussen, U.; Shen, H.; Schramm, K. W.; de Angelis, M. Determination of Thyroid Hormones in Placenta Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2018**, *1534*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.048>.
- (19) Richards, K. H.; Schanze, N.; Monk, R.; Rijntjes, E.; Rathmann, D.; Köhrle, J. A Validated LC-MS/MS Method for Cellular Thyroid Hormone Metabolism: Uptake and Turnover of Mono-Iodinated Thyroid Hormone Metabolites by PCCL3 Thyrocytes. *PLoS One* **2017**, *12* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183482>.
- (20) Fan, W.; Mao, X.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Stir Bar Sorptive Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Analysis of Thyroxine in Urine Samples. *J Chromatogr A* **2013**, *1318*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.022>.
- (21) Han, C.; Sun, J.; Cheng, H.; Liu, J.; Xu, Z. Speciation Analysis of Urine Iodine by Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Methods* **2014**, *6* (14). <https://doi.org/10.1039/c4ay00396a>.
- (22) Michalke, B.; Schramel, P.; Witte, H. Iodine Speciation in Human Serum by Reversed-Phase Liquid Chromatography-ICP-Mass Spectrometry. *Biol Trace Elem Res* **2000**, *78* (1–3). <https://doi.org/10.1385/BTER:78:1-3:81>.
- (23) Michalke, B.; Schramel, P.; Witte, H. Method Developments for Iodine Speciation by Reversed-Phase Liquid Chromatography-ICP-Mass Spectrometry. *Biol Trace Elem Res* **2000**, *78* (1–3). <https://doi.org/10.1385/BTER:78:1-3:67>.
- (24) Mohammed, M. N.; Farmer, M.; Ramsden, D. B. 3,5-diiodotyrosine Excretion in Human Urine in Individuals of Differing Thyroidal Status. *Biol Mass Spectrom* **1983**, *10* (9). <https://doi.org/10.1002/bms.1200100906>.
- (25) Sun, Z.; Su, Q.; Rokita, S. E. The Distribution and Mechanism of Iodotyrosine Deiodinase Defied Expectations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.019>.
- (26) Richards, K.; Rijntjes, E.; Rathmann, D.; Köhrle, J. Avoiding the Pitfalls When Quantifying Thyroid Hormones and Their Metabolites Using Mass Spectrometric Methods: The Role of Quality Assurance. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.032>.

- (27) Tai, S. S. C.; Sniegowski, L. T.; Welch, M. J. Candidate Reference Method for Total Thyroxine in Human Serum: Use of Isotope-Dilution Liquid Chromatography - Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *Clin Chem* **2002**, *48* (4). <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.4.637>.
- (28) Tai, S. S. C.; Bunk, D. M.; White V, E.; Welch, M. J. Development and Evaluation of a Reference Measurement Procedure for the Determination of Total 3,3',5-Triiodothyronine in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2004**, *76* (17). <https://doi.org/10.1021/ac049516h>.
- (29) Thienpont, L. M.; van Uytvanghe, K.; van Houcke, S. Standardization Activities in the Field of Thyroid Function Tests: A Status Report. *Clin Chem Lab Med* **2010**, *48* (11). <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.321>.
- (30) Thienpont, L. M.; van Uytvanghe, K.; Poppe, K.; Velkeniers, B. Determination of Free Thyroid Hormones. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.05.012>.
- (31) Ramaley, L.; Herrera, L. C. Software for the Calculation of Isotope Patterns in Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22* (17). <https://doi.org/10.1002/rcm.3668>.

CAPÍTULO 2

***Síntesis, purificación, caracterización y
aplicación de angiotensina I marcada a la
determinación trazable al SI
de angiotensina I***

II.1. INTRODUCCIÓN

II. 1.1. Trazabilidad de los resultados analíticos al Sistema Internacional de unidades en la cuantificación de proteínas y péptidos

Disponer de métodos de cuantificación absolutos de alta calidad metrológica, que proporcionen resultados trazables al SI, permite la armonización y estandarización internacional de valores de péptidos y proteínas, lo cual es especialmente importante en muestras complejas y altamente variables, como son las muestras biológicas¹⁻⁶. Para ello es necesaria la puesta en marcha, en la mayoría de los casos, de estudios poblacionales y ejercicios de intercomparación, lo cual requiere la coordinación de diferentes laboratorios metrológicos, generalmente de diferentes países cada uno de ellos con instalaciones, personal y metodologías de trabajo diferentes⁷⁻⁹.

Una característica de estos métodos es que requieren una rigurosa caracterización de la pureza de los patrones de calibración empleados y consecuentemente de sus análogos marcados isotópicamente. La caracterización de los compuestos marcados se refiere a la estructura, concentración y enriquecimiento isotópico, e implica llevar a cabo estudios complementarios como son la determinación de impurezas, de sales o de humedad, todos ellos parámetros que pueden afectar a la pureza (y por ende a la concentración). Esto es aplicable al caso de los patrones de péptidos cuya pureza no suele asegurarse por el fabricante ya que se sintetizan en cantidades pequeñas como sales y, al ser en la mayoría de los casos higroscópicos, absorben humedad. Los procedimientos que se han empleado para caracterizar péptidos incluyen la identificación y cuantificación de posibles “impurezas estructurales” (compuestos con estructura similar o isómeros)¹⁰⁻¹⁵, determinación de impurezas químicas (sales, humedad o compuestos orgánicos volátiles) y la determinación de la cantidad exacta del analito a través de métodos como la qRMN¹⁶⁻¹⁹, el balance de masa²⁰⁻²³, el análisis elemental de C, H y N (CHN)^{24,25}, espectrómetros de masas de relaciones isotópicas (IRMS)²⁶⁻²⁸ o el análisis de aminoácidos (AAAs).

II.1.2. Análisis de Aminoácidos

El análisis de aminoácidos es el método más empleado para certificar la pureza de péptidos y proteínas^{22,29-33}. Clásicamente, el análisis de aminoácidos se realiza tras la hidrólisis ácida de los péptidos o las proteínas en tubos de vidrio sometidos a temperaturas entre 120 y 200 °C durante varios días³⁴. El ácido más empleado en estas hidrólisis es el clorhídrico, pues este puede obtenerse con un alto grado de pureza, no es oxidante, es volátil y puede eliminarse fácilmente tras la hidrólisis^{35,36} aunque se han propuesto otros ácidos como el metanosulfónico o el p-toluenosulfónico. En los últimos años se han desarrollado métodos de hidrólisis acelerados

empleando microondas focalizadas con el objetivo de reducir los tiempos de hidrólisis de varios días a unas pocas horas³⁷⁻⁴¹.

En el ámbito de la Espectrometría de Masas, la determinación de los hidrolizados de péptidos y proteínas se realiza mediante Dilución Isotópica, empleando aminoácidos marcados isotópicamente. Para la separación de los aminoácidos se ha empleado tanto la cromatografía de gases, previa derivatización de los aminoácidos con reactivos silanzantes como el trimetilsilil o el *terbutil-dimetilsilil* GC^{42,43}, como la cromatografía de líquidos, normalmente de fase reversa con derivatización con butanol-clorhídrico⁴⁴ para incrementar la retención de los aminoácidos en separaciones por fase reversa y aumentar la eficacia de ionización en la fuente ESI. Los aminoácidos que se suelen determinar para cuantificar los patrones de péptidos y proteínas suelen ser la valina, leucina, prolina o fenilalanina dado que son los aminoácidos más estables.

II.1.3. Angiotensina I

La angiotensina I es un decapeptido biológico, prohormona, que forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el cual se encarga de una gran variedad de procesos como regular la presión sanguínea, establecer un balance de electrolitos en fluidos y controlar la resistencia vascular⁴⁵. Así mismo, también está relacionada con procesos hemodinámicos y con el crecimiento celular, el desarrollo fetal y la gestación^{46,47}. Dentro del SRAA, la proteína renina convierte la glicoproteína angiotensinógeno (AGT) en angiotensina I. Hasta principios de este siglo se conocía que la angiotensina I se convertía en angiotensina II (hormona activa) a través de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías, se han descubierto nuevas rutas metabólicas intermedias a partir de la angiotensina I, las cuales emplean las enzimas ACE2 y la endopeptidasa neuronal (NEP), que generan metabolitos “tipo angiotensina” con funcionalidad biológica^{48,49}. Entre estos se encuentran la angiotensina 1-9, la angiotensina 1-7 y la angiotensina III⁵⁰⁻⁵². El estudio de estos péptidos no solo es importante por su papel biológico, sino también por su implicación clínica y para el desarrollo de fármacos^{53,54}.

La elevada capacidad de la Espectrometría de Masas para identificar inequívocamente y cuantificar compuestos de forma exacta y precisa la convierte en una herramienta indispensable en estos estudios. Tanto es así, que en los últimos años se han desarrollado métodos de medida de referencia y materiales de referencia certificados para angiotensina I y II, empleando esta técnica^{25,31,55,56}, e incluyendo, en algunos casos, el uso de péptidos marcados isotópicamente.

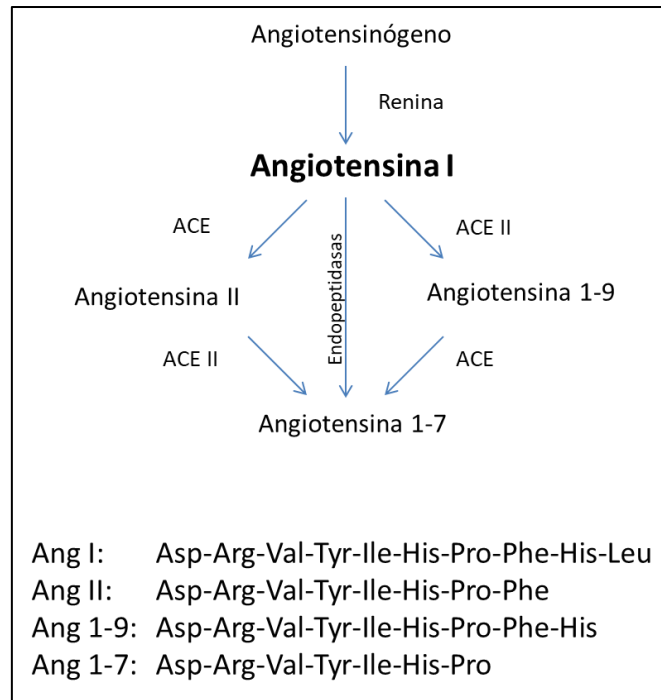


Figura 1. Principales rutas y derivados de Angiotensina I y secuencia de aminoácidos de cada uno de los péptidos implicados.

II. 2. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo es la síntesis del péptido angiotensina I, tanto en su forma natural como en forma de análogo mínimamente marcado en ^{13}C , realizándose la purificación, caracterización y aplicación de ambos a la cuantificación de angiotensina I mediante Dilución Isotópica y Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (HPLC-MS/MS) para obtener resultados directamente trazables al SI.

La consecución de este objetivo requiere el desarrollo y la optimización previa de un método de hidrólisis de péptidos para la cuantificación de los mismos a través de la cuantificación de los aminoácidos liberados en la etapa de hidrólisis mediante análisis por dilución isotópica. Para ello, se requerirá la derivatización de los aminoácidos antes de la separación cromatográfica empleada (GC o HPLC) y la medida de su distribución isotópica mediante Espectrometría de Masas en tándem (HPLC-MS/MS).

II. 3. EXPERIMENTAL

II. 3.1. Reactivos y materiales

Para la síntesis de angiotensina I en fase sólida se empleó una resina Wang precargada con leucina-Fmoc (funcionalización: 0,65 mmol/g) de Sigma. Así mismo, se emplearon los aminoácidos de abundancia natural protegidos con el grupo Fmoc L-fenilalanina, ácido L-aspartico, L-isoleucina, L-prolina, L-tirosina y L-valina de Sigma. L-arginina y L-histidina de Merck (Darmstadt, Alemania). Para la síntesis del péptido marcado se empleó L-¹³C-valina-Fmoc (¹³C=99,2 %) de Cambridge Isotope Laboratories (MA, USA). Para el proceso de síntesis también se utilizaron etil-2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato (oxyma), N-hidroxibenzotriazol (HoBt), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), triisopropilsilano (TIS), piperazina, etanol, N-metilpirrolidona (NMP), ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano y dietiléter de Sigma-Aldrich y N,N-dimetilformamida (DMF) de BDH Prolabo (Leuven, Holanda).

En la etapa de optimización del método cromatográfico se emplearon los aminoácidos de abundancia natural L-valina (99,4±0,1%), L-leucina (99,5±0,1%), L-isoleucina (98,9±0,2%), L-prolina (99,8±0,2%), L-fenilalanina (99,7±0,1%), L-tirosina (99,5±0,1%) y L-arginina (99,3±0,1%), adquiridos de Fluka Analytical (Múnich, Alemania). Como trazadores isotópicos para determinar la concentración por Dilución Isotópica se utilizaron los aminoácidos marcados L-valina-1-¹³C (≥99%), L-leucina-1-¹³C (≥99%), L-isoleucina-1-¹³C (≥98%), L-prolina-1-¹³C (≥99%), L-fenilalanina-1-¹³C (≥99%) y L-arginina ¹⁵N-4 (≥99%), de la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España). L-tirosina marcada con dos átomos de ¹³C (posiciones 3 y 5 del anillo aromático) se compró en Cambridge Isotope Laboratories. Adicionalmente, se empleó una disolución certificada de aminoácidos *TraceCERT® Amino Acid Mix Solution* de Sigma-Aldrich para la caracterización de los aminoácidos marcados. Como reactivo derivatizante de los aminoácidos se emplearon Butanol/HCl 3N (99,9%) y N-metil-N-tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA, 99,8%) de Sigma-Aldrich. Estos reactivos se almacenaron en nevera a 4 °C.

Para la preparación de las fases móviles se empleó metanol grado LC-MS (≥99,9%) adquirido en Fischer Scientific (Madrid, España), ácido fórmico (>98%) y ácido trifluoroacético (TFA) de Sigma-Aldrich. El agua ultrapura empleada en la preparación de las fases móviles y de las disoluciones se obtuvo con un sistema de destilación PureLab Flex 4 ELGA Labwater (Lane End, Reino Unido)).

Para la hidrólisis de los péptidos se emplearon los materiales de referencia certificados SRM 998 Angiotensina-I del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de EEUU (NIST) (Gaithersburg, EE.UU.) y CRM 6901-c (C-Peptide) del Instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ), así como HCl 12N purificado mediante un proceso de destilación *sub-boiling*. Los tubos

de hidrólisis clásica a vacío (con forma de T) con un volumen de 6 mL se adquirieron en Thermo Scientific, mientras que los tubos de hidrólisis para microondas focalizadas con un volumen de 2 mL se adquirieron en Biotage (Suecia).

II.3.2. Instrumentación

La separación cromatográfica de la angiotensina I y de los aminoácidos esterificados se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) de Agilent series 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este sistema de UPLC está acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent modelo 6460, equipado con una fuente de ionización “jet-stream”. Se trabajó en modo de ionización positivo. La separación cromatográfica de los aminoácidos silanizados se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (GC) de Agilent series 7890A acoplado a espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo modelo 7000 (Agilent). El sistema de cromatografía preparativa empleado para la purificación de los péptidos sintetizados fue un equipo Agilent modelo Infinity 1260 acoplado a un detector UV-Vis.

Se empleó una balanza analítica modelo AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Suiza) para la preparación gravimétrica de todas las disoluciones. Todas las disoluciones se homogeneizaron empleando un agitador tipo Vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italia). Para llevar a cabo las centrifugaciones se empleó una centrífuga Micro STAR 17 de VWR (PA, USA), mientras que las evaporaciones se realizaron en un evaporador MiVac de Supelco (St. Louis, MO, USA). En el proceso de derivatización se empleó una centrífuga Micro STAR 17 (VWR, PA, USA), un evaporador MiVac de Supelco (St. Louis, MO, USA) y una estufa Heraeus® de Thermo (MA, USA) para la reacción de esterificación y un termobloque de Thermo para la reacción de silanización. Las reacciones de hidrólisis de péptidos se realizaron en un termobloque de Thermo y en un equipo de microondas focalizadas Biotage Initiator de Biotage (Suecia). Para la síntesis en fase sólida se empleó el equipo Liberty Blue de CEM (Francia). Así mismo, también se empleó un pH-metro Basic 20 de Crison (Barcelona, España) para ajustar el pH de las disoluciones y las fases móviles.

II. 3.3. Procedimientos

II. 3.3.1. Derivatización de aminoácidos

Se proponen dos procedimientos de derivatización para los aminoácidos dependiendo del tipo de cromatografía a utilizar en su separación:

- a) Para la separación por cromatografía líquida en fase reversa, con el fin de mejorar la separación de los aminoácidos y su posterior detección⁴⁴, se realiza una esterificación de

Fisher usando una disolución de HCl 3N en butanol. Brevemente, las disoluciones con los aminoácidos se evaporan en tubos Eppendorf® empleando vacío. A continuación, se añaden a los tubos 100 µL de la disolución butanol-HCl 3 N y se calientan en un termobloque a 60 °C durante 30 minutos. Por último, esta disolución se evapora empleando vacío y el residuo seco se reconstituye en la fase móvil inicial para su posterior análisis por LC-MS/MS. La reacción de derivatización se muestra en la Figura 2A.

- b) Para la separación por cromatografía de gases, con el fin de generar derivados de aminoácidos volátiles⁵⁷, se lleva a cabo una reacción de silanización empleando N-metil-N-tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA). Brevemente, las disoluciones con los aminoácidos se evaporan en tubos Eppendorf® empleando vacío. A continuación, se añaden a los tubos 50 µL de piridina y se agitan durante 15 minutos. Posteriormente, se añaden 50 µL de MTBSTFA y la muestra se agita en un termobloque a 60 °C durante 30 minutos. Esta disolución se inyecta directamente en el equipo. La reacción de derivatización se muestra en la Figura 2B.

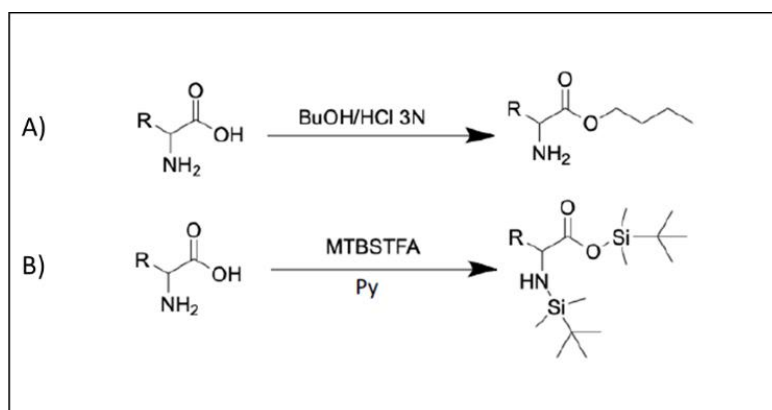


Figura 2. Reacciones de derivatización de aminoácidos A) esterificación para su determinación por LC-MS/MS, B) silanización para su determinación por GC-MS/MS.

II. 3.3.2. Determinación de aminoácidos y de Angiotensina I por LC-MS/MS

La separación cromatográfica de arginina, prolina, valina, tirosina, isoleucina, leucina y fenilalanina se lleva a cabo como ésteres butilados empleando una columna Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1mm x 50mm y 1,8 µm). La separación cromatográfica de la angiotensina I también se realiza empleando esta columna y el mismo método cromatográfico. Este método incluye un gradiente cromatográfico usando como fase móvil A 0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua y como fase B 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo. Las condiciones para la separación cromatográfica se detallan en la Tabla 1. Los análisis por MS/MS se llevan a cabo empleando ionización positiva y el modo de detección SRM. Los valores de los parámetros optimizados (empleando una disolución 1 µg/g de los aminoácidos disueltos en una mezcla 1:1 de las dos fases

móviles) y otros valores empleados en la configuración del espectro de masas se detallan en la Tabla 2. La adquisición de datos y el tratamiento de los mismo se lleva a cabo usando el software Agilent MassHunter Workstation versión B.06.00.

Tabla 1. Parámetros experimentales seleccionados para la separación por cromatografía de líquidos de los aminoácidos esterificados y la angiotensina I.

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1290
Columna	Zorbax Eclipse C18
Dimensiones	50 x 2,1mm x 1,6µm
Temperatura	25 °C
Volumen de inyección	1 µL
Flujo	0,4 mL/min
Fase A	0,1% ácido fórmico en agua
Fase B	0.1% ácido fórmico en ACN
Separación cromatográfica	Tiempo (min) - % B
	0 5
	1 5
	8 40
	9 60
	10 5
	12 5

Tabla 2. Parámetros seleccionados para la detección por MS/MS de los aminoácidos butilados y la angiotensina I

Espectrómetro de masas	Agilent 6460
Fuente de ionización	Electrospray jet stream
Modo de ionización	Positivo
Temperatura del gas	250 °C
Flujo del gas	8 mL/min
Temperatura del gas envolvente	300 °C
Flujo del gas envolvente	10 mL/min
Presión del nebulizador	50 psi
Voltaje del capilar	2000 V
Voltaje de la entrada	500 V

II. 3.3.3. Determinación de aminoácidos por GC-MS/MS

La separación cromatográfica de prolina, valina, tirosina, isoleucina, leucina y fenilalanina como derivados silanizados se lleva a cabo por GC-MS/MS usando una columna DB-5MS (30 m x 0,25 mm con 0,25 µm de tamaño de partícula). Se emplea helio como gas de arrastre con un flujo de 2 mL/min. La identificación de los aminoácidos se lleva a cabo comparando los espectros obtenidos en modo Scan con la base de datos-librería de espectros de masa de Wiley y del NIST. Los análisis en tándem se llevan a cabo empleando el modo SRM. La adquisición de datos y el tratamiento de los mismo se lleva a cabo usando el software Agilent MassHunter Workstation versión B.06.00. Los valores de los parámetros empleados para la separación cromatográfica, así como aquellos empleados en la configuración del espectro de masas se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros seleccionados para la separación y detección por cromatografía de gases de los aminoácidos silanizados.

Cromatógrafo	Agilent 7879A
Columna	DB-5MS, 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Temperatura de inyección	280 °C
Volumen de inyección	1 µL
Modo de inyección	Splitless
Flujo	2 mL/min
Separación cromatográfica	Temperatura inicial (°C) - Temperatura final (°C) (tiempo) 40 – 40 (5 min) 40 - 105 (3,5 min) a 5 °C min ⁻¹ 105 - 120 (3 min) a 5 °C min ⁻¹ 120 - 145 a 10 °C min ⁻¹ 145 - 185 a 5 °C min ⁻¹ 185 - 200 (0,5 min) a 10 °C min ⁻¹ Tiempo total = 40 min
Espectrómetro de masas	Agilent 7000
Temperatura de la línea de transferencia	250 °C
Temperatura de la fuente de ionización	230°C
Temperatura del analizador de cuadrupolo	150°C

II. 3.3.4. Hidrólisis ácida de péptidos

Las disoluciones de péptidos, almacenadas a -20°C , se descongelan a temperatura ambiente en hielo y se homogenizan empleando un vortex para su agitación. Por otro lado, las disoluciones de aminoácidos almacenadas a 4°C se ponen también a temperatura ambiente. A continuación, se mezclan, en viales de cristal de 5 mL, aproximadamente, 50 mg de una disolución de $100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de péptido y 0,1 g de una mezcla de aminoácidos marcados isotópicamente (concentraciones entre 1 y $10\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$). Seguidamente, se añaden, aproximadamente, 150 μL de agua y 300 μL de HCl 12N *sub-boiling*. Por último, los viales se sellan y el aire interior se sustituye por nitrógeno con el fin de evitar oxidaciones. En la Figura 3 se muestra este procedimiento de forma gráfica.

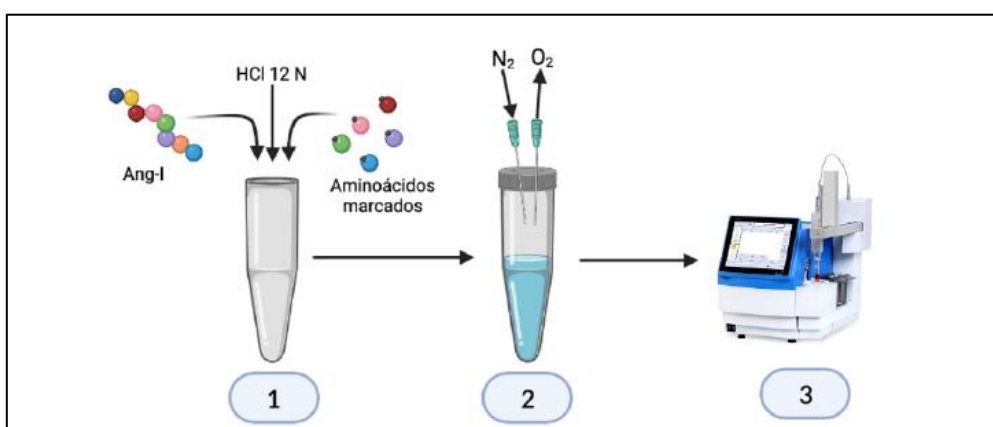


Figura 3. Procedimiento de preparación de muestra para la hidrólisis de los péptidos mediante microondas.

II. 3.3.5. Síntesis y purificación de angiotensina I natural y marcada isotópicamente

La síntesis de angiotensina I natural y marcada isotópicamente se lleva a cabo empleando un procedimiento de síntesis en fase sólida (SPPS)⁵⁸ y ^{13}C -valina como molécula marcada isotópicamente. La síntesis emplea aminoácidos funcionalizados con grupos protectores que se van incorporando a una resina sólida de poliestireno. Estos grupos protectores evitan la formación de productos indeseados. Los enlaces peptídicos entre aminoácidos que forman la cadena peptídica se forman a través en un proceso cíclico de tres pasos:

1. El lado N-terminal del aminoácido retenido sobre la resina sólida de poliestireno se desprotege.
2. Se incorpora un aminoácido a través de su C-terminal formando un enlace peptídico con el N-terminal del aminoácido retenido sobre la resina sólida de poliestireno.
3. El exceso de aminoácido añadido se elimina lavando el producto y se procede a la protección de los N-terminales de la secuencia de aminoácidos obtenida.

El proceso se repite con el siguiente aminoácido de la secuencia hasta obtener el péptido deseado. Con el fin de aumentar la eficiencia de las reacciones y de minimizar reacciones secundarias se emplean disoluciones de protección, activación y aditivos. En la Figura 4 se muestra un esquema de las reacciones involucradas. La síntesis en fase sólida se realiza en un sintetizador de péptidos automático, el cual emplea microondas para acelerar el proceso.

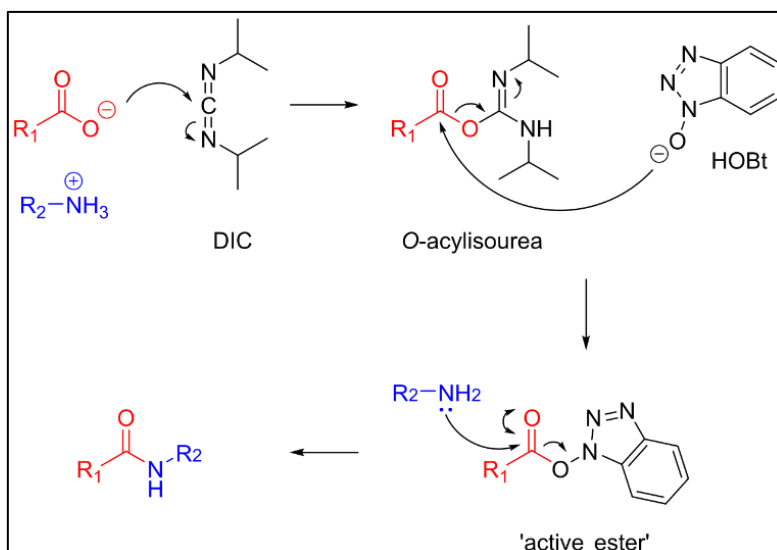


Figura 4. Esquema de las reacciones y reactivos utilizados en la síntesis automatizada de péptidos.

Una vez ha terminado la reacción, el péptido sintetizado se encuentra ligado al soporte sólido (resina). La resina se filtra y se lava con una mezcla de TFA, TIS y agua ultrapura (95:2.5:2.5) para eliminar los grupos protectores permanentes y liberar al péptido de la resina. Finalmente, la disolución se filtra y el péptido se precipita empleando dietiléter frío (4 °C). Este proceso se repite varias veces y el producto final se guarda a -20 °C en oscuridad.

La purificación de los péptidos sintetizados se lleva a cabo empleando cromatografía líquida semi-preparativa, de acuerdo a las condiciones que se detallan en la Tabla 4. Para ello, 10 mg del péptido sólido se disuelven en 1 mL de agua 0,1 % (v/v) TFA y se inyectan directamente 50 µL de esa disolución en el equipo.

Tabla 4. Parámetros empleados para la separación por cromatografía de líquidos semipreparativa de los péptidos sintetizados: angiotensina I natural y marcada isotópicamente.

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1260	
Columna	AerisPeptide XB-C18 (Phenomenex)	
Dimensiones	250x4,6mm x5µm	
Temperatura	25 °C	
Volumen de inyección	1 µL	
Longitud de onda	280 nm	
Flujo	2 mL/min	
Fase A	0,1% ácido trifluoroacético en agua	
Fase B	ACN, 0,1% ácido trifluoroacético	
Separación cromatográfica	Tiempo (min) - % B	
	0	8
	5	8
	24	70
	29	70
	29,5	8
	49,5	8

II. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II. 4.1. Medida de la composición isotópica de aminoácidos por LC-MS/MS

Los aminoácidos se separaron por HPLC como ésteres butilados empleando las condiciones que se detallan en la Tabla 1. Con el fin de estudiar la pureza espectral de los compuestos naturales y el enriquecimiento isotópico de sus análogos marcados se midieron los clústeres completos del ion molecular en modo SIM, inyectando disoluciones de aminoácidos derivatizados con una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La Tabla 5 muestra los tiempos de retención obtenidos para los aminoácidos y su pureza espectral. Así mismo, se llevó una optimización de los parámetros de la fuente de ionización para mejorar la sensibilidad.

Tabla 5. Tiempos de retención (R.T.), ion medido, fórmula del ion, pureza espectral y enriquecimiento isotópico determinados por HPLC-MS para los aminoácidos indicados. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar de n=5 inyecciones en el sistema LC-ESI-MS/MS.

Compuesto	R.T. (min)	[M+H] (m/z)	Fórmula fragmento	$\chi_{M-1} \pm \text{d.e.}$ (%)	$\chi_M \pm \text{d.e.}$ (%)	Enriq. isotópico $\pm \text{d.e.}$ (%)
Arginina	0,7	231	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$	$0,28 \pm 0,01$	$99,69 \pm 0,04$	$98,91 \pm 0,02$
Prolina	2,6	172	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$	$0,27 \pm 0,01$	$99,91 \pm 0,02$	$99,99 \pm 0,02$
Valina	4,0	174	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$	$0,41 \pm 0,02$	$99,54 \pm 0,03$	$99,87 \pm 0,03$
Tirosina	4,5	238	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	$0,30 \pm 0,01$	$99,86 \pm 0,04$	$98,91 \pm 0,02$
Leucina	5,0	188	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	$0,31 \pm 0,09$	$99,65 \pm 0,2$	$98,98 \pm 0,06$
Isoleucina	5,0	188	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	$0,30 \pm 0,01$	$99,87 \pm 0,05$	$98,91 \pm 0,02$
Fenilalanina	5,6	222	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2$	$0,17 \pm 0,01$	$100,03 \pm 0,10$	$99,39 \pm 0,02$

A continuación, se estudió la fragmentación de los aminoácidos con el fin de seleccionar aquellas transiciones MRM que proporcionaran la mayor sensibilidad y especificidad. El ion molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ fue seleccionado como el ion precursor para todos los aminoácidos. Por otro lado, los iones producto $[\text{M}-56]^+$, que provienen de la pérdida de un grupo C_4H_8 por disociación inducida por colisión (CID), se seleccionaron para V, P, Y, L y F debido a su alta intensidad, mientras que el ion producto $[(\text{M}+\text{H})-17]^+$ (pérdida de NH_3) se seleccionó para la arginina. Así mismo, debido a la coelución de leucina e isoleucina, para las mezclas que contienen ambos aminoácidos (hidrolizados de angiotensina I) se seleccionó el ion producto $[(\text{M}+\text{H})-119]^+$ para la medida específica de isoleucina, ya que es un fragmento no presente en leucina⁵⁹. También, se optimizaron las energías de colisión para todos los aminoácidos, siendo 5, 10, 5, 5, 20, 20 and 5 eV para R, P, V, Y, L, I y F, respectivamente. La Figura 5 muestra un cromatograma obtenido

para la separación de una disolución de aminoácidos con una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ empleando LC-MS/MS.

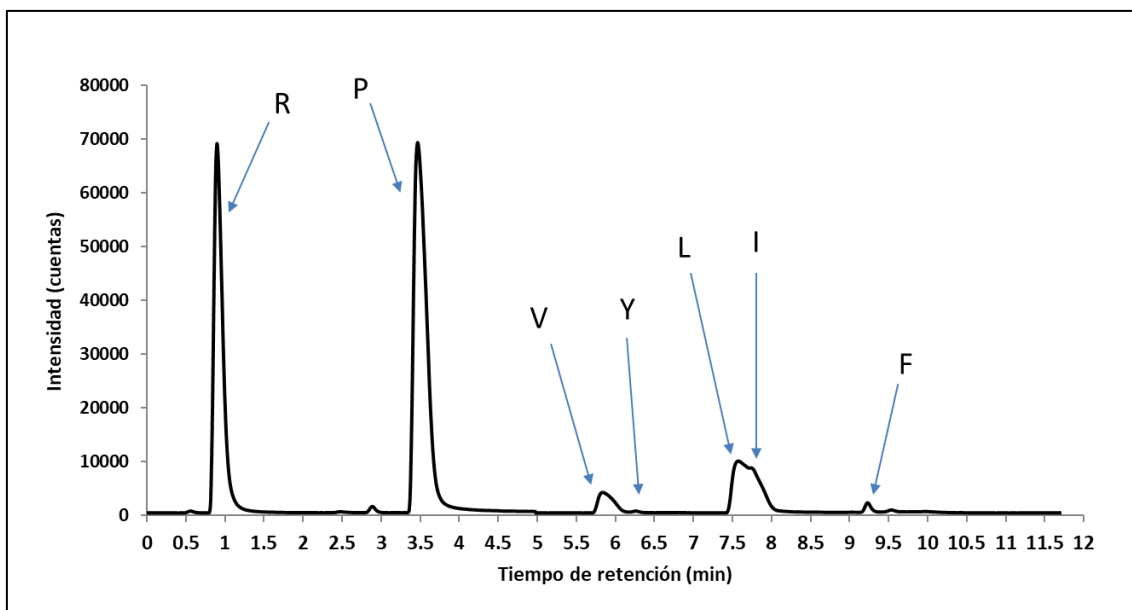


Figura 5. Cromatograma obtenido para la separación de una disolución de aminoácidos con una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{g}$ empleando LC-MS/MS.

Respecto a las medidas mediante MRM, las abundancias experimentales para las transiciones seleccionadas de cada aminoácido se compararon con los valores teóricos de acuerdo al software IsoPattern⁶⁰. Este experimento se realizó con aminoácidos naturales y marcados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6. En ella se muestra que, tanto para los compuestos naturales como para los marcados, hay una buena correlación entre los valores experimentales y los valores teóricos. La incertidumbre de los valores experimentales proviene de la desviación estándar de 5 medidas independientes. Cabe destacar que, para obtener un mejor ajuste en IPD, en los cálculos de las medidas de los hidrolizados se emplearon las abundancias obtenidas experimentalmente.

Tabla 6. Transiciones medidas, valores teóricos y experimentales de las abundancias isotópicas de esas transiciones y desviación estándar de las medidas para los aminoácidos indicados obtenidas de n=5 inyecciones en el sistema HPLC-MS/MS.

Aminoácido	Transición	Valor teórico	Valor experimental	Desviación estándar (n=5)
Arginina	231→214	0,8911	0,8903	0,0016
	235→217	1,79E-6	0,0034	0,0006
¹⁵ N ₄ -Arginina	231→214	9,34E-9	0,0023	0,0007
	235→217	0,9000	0,9037	0,0022
Prolina	172→116	0,9385	0,9367	0,0001
	173→117	0,0560	0,0575	0,0001
¹³ C ₁ -Prolina	172→116	0,00001	0,00005	0,00008
	173→117	0,9499	0,9489	0,0003
Valina	174→118	0,9383	0,9371	0,0014
	175→119	0,0562	0,0594	0,0016
¹³ C ₁ -Valina	174→118	0,0012	0,0030	0,0059
	175→119	0,9494	0,9475	0,0010
Tirosina	238→182	0,8966	0,8972	0,0019
	240→184	0,0099	0,0096	0,0005
¹³ C ₂ -Tirosina	238→182	0,0001	0,0251	0,0009
	240→184	0,9057	0,8812	0,0011
Leucina	188→132	0,9281	0,9265	0,0008
	189→133	0,0658	0,0642	0,0012
¹³ C ₁ -Leucina	188→132	0,0094	0,0102	0,0009
	189→133	0,9295	0,9288	0,0007
Isoleucina	188→69	0,9467	0,9472	0,0003
	189→69	0,0522	0,0517	0,0002
¹³ C ₁ -Isoleucina	188→69	0,0097	0,0096	0,0007
	189→69	0,9381	0,9371	0,0008
Fenilalanina	222→166	0,8988	0,9001	0,0007
	223→167	0,0927	0,0917	0,0007
¹³ C ₁ -Fenilalanina	222→166	0,0055	0,0085	0,0003
	223→167	0,9039	0,9019	0,0004

II. 4.2. Medida de la composición isotópica de aminoácidos por GC-MS/MS

Los aminoácidos se separaron por cromatografía de gases como derivados silanizados empleando las condiciones detalladas en la Tabla 3. Con el fin de estudiar la pureza espectral de los compuestos naturales y el enriquecimiento isotópico de sus análogos marcados se midieron los clústeres completos del ion molecular en modo SIM, inyectando disoluciones de aminoácidos derivatizados con una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La Tabla 7 muestra los tiempos de retención obtenidos para los aminoácidos y su composición isotópica. Dado que el derivado silanizado de la arginina es inestable y que diferentes autores han informado de errores en su determinación, este aminoácido no se tuvo en cuenta en los experimentos por GC^{61,62}. Adicionalmente, los parámetros de la fuente de ionización se optimizaron para mejorar la sensibilidad.

Tabla 7. Tiempos de retención, ion medido, fórmula del ión y pureza espectral, enriquecimiento isotópico determinados por GC-MS para los aminoácidos indicados.

Compuesto	R.T. (min)	[M-] (m/z)	Fórmula fragmento
Arginina	6,25	213	C ₉ H ₂₁ N ₂ Si ₂
Valina	8,10	288	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂
Leucina	8,37	302	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂
Isoleucina	8,59	302	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂
Prolina	8,95	286	C ₁₃ H ₂₈ NO ₂ Si ₂
Fenilalanina	11,38	336	C ₁₇ H ₃₀ NO ₂ Si ₂
Tirosina	14,0	466	C ₂₃ H ₄₄ NO ₃ Si ₃

Compuesto	$\chi_{M-2} \pm \text{d.e.}$ (%)	$\chi_{M-1} \pm \text{d.e.}$ (%)	$\chi_{M} \pm \text{d.e.}$ (%)	$\chi_{M+1} \pm \text{d.e.}$ (%)	Enriq. Isotópico \pm d.e. (%)
Arginina	0,111 \pm 0,002	0,13 \pm 0,02	96,7 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	98,70 \pm 0,02
Valina	0,15 \pm 0,001	0,22 \pm 0,01	97,81 \pm 0,04	1,74 \pm 0,03	100,00 \pm 0,01
Leucina	0,180 \pm 0,002	0,109 \pm 0,003	97,15 \pm 0,03	2,53 \pm 0,02	99,95 \pm 0,01
Isoleucina	0,081 \pm 0,002	0,117 \pm 0,003	96,84 \pm 0,04	2,84 \pm 0,03	98,88 \pm 0,01
Prolina	0,32 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	98,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	100,00 \pm 0,01
Fenilalanina	0,253 \pm 0,003	0,11 \pm 0,01	98,2 \pm 0,1	1,52 \pm 0,05	99,44 \pm 0,02
Tirosina	0,32 \pm 0,01	0,150 \pm 0,003	98,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	98,48 \pm 0,01

A continuación, se estudió la fragmentación de los aminoácidos con el fin de seleccionar aquellas transiciones MRM que proporcionaran la mayor sensibilidad y especificidad. El catión-radical generado en la fuente $[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$ se seleccionó como el ion precursor para todos los aminoácidos, mientras que el ion producto seleccionado fue el catión-radical $[\text{M}-\text{CO}-(\text{CH}_3)_3]^+$ debido a su elevada intensidad. Así mismo, se optimizaron las energías de colisión, siendo 30 eV

para V y para todos los demás aminoácidos 50 eV. La Figura 6 muestra un cromatograma obtenido para la separación de una disolución de aminoácidos con una concentración de 10 µg/g empleando GC-MS/MS.

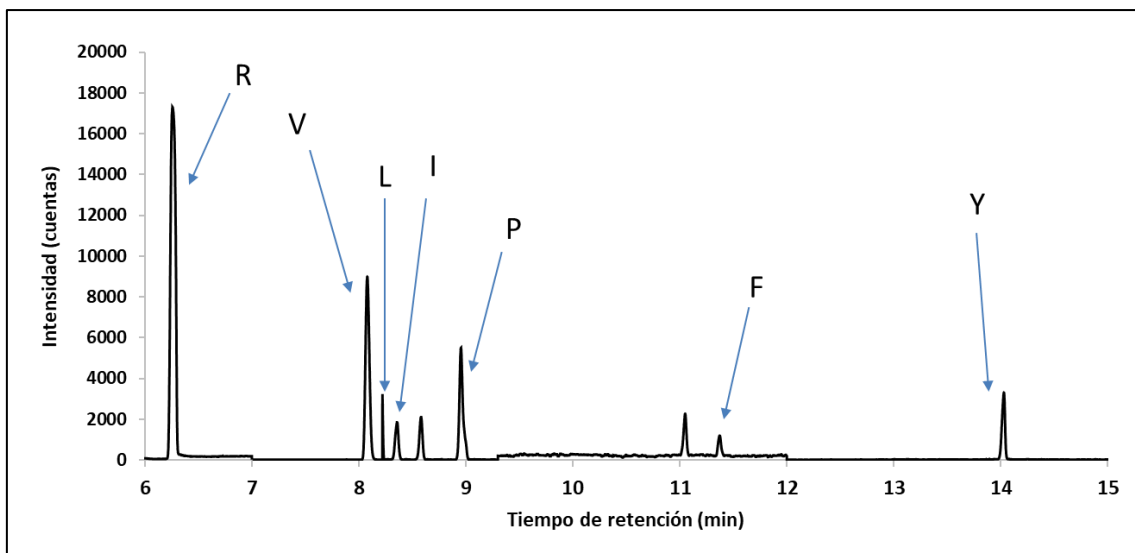


Figura 6. Cromatograma GC-MS/MS obtenido para una disolución de aminoácidos de una concentración de 10 µg·g⁻¹.

Respecto a las medidas MRM, las abundancias experimentales de las transiciones seleccionadas para cada aminoácido se compararon con las abundancias teóricas de esas transiciones utilizando el programa IsoPattern⁶⁰. Este experimento se realizó con aminoácidos naturales y marcados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8. En ella se muestra que, tanto para los compuestos naturales como para los marcados, hay una buena correlación entre los valores experimentales y teóricos. La incertidumbre de los valores experimentales proviene de la desviación estándar de 5 medidas independientes. Por último, cabe destacar que, para un mejor ajuste, en los cálculos de las medidas de los hidrolizados se emplearon las abundancias obtenidas experimentalmente.

Tabla 8. Transiciones, valores teóricos y experimentales de las abundancias isotópicas medidas por GC-MS/MS para los aminoácidos indicados y desviación estándar obtenidas de n=5 inyecciones.

Aminoácido	Transición	Valor teórico	Valor experimental	Desviación estándar (n=5)
Prolina	286 → 258	0,9889	0,9642	0,0002
	287 → 258	0,0111	0,0358	0,0002
¹³ C ₁ -Prolina	286 → 258	0,0000	0,0005	0,00003
	287 → 258	1,0000	0,9995	0,00003
Valina	288 → 260	0,9889	0,9766	0,0002
	289 → 260	0,0111	0,0234	0,0002
¹³ C ₁ -Valina	288 → 260	0,0000	0,0004	0,00002
	289 → 260	1,0000	0,9996	0,00002
Leucina	302 → 274	0,9996	0,9622	0,0007
	303 → 274	0,0004	0,0378	0,0007
¹³ C ₁ -Leucina	302 → 274	0,0050	0,0007	0,00002
	303 → 274	0,9950	0,9993	0,00002
Isoleucina	302 → 274	0,9996	0,9622	0,0002
	303 → 274	0,0004	0,0378	0,0002
¹³ C ₁ -Isoleucina	302 → 274	0,0050	0,0112	0,0002
	303 → 274	0,9950	0,9888	0,0002
Fenilalanina	336 → 308	0,9889	0,9619	0,0003
	337 → 308	0,0111	0,0381	0,0003
¹³ C ₁ -Fenilalanina	336 → 308	0,0056	0,0069	0,0005
	337 → 308	0,9944	0,9931	0,0005

II. 4.3. Optimización del procedimiento de hidrólisis

Dado que se conoce la secuencia de aminoácidos de los péptidos que se van a analizar, la concentración de los péptidos en una muestra se puede cuantificarse a partir de la concentración de sus aminoácidos constituyentes tras el proceso de hidrólisis, siempre y cuando haya sido cuantitativa. Por ello, se han comparado y optimizado dos métodos de hidrólisis ácida (clásica y por microondas) evaluando la concentración de los aminoácidos presentes en los hidrolizados mediante análisis por dilución isotópica. En estos experimentos se utilizaron mezclas de aminoácidos marcados isotópicamente que se caracterizaron mediante inversa usando como trazadores los aminoácidos naturales certificados del material de referencia TraceCERT (NIST), obteniendo para ellos unos valores de concentración trazables al SI.

II. 4.3.1. Hidrólisis clásica

La hidrólisis de péptidos y proteínas se ha llevado a cabo tradicionalmente empleando tubos de vidrio que permiten realizar vacío con objeto de evitar posibles oxidaciones de los aminoácidos, ácido clorhídrico 6N y tiempos de hidrólisis largos³⁴. Con el fin de verificar que se podía obtener una hidrólisis cuantitativa mediante este procedimiento bien establecido se llevó a cabo la hidrólisis del material de referencia SRM 998 Angiotensina I (NIST). Se ensayaron diferentes tiempos de hidrólisis: 24, 48, 60 y 78 h. Los aminoácidos de los hidrolizados se cuantificaron empleando cromatografía de gases de acuerdo al procedimiento previamente descrito. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7, donde se muestra el porcentaje promedio de hidrólisis obtenido de los valores de cada aminoácido. Como se puede observar, a partir de 48 h el porcentaje de hidrólisis para todos los aminoácidos alcanza el 100%.

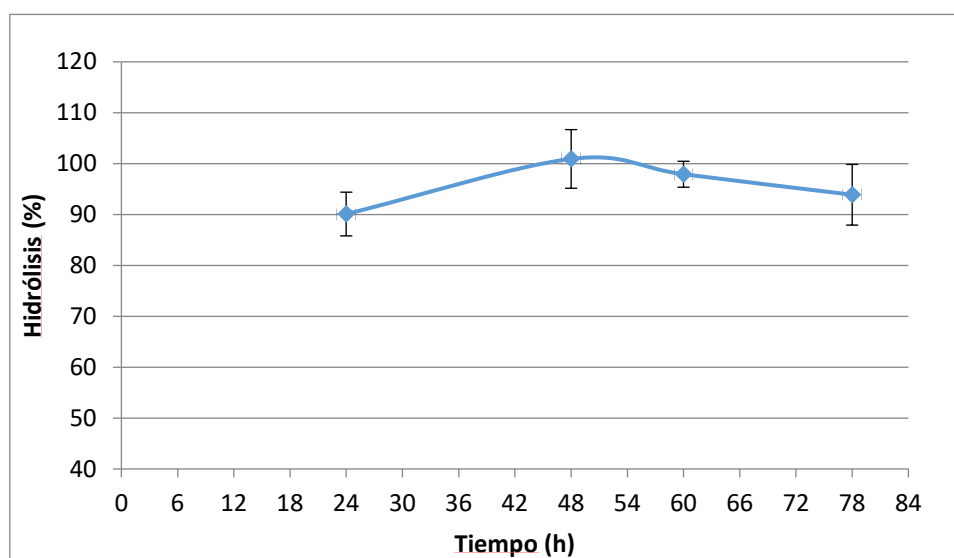


Figura 7. Eficacia promedio de hidrólisis del SRM 998 Angiotensina I obtenida de los porcentajes individuales de cada aminoácido utilizando el procedimiento clásico de hidrólisis ácida a una temperatura de 135 °C y GC-MS/MS.

II. 4.3.2. Hidrólisis asistida por microondas focalizadas

Recientemente, algunos autores han informado sobre el uso de microondas focalizadas con el fin de reducir drásticamente los tiempos de hidrólisis de péptidos y proteínas en comparación con los procedimientos clásicos^{5,38-41}. Con objeto de evaluar esta posibilidad, se realizaron ensayos para comparar los resultados con los obtenidos previamente mediante una hidrólisis clásica. En este caso se emplearon dos materiales de referencia de péptidos con tamaños sustancialmente diferentes: el SRM 998 Angiotensina I (NIST) y el CRM 6901-c (Péptido-C, NMIJ). Se optimizaron los dos parámetros principales en los experimentos de hidrólisis: el tiempo y la temperatura.

La primera curva de hidrólisis se obtuvo empleando el material de referencia SRM 998 a una temperatura de 130 °C y tiempos de hidrólisis de 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos. El porcentaje de hidrólisis se calculó dividiendo las cantidades de aminoácidos libres obtenidas entre las esperadas de acuerdo con la cantidad de péptido puesto en el vial y su concentración certificada ($100 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Para la segunda curva de hidrólisis se realizó el mismo experimento a una temperatura de 150 °C y tiempos de 30, 60, 120, 150 y 180 minutos. Los hidrolizados obtenidos se determinaron por GC-MS/MS empleando el método previamente desarrollado. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8.

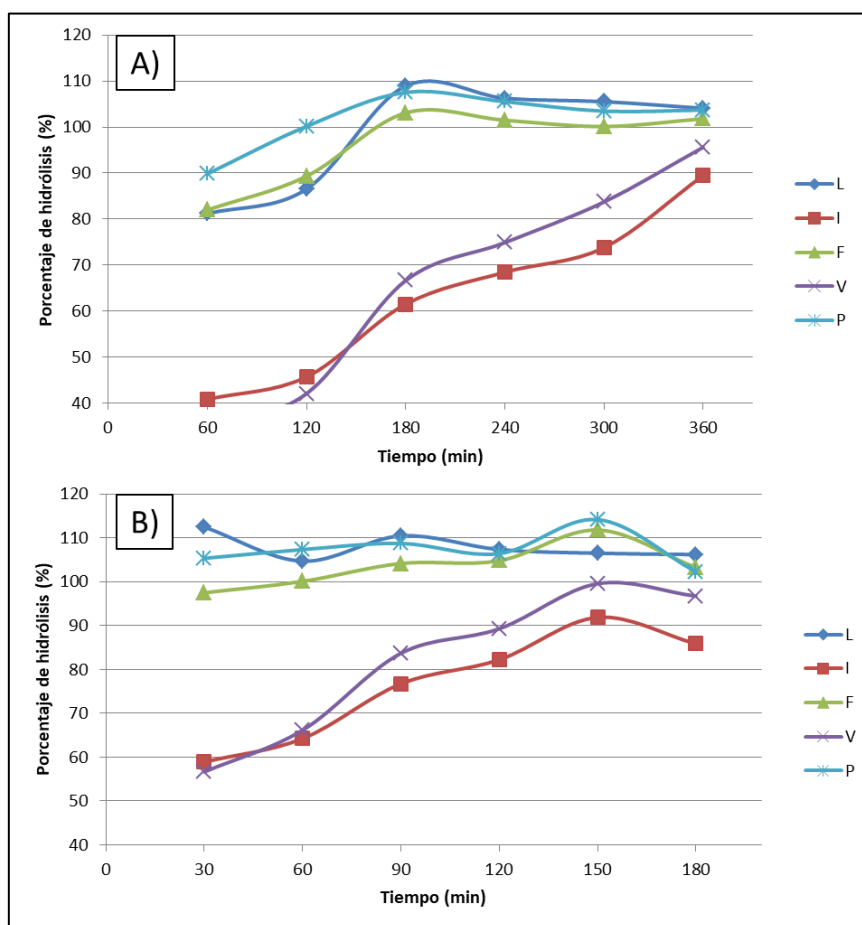


Figura 8. Eficiencia de la de hidrólisis asistida por microondas focalizadas obtenidas para los aminoácidos L, I, F, V y P a diferentes tiempos desde 30 hasta 180 minutos y temperatura: A) 130 °C y B) 150 °C. La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante análisis por dilución isotópica y GC-MSMS.

Como se puede observar, cada aminoácido presenta unos valores y un comportamiento diferente. Los aminoácidos leucina, fenilalanina y prolina se hidrolizan antes que los aminoácidos valina y leucina. De hecho, se podría cuantificar este péptido a partir de las concentraciones de leucina, fenilalanina y prolina encontradas en los hidrolizados realizando una hidrólisis del péptido durante 180 minutos a 130 °C o durante 30 minutos a 150 °C. Sin embargo, dado que valina e

isoleucina son aminoácidos muy abundantes en las proteínas⁶³, sería deseable obtener unas condiciones de hidrólisis que permitan medir la concentración del péptido utilizando el mayor número posible de aminoácidos. Por otro lado, al comparar la Figura 8A y 8B se observa que incrementar 20 °C supone reducir drásticamente el tiempo necesario para alcanzar un 100% de hidrólisis (de 6h a 2,5 h).

Esta pronunciada disminución del tiempo de hidrólisis ha sido reportada por otros autores y depende no solo de la temperatura empleada, sino también de otros factores como el número de aminoácidos, la estructura del péptido o el ácido empleado. En ese sentido, se ha de resaltar que se realizaron pruebas con condiciones de hidrólisis más agresivas (160 °C) con el fin de reducir el tiempo de hidrólisis, pero se obtuvieron resultados muy variables debido probablemente a la poca estabilidad de los aminoácidos en esas condiciones de hidrólisis. Así mismo, a esa temperatura el equipo alcanzaba una presión cercana al límite de seguridad, por lo que se descartó trabajar a esa temperatura.

Con el fin de disminuir el elevado porcentaje inicial de leucina, prolina y fenilalanina se repitió la hidrólisis a 150 °C empleando una menor potencia de irradiación. La hipótesis inicial es que al irradiar la muestra con menor energía se produce una menor degradación de aminoácidos al inicio de la hidrólisis y se deberían obtener resultados más reproducibles. En esta ocasión se llevó a cabo la determinación del hidrolizado empleando el método de LC-MS/MS para poder determinar también los perfiles de hidrólisis de la arginina y la tirosina y comparar los resultados con los obtenidos por GC. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9.

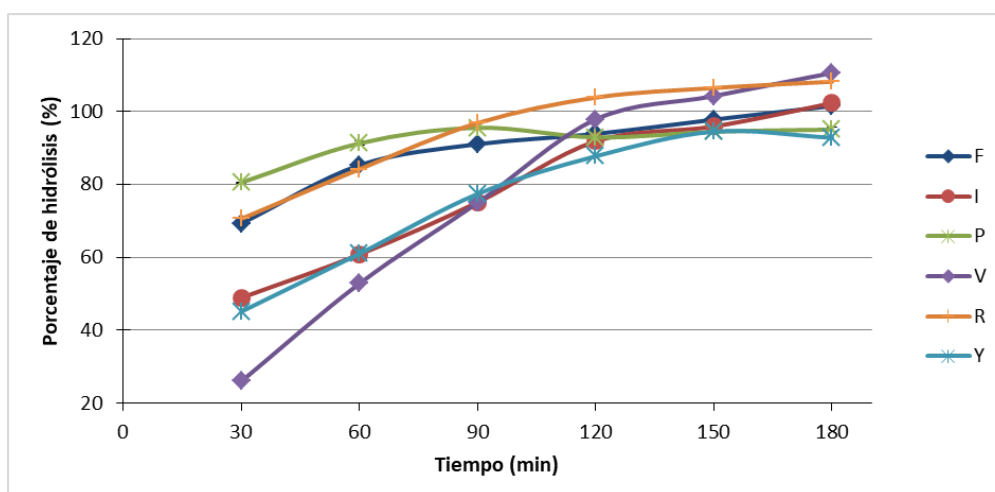


Figura 9. Eficacia de la hidrólisis asistida por microondas obtenida para los aminoácidos L, I, F, V y P a diferentes tiempos desde 30 hasta 180 min. La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante análisis por dilución isotópica y LC-MSMS.

Como se puede observar en esta figura, las curvas de hidrólisis para todos los aminoácidos alcanzan una meseta alrededor del 100% a partir de los 150 minutos. Así mismo, los aminoácidos medidos en las hidrólisis previas presentan perfiles de hidrólisis similares a los obtenidos al realizar la hidrólisis con menor potencia de irradiación. Por otro lado, la arginina alcanza una meseta en un valor un 5% superior al valor teórico y la tirosina se encuentra entre un 5 y un 10% por debajo del valor teórico. En general, los resultados de las medidas en GC y LC son equiparables y similares a los resultados obtenidos por otros autores para estos aminoácidos y en condiciones de hidrólisis similares^{37,38,41}. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió establecer un tiempo de 150 min como valor mínimo de tiempo de hidrólisis.

Con el objetivo de evaluar este procedimiento se estudiaron las condiciones de hidrólisis del otro péptido certificado por un instituto nacional de metrología disponible comercialmente: . péptido-C, material de referencia CRM 6901-c. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la angiotensina I, se llevaron a cabo las hidrólisis a 150 °C durante 90, 120, 150, 180 y 240 minutos. Se eligieron tiempo de hidrólisis mayores que para la angiotensina I por prudencia, pues el péptido-C tiene 31 aminoácidos y, aunque la hidrólisis de un péptido depende de muchos factores, cabría esperar que requiera más tiempo para hidrolizarse completamente. En este caso los hidrolizados se midieron por HPLC-MS/MS y solo se monitorizaron las señales de los aminoácidos prolina, valina y leucina, pues los aminoácidos isoleucina, fenilalanina, arginina y tirosina no están presentes en la estructura del péptido-C. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 10. Como se puede ver, a 120 minutos los aminoácidos prolina, valina y leucina alcanzaron una concentración estable y cercana al 100% de hidrólisis. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores⁶⁴. Además, las curvas de hidrólisis de estos aminoácidos siguen un perfil muy similar a las obtenidas para la angiotensina I. Se puede concluir, por lo tanto, que para los péptidos angiotensina I y péptido-C las condiciones de hidrólisis ácida asistida por microondas de 150°C y 150 minutos proporcionan una hidrólisis cuantitativa de los aminoácidos que se escogieron para la cuantificación de ambos péptidos.

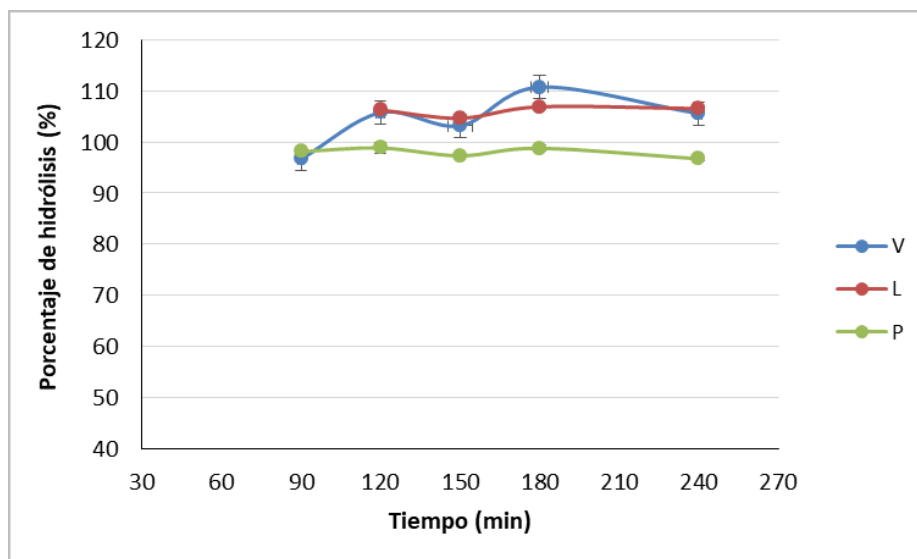


Figura 10. Eficacia de la hidrólisis asistida por microondas del péptido C obtenida a distintos tiempos (desde 90 hasta 240 min) a 150 °C para los aminoácidos V, L y P. La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante LC-MS/MS.

II.4.4. Exactitud y precisión del método de hidrólisis por microondas focalizadas

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de hidrólisis que permiten cuantificar la concentración de un péptido a partir de la cuantificación de los aminoácidos presentes en los hidrolizados del mismo, se procedió a estudiar la exactitud y precisión del método. Para ello se hidrolizó y analizó el material de referencia SRM 998 varios días con el fin de estudiar la reproducibilidad diaria y la reproducibilidad entre días. Además, se inyectaron los hidrolizados varias veces para estudiar la repetibilidad. Así mismo, se realizaron 5 blancos para estudiar los límites de detección del método para cada aminoácido. Estos experimentos se realizaron empleando HPLC-MS/MS y GC-MS/MS con fines comparativos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9 y la Tabla 10.

Tabla 9. Concentraciones obtenidas para los 6 aminoácidos medidos por HPLC-MS/MS para la hidrólisis de angiotensina I a 150 °C y 150 min.

Hidrólisis N°	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	F	I	P	V	Y	R
1	101,2 ± 1,3	90,6 ± 0,7	95,4 ± 0,4	99,4 ± 3,8	91,2 ± 1,3	104,7 ± 2,6
2	112,3 ± 1,0	98,9 ± 0,8	99,3 ± 1,0	104,7 ± 3,8	100,5 ± 1,3	110,5 ± 4,2
3	101,2 ± 1,2	92,0 ± 5,0	93,7 ± 0,3	93,0 ± 1,1	91,7 ± 0,6	102,8 ± 0,8
4	100,4 ± 1,4	97,3 ± 0,3	93,4 ± 0,2	102,2 ± 0,7	86,7 ± 2,5	108,3 ± 1,3
5	100,7 ± 0,3	99,0 ± 1,2	94,1 ± 0,6	102,6 ± 1,2	86,8 ± 1,1	109,2 ± 0,9
Promedio	103,2 ± 5,1	95,6 ± 4,0	95,2 ± 2,4	100,4 ± 4,5	91,4 ± 5,6	107,1 ± 3,2
LOD	0,27	0,15	0,13	0,16	0,31	0,18

Tabla 10. Concentraciones obtenidas para los 5 aminoácidos medidos por GC-MS/MS para la hidrólisis de angiotensina I a 150 °C y 150 min.

Hidrólisis N°	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	F	I	P	V	L
1	121,9 ± 15,7	93,2 ± 3,0	95,8 ± 1,2	97,5 ± 0,6	110,1 ± 5,2
2	106,6 ± 6,3	91,8 ± 2,0	96,8 ± 3,0	94,0 ± 1,1	110,6 ± 0,9
3	98,9 ± 1,7	92,1 ± 1,0	93,8 ± 1,9	94,4 ± 1,4	117,1 ± 8,2
4	107,3 ± 1,5	93,9 ± 1,8	94,4 ± 0,3	95,8 ± 0,6	113,2 ± 4,8
5	105,7 ± 11,8	100,2 ± 2,5	112,3 ± 1,6	110,7 ± 2,1	130,9 ± 4,8
Promedio	108,0 ± 8,4	94,2 ± 3,5	98,6 ± 7,8	98,5 ± 7,0	116,4 ± 8,6
LOD	0,80	0,43	0,20	0,19	0,43

En lo que respecta a la exactitud, para las determinaciones por LC, los aminoácidos fenilalanina, valina, prolina e isoleucina proporcionan valores que concuerdan con los valores certificados, teniendo en cuenta la desviación estándar de los resultados. Sin embargo, las concentraciones de arginina y tirosina se desvían ligeramente, $107,1 \pm 3,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $91,4 \pm 5,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente, del valor certificado. Cuando se emplea la GC, las concentraciones de leucina ($116,4 \pm 8,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y fenilalanina ($108,0 \pm 8,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) están ligeramente por encima del valor certificado, mientras que la isoleucina ($94,2 \pm 3,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presenta un valor ligeramente por debajo del teórico.

Las desviaciones estándar relativas obtenidas para LC entre inyecciones presentaron valores cercanos al 1% para todos los aminoácidos. Sin embargo, las medidas por GC presentaron valores superiores para todos los aminoácidos. Así mismo, los valores de reproducibilidad de hidrólisis independientes (n=5) fueron más exactos y precisos en las determinaciones realizadas por LC y, dado que las hidrólisis fueron iguales en ambos casos, de estos resultados se deduce que la determinación por GC-MS/MS empleando el método desarrollado es menos preciso que la determinación por LC-MS/MS.

Por último, se determinó la reproducibilidad entre días realizando 5 hidrólisis diarias durante tres días (Tabla 11). Los hidrolizados se determinaron por LC-MS/MS, al haberse obtenido con esta técnica mejores resultados en el experimento previo. La reproducibilidad entre días, en torno al 5%, resultó similar a la reproducibilidad de las hidrólisis realizadas el mismo día. Por todo ello, se puede concluir que el método desarrollado de hidrólisis ácida de péptidos asistida por microondas proporciona resultados reproducibles.

Por último, se calcularon los LODs por GC-MS/MS y HPLC-MS/MS para cada aminoácido. Como se puede observar comparando las Tablas 9 y 10 se obtienen mejores LODs (más bajos) por HPLC-MS/MS que por GC-MS/MS debido a la mayor dispersión de las medidas realizadas por esta última técnica.

Tabla 11. Concentraciones obtenidas para los 6 aminoácidos medidos por HPLC-MS/MS para la hidrólisis de angiotensina I a 150 °C y 150 min. Reproducibilidad entre días.

	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	F	I	P	V	Y	R
Día 1	103,2 \pm 5,1	95,6 \pm 4,0	95,2 \pm 2,4	100,4 \pm 4,5	91,4 \pm 5,6	107,1 \pm 3,2
Día 2	104,3 \pm 1,1	90,4 \pm 3,8	93,4 \pm 0,9	97,9 \pm 3,2	85,7 \pm 4,6	100,2 \pm 2,9
Día 3	98,0 \pm 4,5	91,2 \pm 2,6	93,5 \pm 1,3	98,5 \pm 2,5	85,7 \pm 3,2	99,3 \pm 1,5
Promedio	101,8 \pm 3,4	92,4 \pm 2,8	94,0 \pm 1,0	98,9 \pm 1,3	87,6 \pm 3,3	102,2 \pm 4,3

II. 4.5. Síntesis y purificación de Angiotensina I natural y marcada

La disponibilidad comercial de péptidos marcados isotópicamente es reducida y aún menor si se pretende adquirir péptidos mínimamente marcados. A pesar de que algunas empresas proporcionan péptidos diseñados por el cliente, el precio de estos suele ser muy elevado. Por ello, se decidió llevar a cabo la síntesis de Angiotensina I (natural y marcada en $^{13}\text{C}_1$ -valina) empleando el procedimiento de síntesis en fase sólida (SPPS) descrito previamente⁶⁵. Los productos de la síntesis se purificaron con cromatografía líquida semi-preparativa según las condiciones recogidas en la Tabla 12. Se revisaron los cromatogramas de los productos de la síntesis antes y después de la purificación midiendo en modo scan un rango de masas entre 100 y 1500 m/z tras la inyección de una disolución concentrada (100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Estos cromatogramas se presentan en la Figura 11. En esta figura se presenta también el espectro de masas del pico más intenso del cromatograma que, como puede observarse presenta un espectro de masas con la m/z del ion monocargado a 1296,7 coincidente con la masa del ion molecular de la Angiotensina I natural. Por otro lado, para el péptido marcado se obtuvo un espectro de masas con una m/z del ion monocargado a 1297,7 m/z (espectro de masas no mostrado). No obstante, las m/z más intensas en ambos espectros fueron las correspondientes al ion con dos y tres cargas: m/z para el péptido natural a 649,0 y 433,0, y para el péptido marcado a 649,5 y 433,3.

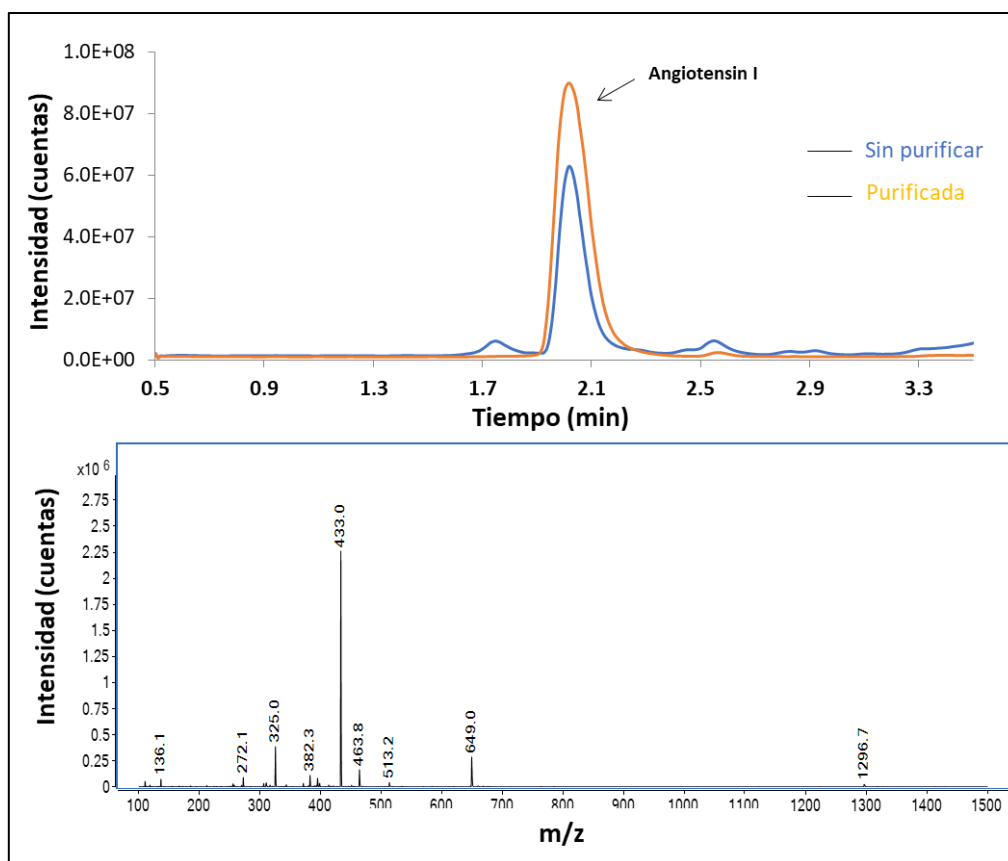


Figura 11. Cromatograma de angiotensina I antes y después de la purificación por HPLC preparativo y espectro de masas obtenido al tiempo de retención del pico cromatográfico más intenso.

Por otro lado, prácticamente la totalidad de los iones detectados por MS correspondían al péptido objetivo ya que no se encontraron picos cromatográficos secundarios a lo largo del cromatograma. Generalmente, las impurezas en este tipo de síntesis se deben a productos con una secuencia peptídica incompleta y productos con una secuencia fallida (incorporación errónea). En la **Tabla 12** se presentan las principales impurezas esperadas para estos péptidos y sus correspondientes m/z. Se realizó una medida por LC-MS con detección en SIM empleando los m/z de la **Tabla 21** para comprobar la presencia de las impurezas, no encontrándose ninguna de ellas. En todo caso, se optó por realizar una purificación por cromatografía semi-preparativa con el objetivo de obtener un sólido puro y, potencialmente, con menos sales y evitar de este modo eventuales problemas en los experimentos posteriores.

Tabla 12. Posibles impurezas en la síntesis de angiotensina I.

Nombre	Secuencia	[M+3H] ³⁺ (m/z)
Ang I	DRVYIHPFHL	433
Ang (1-9)	DRVYIHPFH	395
Ang (2-10)	RVYIHPFHL	394
Ang (4-10)	IHPFHL	309
Ang II	DRVYIHPF	523
Ang III	RVYIHPF	466

II. 4.6. Medida de la composición isotópica de los péptidos sintetizados empleando LC-ESI-MS/MS y validación del método MRM

Con el fin de estudiar la pureza espectral de la angiotensina I natural y, posteriormente, el enriquecimiento isotópico de la angiotensina I marcada, se seleccionó el clúster del ion molecular (1295-1300). Se inyectaron 5 réplicas de disoluciones que contenían 10 µg·g⁻¹ del péptido y se monitorizaron las intensidades de cada m/z en modo SIM. En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para ambos péptidos, observándose una buena pureza espectral y un enriquecimiento isotópico acorde con el de la valina utilizada para el marcaje isotópico de la angiotensina I. A continuación, se estudió la fragmentación de los iones más abundantes de la Angiotensina I natural y marcada empleando diferentes energías de colisión. La Figura 12 muestran los espectros de ion producto para una energía de colisión de 10 eV para los iones 432,8 (angiotensina natural) y 433,2 (angiotensina marcada). Como se puede observar en el rango alto de m/z, los iones presentes en el espectro de la angiotensina marcada se encuentran una unidad de m/z desplazados, conservando por tanto la marca isotópica. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron los fragmentos b₄⁺ ([DRVYIH]-CO₂H, m/z 534) y b₅⁺ ([DRVYIHP]-CO₂H, m/z 647) para llevar a cabo los siguientes estudios, debido a su elevada intensidad y especificidad. Así mismo, dado que estos iones conservan el aminoácido valina en su estructura, los iones producto de la angiotensina marcada seguirán desplazados una unidad de masa respecto del mismo producto de la angiotensina natural.

Tabla 13. Pureza espectral obtenida para la angiotensina I natural sintetizada y el enriquecimiento isotópico obtenido para la angiotensina I sintetizada. La incertidumbre de los resultados corresponde a n=5 inyecciones en el sistema LC-ESI-MS/MS

Modo de adquisición	Fórmula del fragmento	Cluster (m/z)	X _M ± d.e. (%)	X _{M-1H} ± d.e. (%)	X _{M-2H} ± d.e. (%)	Enriquecimiento isotópico ± d.e. (%)
SIM	C ₆₂ H ₉₂ N ₁₇ O ₁₄	1295-1302	98,61 ± 0,16	1,51 ± 0,12	-	99,24 ± 0,07
MS/MS	C ₂₄ H ₃₆ N ₇ O ₇	532-539	82,96 ± 0,08	5,33 ± 0,04	10,99 ± 0,04	99,20 ± 0,31
	C ₂₉ H ₄₇ N ₈ O ₇	645-651	99,50 ± 0,11	0,46 ± 0,02	0,08 ± 0,00	99,14 ± 0,05

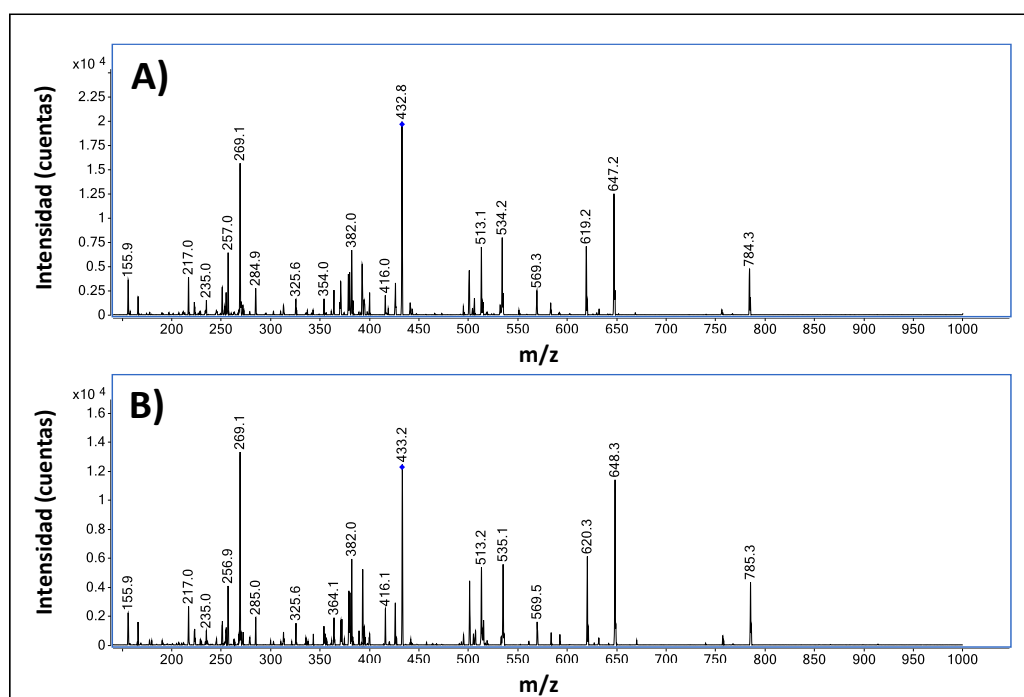


Figura 12. Espectros de masa de ion producto de los iones A) 432,8 (angiotensina natural) y B) 433,2 (angiotensina marcada).

Las transiciones MRM seleccionadas (Tabla 14) se midieron utilizando baja resolución en el primer cuadrupolo con el fin de transmitir todos los isotopólogos del clúster a la celda de colisión siguiendo una estrategia de cuantificación que ha sido desarrollada previamente en nuestro laboratorio⁶⁶. Como se ha explicado en la introducción, la cuantificación del analito por ID-MS empleando análogos mínimamente marcados se puede realizar mediante una regresión lineal múltiple o IPD a partir de la cual se pueden obtener las fracciones molares del péptido natural y marcado isotópicamente. Para ello es necesario que los iones precursores del péptido natural y marcado se transmitan a la celda de colisión de forma simultánea. Esto se consigue disminuyendo la resolución del primer cuadrupolo ajustando los parámetros del equipo Agilent 6460 *width offset* (*W*) y el *gain offset* (*G*) del espectrómetro de masas⁶⁷.

Se crearon métodos de adquisición empleando 4 condiciones diferentes: A) $G=20$, $W=4$, B) $G=10$, $W=4$, C) $G=10$, $W=2$, D) $G=10$, $W=1$. En primer lugar se realizaron barridos de iones precursores en mezclas de péptido marcado y para los dos iones producto principales de cada péptido. Los resultados de esta optimización para el ion b_5^+ de cada péptido se presentan en la Figura 13. En ella se pueden observar como el valor de la anchura de pico a mitad de altura FWHM (Full Width Half Maximum) de los iones precursores se va reduciendo al disminuir el valor de los parámetros seleccionados. El objetivo de este experimento es obtener empíricamente qué valores instrumentales aseguran la transmisión simultánea de los iones precursores seleccionados para el péptido natural y marcado. Por otro lado, se ha de tener en cuenta que cuanto mayor sea la ventana mayor es la probabilidad de que se transmitan iones interferentes de otros analitos, lo que exige en definitiva tener que alcanzar unos valores de compromiso⁶⁸. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió emplear un valor W y G de 10 y 2, respectivamente, con el fin de obtener una resolución que permite transmitir simultáneamente 7 relaciones m/z .

Con el fin de validar esta metodología se estudió la composición isotópica de la angiotensina I natural (pureza espectral) y marcada (enriquecimiento isotópico) empleando medidas MRM y el método de baja resolución desarrollado. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13. Como se puede observar, los resultados de enriquecimiento isotópico son similares a los obtenidos con las medidas en modo SIM. Por otro lado, en el clúster del ion 534 se observan contribuciones del 11% y del 5% a la $M-2$ y $M-1$, respectivamente, lo que puede ser debida a una interferencia. Sin embargo, el valor obtenido para el enriquecimiento isotópico empleando ese clúster es igual al encontrado con el otro clúster y en modo SIM, por lo que se demuestra que es posible llevar a cabo determinaciones exactas del enriquecimiento isotópico de la molécula marcada corrigiendo las posibles contribuciones de interferentes en la molécula natural.

Por otro lado, también se compararon los valores teóricos de las distribuciones isotópicas de los péptidos natural y marcado con los valores experimentales al realizar 5 inyecciones de la disolución preparada para estudiar la composición isotópica de los iones seleccionados. Este procedimiento es similar al realizado para los aminoácidos- excepto en lo que se refiere a la resolución empleada. Como se puede observar en la Tabla 14, los resultados obtenidos muestran una buena exactitud y precisión. Así mismo, se observa que la primera transición del clúster 534 de la angiotensina I marcada está interferida, tal y como se había descrito en la pureza espectral del mismo clúster para las medidas en SIM, por lo que si empleásemos el valor teórico se cometerían errores negativos en la cuantificación de la angiotensina I natural, por lo que se optó por emplear los valores experimentales en los siguientes experimentos.

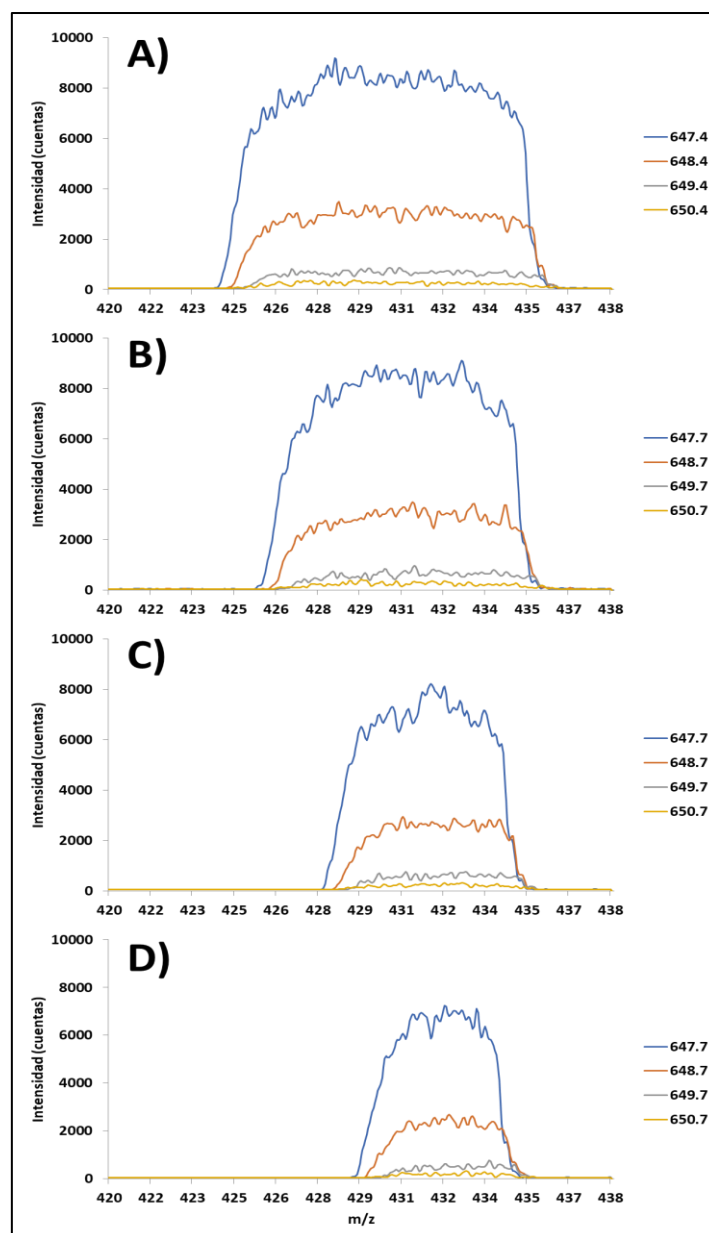


Figura 13. Barrido de iones precursores de la mezcla de Angiotensina natural y marcada isotópicamente para los iones producto 647,7, 648,7, 649,7 y 650,7 correspondientes al ion b_5^+ en cuatro condiciones de transmisión de iones diferentes: A) G=20, W=4, B) G=10, W=4, C) G=10, W=2, D) G=10, W=1. (G= gain offset, W= width offset).

Tabla 14. Transiciones medidas, valores teóricos y experimentales de las abundancias isotópicas de las transiciones y desviación estándar de las medidas realizadas por HPLC-MS/MS para angiotensina I natural y marcada.

Compuesto	Transición	Valor teórico	Valor experimental	Desviación estándar (n=5)
Angiotensina I	433→534	0,7378	0,7311	0,0006
	433→535	0,2154	0,2225	0,0007
	433→536	0,0410	0,0399	0,0005
	433→537	0,0058	0,0065	0,0002
¹³ C ₁ -Angiotensina I	433→534	0,0057	0,0253	0,0010
	433→535	0,7416	0,7377	0,0042
	433→536	0,2084	0,1983	0,0035
	433→537	0,0389	0,0387	0,0015
Angiotensina I	433→647	0,6870	0,6852	0,0013
	433→648	0,2488	0,2519	0,0014
	433→649	0,0551	0,0530	0,0005
	433→650	0,0091	0,0100	0,0002
¹³ C ₁ -Angiotensina I	433→647	0,0054	0,0075	0,0003
	433→648	0,7053	0,7087	0,0031
	433→649	0,2397	0,2351	0,0029
	433→650	0,0497	0,0487	0,0014

II. 4.7. Cuantificación de Angiotensina I de forma trazable al SI

Los métodos anteriormente descritos se emplearon para determinar, empleando dos estrategias, la concentración de una disolución de aproximadamente 70 µg·g⁻¹ de angiotensina I natural sintetizada y purificada en el laboratorio (Figura 14). Por un lado, la angiotensina I natural se hidrolizó de acuerdo con el método optimizado y su concentración se determinó por dilución isotópica LC-MS/MS utilizando aminoácidos marcados isotópicamente que habían sido previamente estandarizados frente a patrones certificados de aminoácidos naturales empleando la dilución isotópica inversa y LC-MS/MS. Así mismo, el material de referencia SRM 998 se empleó para cuantificar por dilución isotópica inversa y LC-MS/MS una disolución de Angiotensina I marcada isotópicamente que se había sintetizado y purificado en el laboratorio para utilizarla posteriormente en la cuantificación, por dilución isotópica y LC-MS/MS, de acuerdo con el método descrito anteriormente, de la disolución de angiotensina I natural sintetizada y purificada previamente en el laboratorio. Los resultados obtenidos a través de las dos estrategias se presentan en la Figura 15.

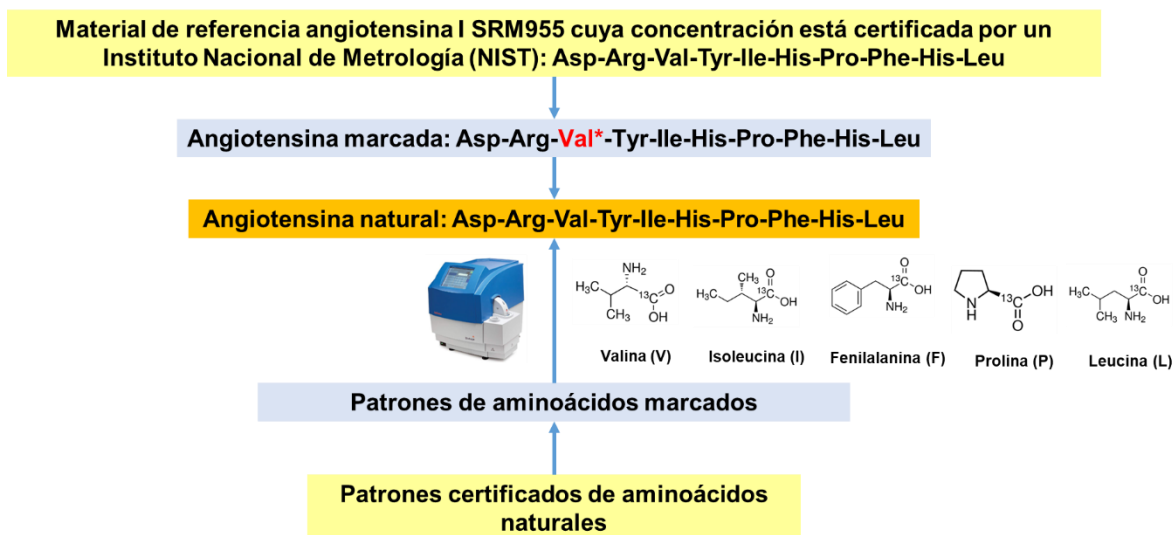


Figura 14. Esquema de las dos estrategias utilizadas para la cuantificación de la angiotensina I natural sintetizada en el laboratorio.

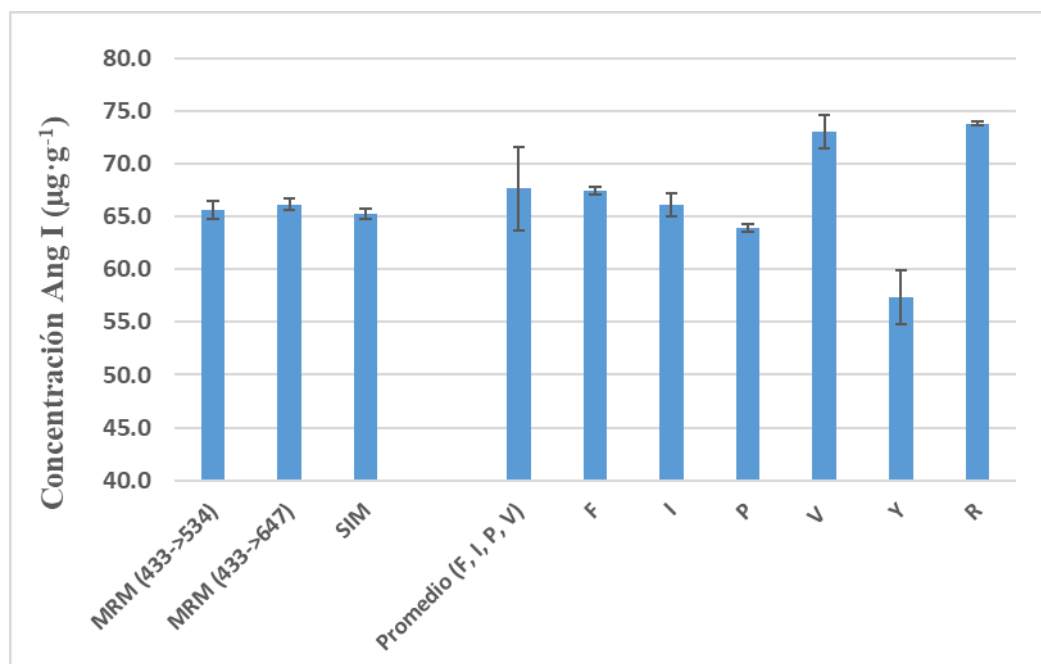


Figura 15. Concentración de angiotensina I natural obtenida a través de las dos estrategias de medida.

Como puede observarse, los resultados obtenidos por ambas vías coinciden en gran medida, a excepción de aquellos obtenidos utilizando algunos aminoácidos (tirosina y arginina). No obstante, los resultados obtenidos para los diferentes aminoácidos son coherentes con los encontrados durante la optimización de la hidrólisis. Así, las concentraciones del péptido encontradas a partir del análisis de la tirosina y arginina en los hidrolizados es un 90 y 110% respecto del valor esperado, respectivamente. También se encontró un valor superior al esperado

utilizando la concentración de valina en los hidrolizados para calcular la concentración de angiotensina I. Dado que, en general, la mayoría de las publicaciones no consideran la tirosina ni la arginina aminoácidos estables y fiables^{34,35}, se ha optado por promediar los cuatro aminoácidos restantes, obteniéndose un valor que concuerda con el obtenido siguiendo la otra estrategia.

Tal y como describió Stocks *et. al.* los valores de los diferentes aminoácidos pueden combinarse (promediarse) para obtener un único valor de pureza (concentración) de un péptido¹⁵. Sin embargo, actualmente sigue sin haber un consenso sobre cuál es el modelo estadístico más adecuado para obtener ese valor, ya que el número de aminoácidos empleados en la determinación y su identidad es determinante en el resultado final. Algunos autores solamente consideran adecuado usar los valores obtenidos para aminoácido “estables”, como la prolina y la fenilalanina^{36,39,41}. Sin embargo, ese criterio es vago, pues tampoco hay un consenso sobre qué aminoácidos son más estables. La estabilidad de los aminoácidos dependerá de las condiciones de hidrólisis: el tiempo, la temperatura, el pH, la concentración del agente de hidrólisis, etc. Esta es la razón por la que en este trabajo se ha llevado a cabo una optimización de las condiciones de hidrólisis para dos péptidos. En nuestro caso, los aminoácidos más adecuados para obtener el valor promedio más exacto de la pureza de la Angiotensina I son la fenilalanina, la valina, la isoleucina y la prolina. Así mismo, estos aminoácidos también proporcionaron valores exactos y reproducibles en las hidrólisis del péptido-C (en ese caso, no se midió la fenilalanina y se midió leucina en lugar de isoleucina).

Sin embargo, obtener un valor de pureza de un péptido a través del promedio de n aminoácidos individuales repercute en una elevada incertidumbre, ya que el resultado depende de n determinaciones independientes, cada una de ellas con su incertidumbre. Por lo tanto, no se recomienda realizar el promedio de valores de aminoácidos individuales si lo que se requiere es obtener resultados muy precisos. Así mismo, los valores de incertidumbre son similares a los publicados por otros autores^{31,64,70}.

II. 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un procedimiento de hidrólisis de péptidos empleando microondas focalizadas y ácido clorhídrico. Para ello se han optimizado las condiciones de hidrólisis de dos materiales de referencia de péptidos (angiotensina I y péptido C). Los hidrolizados fueron cuantificados por dilución isotópica empleando tanto HPLC-MS/MS como GC-MS/MS y aminoácidos marcados isotópicamente previamente estandarizados utilizando un material de referencia de aminoácidos naturales garantizando así la trazabilidad de las medidas al SI.

Los aminoácidos que se hidrolizaron más rápidamente empleando el horno de microondas fueron la leucina, la prolina y la fenilalanina, mientras que la valina y la isoleucina requirieron, al menos, 150 min a 150 °C. No se consiguió obtener una hidrólisis cuantitativa para todos los aminoácidos, con recuperaciones del 90% para la tirosina y del 110% para la arginina. En todo caso, el método de hidrólisis asistido por microondas focalizadas que se ha desarrollado en este trabajo permite reducir los tiempos de hidrólisis de 48 a 2,5 h.

Se ha sintetizado y purificado angiotensina I natural y marcada. La pureza de estas disoluciones se ha evaluado utilizando dos estrategias. Por un lado, la concentración del péptido natural se evaluó tras su hidrólisis seguido del análisis por dilución isotópica LC-MS/MS empleando aminoácidos marcados isotópicamente previamente estandarizados frente a una mezcla certificada de aminoácidos naturales. Por otro lado, la concentración del péptido natural se determinó por dilución isotópica LC-MS/MS (empleando el péptido sintetizado mínimamente marcado en ¹³C previamente estandarizado también por dilución isotópica frente a un material de referencia certificado). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las dificultades a la hora de obtener hidrólisis rápidas y cuantitativas de los péptidos y la necesidad de llevar a cabo estudios sistemáticos como los realizados en este estudio para asegurar la calidad metrológica de los resultados obtenidos. y esta última se ha empleado para cuantificar un material de referencia de angiotensina I natural a través de un método de dilución isotópica y péptidos solapados espectralmente. Este método emplea una baja resolución en el primer cuadrupolo, de tal forma que se transmiten simultáneamente los dos clústeres completos seleccionados para el péptido natural y el marcado, lo cual es indispensable con el fin de asegurar medidas exactas para picos no resueltos espectralmente.

Los métodos desarrollados han sido empleados para obtener dos valores de concentración de una disolución de angiotensina I natural sintética. El hecho de que ambos valores coincidan significa que la metodología propuesta para obtener la pureza de péptidos es válida, lo que permite realizar cuantificaciones de bajo coste sin emplear el péptido certificado.

II. 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pritchard, C.; Quaglia, M.; Mussell, C.; Burkitt, W. I.; Parkes, H.; O'Connor, G. Fully Traceable Absolute Protein Quantification of Somatropin That Allows Independent Comparison of Somatropin Standards. *Clin Chem* **2009**, *55* (11). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.124354>.
- (2) Kaiser, P.; Akerboom, T.; Ohlendorf, R.; Reinauer, H. Liquid Chromatography-Isotope Dilution-Mass Spectrometry as a New Basis for the Reference Measurement Procedure for Hemoglobin A1c Determination. *Clin Chem* **2010**, *56* (5). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.139477>.
- (3) Torma, A. F.; Groves, K.; Biesenbruch, S.; Mussell, C.; Reid, A.; Ellison, S.; Cramer, R.; Quaglia, M. A Candidate Liquid Chromatography Mass Spectrometry Reference Method for the Quantification of the Cardiac Marker 1-32 B-Type Natriuretic Peptide. *Clin Chem Lab Med* **2017**, *55* (9). <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1054>.
- (4) Josephs, R. D.; Stoppacher, N.; Westwood, S.; Wielgosz, R. I.; Li, M.; Quaglia, M.; Melanson, J.; Martos, G.; Prevoo, D.; Wu, L.; Scapin, S.; Öztug Senal, M.; Wong, L.; Jeong, J.-S.; Chan, K. W. Y.; Arsene, C. G.; Park, S.-R. Concept Paper on SI Value Assignment of Purity - Model for the Classification of Peptide/Protein Purity Determinations. *Journal of Chemical Metrology* **2017**, *11* (1). <https://doi.org/10.25135/jcm.1.17.02.030>.
- (5) Li, C.; Bhavaraju, S.; Thibeault, M. P.; Melanson, J.; Blomgren, A.; Rundlöf, T.; Kilpatrick, E.; Swann, C. J.; Rudd, T.; Aubin, Y.; Grant, K.; Butt, M.; Shum, W. K.; Kerim, T.; Sherwin, W.; Nakagawa, Y.; Pavón, S.; Arrastia, S.; Weel, T.; Pola, A.; Chalasani, D.; Walfish, S.; Atouf, F. Survey of Peptide Quantification Methods and Comparison of Their Reproducibility: A Case Study Using Oxytocin. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, *166*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.028>.
- (6) Cobbaert, C. M.; Althaus, H.; Begcevic Brkovic, I.; Ceglarek, U.; Coassin, S.; Delatour, V.; Deprez, L.; Dikaios, I.; Dittrich, J.; Hoofnagle, A. N.; Kostner, G. M.; Kronenberg, F.; Kuklennyik, Z.; Prinzing, U.; Vesper, H. W.; Zegers, I.; Ruhaak, L. R. Towards an SI-Traceable Reference Measurement System for Seven Serum Apolipoproteins Using Bottom-Up Quantitative Proteomics: Conceptual Approach Enabled by Cross-Disciplinary/Cross-Sector Collaboration. *Clin Chem* **2021**, *67* (3), 478–489. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa239>.
- (7) Smit, N. P. M.; Ruhaak, L. R.; Romijn, F. P. H. T. M.; Pieterse, M. M.; van der Burgt, Y. E. M.; Cobbaert, C. M. The Time Has Come for Quantitative Protein Mass Spectrometry Tests That Target Unmet Clinical Needs. *J Am Soc Mass Spectrom* **2021**, *32* (3), 636–647. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00379>.

- (8) Huynh, H. H.; Bœuf, A.; Vinh, J.; Delatour, V.; Liu, Q.; Chen, Y.; Schneider, K.; Kaiser, P.; Hausfater, P.; Schütz, P.; Tsatsanis, C.; Dupuy, A.; Pastori, S.; Pfannkuche, J.; Yuan, C.; Machetanz, B.; Rottmann, M.; Rybin, A.; Parker, N.; Odarjuk, J.; Thomas, B.; Solari, M.; Paulsen, K.; Ruetten, S.; Seaver, L.; Briand, H.; Tourneur, C.; Pallavicini, L.; Corocher, N.; Ogbonna, G.; Patru, M.; Bryan, P.; Zion, S.; Grimmmler, M.; Masetto, T.; Jauria, P. Evaluation of the Necessity and the Feasibility of the Standardization of Procalcitonin Measurements: Activities of IFCC WG-PCT with Involvement of All Stakeholders. *Clinica Chimica Acta* **2021**, *515*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.004>.
- (9) Rappold, B. A. Clinical Protein Analysis by Mass Spectrometry: A New Higher Order. *Clinical Chemistry*. Oxford University Press March 1, 2021, pp 461–462. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa335>.
- (10) Li, M.; Josephs, R. D.; Daireaux, A.; Choteau, T.; Westwood, S.; Martos, G.; Wielgosz, R. I.; Li, H. Structurally Related Peptide Impurity Identification and Accurate Quantification for Synthetic Oxytocin by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03154-5>/Published.
- (11) Wu, P.; Ye, S.; Li, M.; Li, H.; Kan, Y.; Yang, Z. Impurity Identification and Quantification for Arginine Vasopressin by Liquid Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2020**, *34* (12). <https://doi.org/10.1002/rcm.8799>.
- (12) Stoppacher, N.; Josephs, R. D.; Daireaux, A.; Choteau, T.; Westwood, S. W.; Wielgosz, R. I. Impurity Identification and Determination for the Peptide Hormone Angiotensin i by Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and the Metrological Impact on Value Assignments by Amino Acid Analysis Amino Acid Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (25), 8039–8051. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6953-7>.
- (13) Li, M.; Josephs, R. D.; Daireaux, A.; Choteau, T.; Westwood, S.; Wielgosz, R. I.; Li, H. Identification and Accurate Quantification of Structurally Related Peptide Impurities in Synthetic Human C-Peptide by Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (20), 5059–5070. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1155-y>.
- (14) Stoppacher, N.; Josephs, R. D.; Daireaux, A.; Choteau, T.; Westwood, S.; Wielgosz, R. I. Accurate Quantification of Impurities in Pure Peptide Material - Angiotensin I: Comparison of Calibration Requirements and Method Performance Characteristics of Liquid Chromatography Coupled to Hybrid Tandem Mass Spectrometry and Linear Ion Trap High-Resolution Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, *29* (18), 1651–1660. <https://doi.org/10.1002/rcm.7261>.

- (15) Stocks, B. B.; Thibeault, M. P.; Meija, J.; Melanson, J. E. Assessing MS-Based Quantitation Strategies for Low-Level Impurities in Peptide Reference Materials: Application to Angiotensin II. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (26), 6963–6972. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1302-5>.
- (16) Khalil, A.; Kashif, M. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Quantitative Analysis: A Review for Its Application in the Chemical, Pharmaceutical and Medicinal Domains. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2021. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.2000359>.
- (17) Huang, T.; Zhang, W.; Dai, X.; Zhang, X.; Quan, C.; Li, H.; Yang, Y. Precise Measurement for the Purity of Amino Acid and Peptide Using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance. *Talanta* **2014**, *125*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.059>.
- (18) Leblanc, K. L.; Le, P. M.; Meija, J.; Ding, J.; Melanson, J. E.; Mester, Z. Preparation and Certification of Natural and ⁸²Se-Labelled Selenomethionine Reference Materials. *J Anal At Spectrom* **2021**, *36* (2), 416–428. <https://doi.org/10.1039/d0ja00411a>.
- (19) Hoffman, D. W.; Rasmussen, C. Absolute Carbon Stable Isotope Ratio in the Vienna Peedee Belemnite Isotope Reference Determined by ¹H NMR Spectroscopy. *Anal Chem* **2022**, *94* (13). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04565>.
- (20) Wang, S.; Wu, P.; Li, M.; Huang, T.; Shi, N.; Feng, L.; Li, H. Mass Balance Method for SI-Traceable Purity Assignment of Synthetic Oxytocin. *J Pharm Biomed Anal* **2022**, *207*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114401>.
- (21) Westwood, S.; Choteau, T.; Daireaux, A.; Josephs, R. D.; Wielgosz, R. I. Mass Balance Method for the SI Value Assignment of the Purity of Organic Compounds. *Anal Chem* **2013**, *85* (6). <https://doi.org/10.1021/ac303329k>.
- (22) Yan, J.; Wang, M.; Yang, M.; Zhou, J.; Xue, X.; Wang, T. Study of SI-Traceable Purity Assessment of Bovine Lactoferrin Using Mass Balance Approach and Amino Acid-Based Isotope Dilution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Chem* **2022**, *385*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132674>.
- (23) Liu, H.; Cheow, P. S.; Yong, S.; Chen, Y.; Liu, Q.; Teo, T. L.; Lee, T. K. Determination of Purity Values of Amino Acid Reference Materials by Mass Balance Method: An Approach to the Quantification of Related Structure Impurities. *Anal Bioanal Chem* **2020**, *412* (29), 8023–8037. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02936-7>.
- (24) Vemuri, S. Comparison of Assays for Determination of Peptide Content for Lyophilized Thymalfasin. In *Journal of Peptide Research*; 2005; Vol. 65. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00225.x>.

- (25) Josephs, R. D.; Stoppacher, N.; Daireaux, A.; Choteau, T.; Lippa, K. A.; Phinney, K. W.; Westwood, S.; Wielgosz, R. I. State-of-the-Art and Trends for the SI Traceable Value Assignment of the Purity of Peptides Using the Model Compound Angiotensin I. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. April 1, 2018, pp 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.026>.
- (26) Díaz, S. C.; Ruiz Encinar, J.; García Alonso, J. I. Evaluation of Online Carbon Isotope Dilution Mass Spectrometry for the Purity Assessment of Synthetic Peptide Standards. *Anal Chim Acta* **2014**, *844*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.041>.
- (27) Dunn, P. J. H.; Malinovsky, D.; Achar, E.; Clarkson, C.; Goenaga-Infante, H. Systematic Comparison of Post-Column Isotope Dilution Using LC-CO-IRMS with QNMR for Amino Acid Purity Determination. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (27), 7207–7220. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02116-2>.
- (28) Dunn, P. J. H.; Malinovsky, D.; Goenaga-Infante, H. Calibration Strategies for the Determination of Stable Carbon Absolute Isotope Ratios in a Glycine Candidate Reference Material by Elemental Analyser-Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (11). <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7926-1>.
- (29) Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Dupierriis, V.; Couté, Y.; Bruley, C.; Garin, J.; Dupuis, A.; Jaquinod, M.; Brun, V. Introducing AAA-MS, a Rapid and Sensitive Method for Amino Acid Analysis Using Isotope Dilution and High-Resolution Mass Spectrometry. *J Proteome Res* **2012**, *11* (7), 3929–3936. <https://doi.org/10.1021/pr3003326>.
- (30) Gauza-Włodarczyk, M.; Kubisz, L.; Włodarczyk, D. Amino Acid Composition in Determination of Collagen Origin and Assessment of Physical Factors Effects. *Int J Biol Macromol* **2017**, *104*, 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.013>.
- (31) Melanson, J. E.; Thibeault, M. P.; Stocks, B. B.; Leek, D. M.; McRae, G.; Meija, J. Purity Assignment for Peptide Certified Reference Materials by Combining QNMR and LC-MS/MS Amino Acid Analysis Results: Application to Angiotensin II. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (26), 6719–6731. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1272-7>.
- (32) Wang, X.; Wu, L.; Huang, Y.; Su, P.; Yang, Y.; Yang, B.; Zhang, N. Development of a Human Insulin Certified Reference Material with SI-Traceable Purity. *Anal Bioanal Chem* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03965-0>.
- (33) Lee, H.; Lee, J. Peptide Purity Assignment for Antibody Quantification by Combining Isotope Dilution Mass Spectrometry and Liquid Chromatography. *Bull Korean Chem Soc* **2022**. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12511>.

- (34) Burkitt, W. I.; Pritchard, C.; Arsene, C.; Henrion, A.; Bunk, D.; O'Connor, G. Toward Système International d'Unité-Traceable Protein Quantification: From Amino Acids to Proteins. *Anal Biochem* **2008**, *376* (2), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.010>.
- (35) Fountoulakis, M.; Lahm, H. W. Hydrolysis and Amino Acid Composition Analysis of Proteins. *Journal of Chromatography A*. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00721-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00721-3).
- (36) Weiss, M.; Manneberg, M.; Juranville, J. F.; Lahm, H. W.; Fountoulakis, M. Effect of the Hydrolysis Method on the Determination of the Amino Acid Composition of Proteins. *J Chromatogr A* **1998**, *795* (2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00983-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00983-7).
- (37) Kinumi, T.; Sakaguchi, Y.; Takatsu, A. Development of a Certified Reference Material of Human Serum Albumin: Certification and Value Assignment: Via Amino Acid Analyses. *Analytical Methods* **2017**, *9* (31), 4574–4580. <https://doi.org/10.1039/c7ay01415e>.
- (38) Tran, T. T. H.; Jeong, J. S. Optimization of Microwave-Assisted Method for Accelerated Glycated Hemoglobin Quantification from Amino Acids to Proteins. *Mass Spectrometry Letters* **2017**, *8* (3), 53–58. <https://doi.org/10.5478/MSL.2017.8.3.53>.
- (39) Chen, L.; Wang, N.; Li, L. Development of Microwave-Assisted Acid Hydrolysis of Proteins Using a Commercial Microwave Reactor and Its Combination with LC-MS for Protein Full-Sequence Analysis. *Talanta* **2014**, *129*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.042>.
- (40) Lopez, R.; Escudero, L.; D'Amato, R.; Businelli, D.; Trabalza-Marinucci, M.; Cerutti, S.; Pacheco, P. Optimisation of Microwave-Assisted Acid Hydrolysis for the Determination of Seleno-Amino Acids Bound to Proteins in Powdered Milk, Lyophilized Milk and Infant Formula. *Journal of Food Composition and Analysis* **2019**, *79*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.03.016>.
- (41) Pritchard, C.; Torma, F. A.; Hopley, C.; Quaglia, M.; O'Connor, G. Investigating Microwave Hydrolysis for the Traceable Quantification of Peptide Standards Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Biochem* **2011**, *412* (1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.015>.
- (42) Quéro, A.; Jousse, C.; Lequart-Pillon, M.; Gontier, E.; Guillot, X.; Courtois, B.; Courtois, J.; Pau-Roblot, C. Improved Stability of TMS Derivatives for the Robust Quantification of Plant Polar Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2014**, *970*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.040>.
- (43) Calder, A. G.; Garden, K. E.; Anderson, S. E.; Lobley, G. E. Quantitation of Blood and Plasma Amino Acids Using Isotope Dilution Electron Impact Gas Chromatography/Mass Spectrometry with U-13C Amino Acids as Internal Standards. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*

- 1999**, 13 (21). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19991115\)13:21<2080::AID-RCM755>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19991115)13:21<2080::AID-RCM755>3.0.CO;2-O).
- (44) Turgeon, C.; Magera, M. J.; Allard, P.; Tortorelli, S.; Gavrilov, D.; Oglesbee, D.; Raymond, K.; Rinaldo, P.; Matern, D. Combined Newborn Screening for Succinylacetone, Amino Acids, and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clin Chem* **2008**, 54 (4). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101949>.
- (45) Reudelhuber, T. L. Where Hypertension Happens. *Journal of Clinical Investigation*. 2013. <https://doi.org/10.1172/JCI69296>.
- (46) Wenzel, K.; Rajakumar, A.; Haase, H.; Geusens, N.; Hubner, N.; Schulz, H.; Brewer, J.; Roberts, L.; Hubel, C. A.; Herse, F.; Hering, L.; Qadri, F.; Lindschau, C.; Wallukat, G.; Pijnenborg, R.; Heidecke, H.; Riemekasten, G.; Luft, F. C.; Muller, D. N.; Lamarca, B.; Dechend, R. Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies and Increased Angiotensin II Sensitivity in Pregnant Rats. *Hypertension* **2011**, 58 (1). <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.171348>.
- (47) Fountain, J. H.; Lappin, S. L. *Physiology, Renin Angiotensin System*; 2018.
- (48) Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-Angiotensin System Revisited. *Journal of Internal Medicine*. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x>.
- (49) Zhuo, J. L.; Ferrao, F. M.; Zheng, Y.; Li, X. C. New Frontiers in the Intrarenal Renin-Angiotensin System: A Critical Review of Classical and New Paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2013**, 4 (NOV). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00166>.
- (50) Dell'Italia, L. J.; Ferrario, C. M. The Never-Ending Story of Angiotensin Peptides: Beyond Angiotensin I and II. *Circulation Research*. 2013. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301246>.
- (51) Ferrario, C. M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Angiotensin-(1-7): An Evolving Story in Cardiovascular Regulation. In *Hypertension*; 2006; Vol. 47. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000196268.08909.fb>.
- (52) Kehoe, P. G.; Hibbs, E.; Palmer, L. E.; Miners, J. S. Angiotensin-III Is Increased in Alzheimer's Disease in Association with Amyloid- β and Tau Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease* **2017**, 58 (1). <https://doi.org/10.3233/JAD-161265>.
- (53) Ibrahim, M. M. RAS Inhibition in Hypertension. *Journal of Human Hypertension*. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001960>.
- (54) Klijian, A.; Khanna, A. K.; Reddy, V. S.; Friedman, B.; Ortoleva, J.; Evans, A. S.; Panwar, R.; Kroll, S.; Greenfeld, C. R.; Chatterjee, S. Treatment With Angiotensin II Is Associated With

- Rapid Blood Pressure Response and Vasopressor Sparing in Patients With Vasoplegia After Cardiac Surgery: A Post-Hoc Analysis of Angiotensin II for the Treatment of High-Output Shock (ATHOS-3) Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **2021**, 35 (1). <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.08.001>.
- (55) Chen, F.; Cheng, Z.; Peng, Y.; Wang, Z.; Huang, C.; Liu, D.; Wang, B.; Pan, B.; Guo, W. A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-Based Assay for Simultaneous Quantification of Aldosterone, Renin Activity, and Angiotensin II in Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2021**, 1179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122740>.
- (56) Schulz, A.; Jankowski, J.; Zidek, W.; Jankowski, V. Absolute Quantification of Endogenous Angiotensin II Levels in Human Plasma Using ESI-LC-MS/MS. *Clin Proteomics* **2014**, 11 (1). <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-37>.
- (57) Nicolás Carcelén, J.; Marchante-Gayón, J. M.; González, P. R.; Valledor, L.; Cañal, M. J.; Alonso, J. I. G. A Cost-Effective Approach to Produce ¹⁵N-Labelled Amino Acids Employing *Chlamydomonas Reinhardtii* CC503. *Microb Cell Fact* **2017**, 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0759-9>.
- (58) Singh, S. K.; Collins, J. M. New Developments in Microwave-Assisted Solid Phase Peptide Synthesis. In *Methods in Molecular Biology*; 2020; Vol. 2103. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0227-0_6.
- (59) Armirotti, A.; Millo, E.; Damonte, G. How to Discriminate Between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, 18 (1). <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.08.011>.
- (60) Ramaley, L.; Herrera, L. C. Software for the Calculation of Isotope Patterns in Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, 22 (17). <https://doi.org/10.1002/rcm.3668>.
- (61) Corso, G.; Esposito, M.; Gallo, M.; Russo, A. dello; Antonio, M. Transformation of Arginine into Ornithine during the Preparation of Its Tert-butyldimethylsilyl Derivative for Analysis by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Biol Mass Spectrom* **1993**, 22 (12). <https://doi.org/10.1002/bms.1200221205>.
- (62) Hurtado, P. P.; O'Connor, P. B. Differentiation of Isomeric Amino Acid Residues in Proteins and Peptides Using Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2012. <https://doi.org/10.1002/mas.20357>.
- (63) Bruice, P. Y. *Organic Chemistry Bruice*; 2004.

- (64) Kinumi, T.; Goto, M.; Eyama, S.; Kato, M.; Kasama, T.; Takatsu, A. Development of SI-Traceable C-Peptide Certified Reference Material NMIJ CRM 6901-a Using Isotope-Dilution Mass Spectrometry-Based Amino Acid Analyses. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *404* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6097-1>.
- (65) Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Molecular Biotechnology*. 2006. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.
- (66) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Ohlendorf, R.; Henrion, A.; Delatour, V.; García Alonso, J. I. Determination of Cystatin C in Human Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry Using Mass Overlapping Peptides. *J Proteomics* **2014**, *112*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.005>.
- (67) Suárez-Fernández, A.; González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Alonso, J. I. G. Determination of Cystatin C in Human Urine by Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *177*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112889>.
- (68) Fernández, A. S.; Rodríguez-González, P.; Álvarez, L.; García, M.; Iglesias, H. G.; García Alonso, J. I. Multiple Heart-Cutting Two Dimensional Liquid Chromatography and Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry for the Absolute Quantification of Proteins in Human Serum. *Anal Chim Acta* **2021**, *1184*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339022>.
- (69) Kragten, J. Tutorial Review. Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique. *Analyst* **1994**, *119* (10). <https://doi.org/10.1039/AN9941902161>.
- (70) Kato, M.; Kinumi, T.; Yoshioka, M.; Goto, M.; Fujii, S. I.; Takatsu, A. Development of C-Reactive Protein Certified Reference Material NMIJ CRM 6201-b: Optimization of a Hydrolysis Process to Improve the Accuracy of Amino Acid Analysis Reference Materials for Chemical Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (11), 3137–3146. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8190-0>.

CAPÍTULO 3

***Biosíntesis, extracción, purificación y
caracterización de biocompuestos
marcados y puesta a punto de un
método de medida de metilación de
citosinas por Dilución Isotópica
HPLC-MS/MS***

III. 1. INTRODUCCIÓN

III.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es un organismo unicelular eucariota ampliamente empleado como organismo modelo, siendo prácticamente la única alga utilizada en estudios de fotosíntesis, movilidad con flagelos, reconocimiento celular, regulación del metabolismo y adaptación^{1,2}. Esto es así debido a la facilidad de manipulación de su genética, el elevado conocimiento de su genoma, completamente secuenciado en 2007³, y la amplia variedad de cepas mutantes en stock (Universidad de Duke). Además, esta microalga es especialmente interesante porque su genoma se encuentra entre el de animales y el de plantas superiores, presentando secuencias características de ambos en un genoma más simple, con un menor número de genes y familias proteicas y rutas metabólicas menos complejas. Así, el estudio de las *Chlamydomonas* es muy conveniente para ampliar el conocimiento de organismos superiores a través de una aproximación más sencilla. Por otro lado, en comparación con microorganismos más complejos, como las levaduras *S. cerevisiae* o *P. pastoris*, las *Chlamydomonas* presenta un crecimiento más rápido y su cultivo es más sencillo y de menor coste (nutrición mineral), pues se trata de un organismo autótrofo y heterótrofo facultativo: fotosintético, pero que también puede crecer en ausencia de luz con una fuente de carbono. Todo ello, junto a la elevada base de datos disponible de forma gratuita y a la amplia y activa comunidad internacional de investigación con *Chlamydomonas*, hacen de este microorganismo una herramienta ideal como biofactoría^{4,5}.

Hasta hace poco, las *Chlamydomonas* eran la única especie de alga en la que se podían aplicar herramientas de ingeniería génica⁶, por lo que existe una amplia variedad de estudios sobre cepas y sobre condiciones de estrés para obtener biofuel, biofármacos e *hidrógeno verde*⁷⁻⁹. Sin embargo, aunque las *Chlamydomonas* se han empleado en diferentes estudios con isótopos estables enriquecidos y con moléculas marcadas¹⁰⁻¹³, el empleo de estas como herramienta biotecnológica para obtener moléculas o mezclas de moléculas marcadas de alto valor añadido no ha sido abordado hasta hace pocos años, precisamente por nuestro grupo de investigación¹⁴.

III. 2. OBJETIVO

Como se ha comentado en la introducción, la obtención de moléculas marcadas ha sido abordada por diferentes laboratorios, públicos y privados, empleando diferentes microorganismos, principalmente para obtener mezclas de metabolitos aplicables en calidad y metrología^{15,16}, pero también para obtener compuestos aislados con los que realizar determinaciones cuantitativas¹⁷.

En trabajos previos en nuestro laboratorio, las *Chlamydomonas reinhardtii* han sido cultivadas en presencia de amonio enriquecido en ¹⁵NH₄ para obtener proteínas y aminoácidos marcados en ¹⁵N¹⁴. En este trabajo se pretende ampliar la metodología desarrollada previamente en dos ámbitos: la obtención de biomasa y la obtención de diferentes fracciones marcadas isotópicamente que pudieran ser aprovechables para futuros trabajos.

El objetivo de este capítulo es, por lo tanto, escalar el cultivo y la extracción de fracciones de microalgas marcadas y la purificación y caracterización de las fracciones. Por un lado, las proteínas obtenidas en esta ocasión serán hidrolizadas y caracterizadas por cromatografía de líquidos. Por otro lado, los ácidos nucleicos marcados obtenidos serán hidrolizados, purificados y caracterizados. Así mismo, dado que las *Chlamydomonas* presentan diferentes bases nitrogenadas metiladas¹⁸⁻²⁰, los nucleósidos obtenidos van a ser empleados como prueba de concepto para una aplicación: la determinación de metilación de citosinas en ADN mediante Dilución Isotópica y Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (HPLC-MS/MS).

III. 3. EXPERIMENTAL

III. 3. 1. Reactivos y materiales

El cloruro amónico enriquecido en ^{15}N (pureza $\geq 98\%$, enriquecimiento isotópico del 99,9%) fue proporcionado por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

La cepa CC503 de *Chlamydomonas reinhardtii* fue obtenida del Chlamydomonas Resource Center de la Universidad de Minnesota (USA).

Reactivos para la preparación de medios de cultivo (donde no se indique nada provienen de Sigma-Aldrich):

- “Mezcla de sales TAP”: cloruro amónico, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro cálcico dihidratado y la disolución de Hutner que incluye EDTA sal disódica, ácido bórico, sulfato de cinc heptahidratado, cloruro de manganeso (II) tetrahidratado, sulfato de hierro (II) heptahidratado, cloruro de cobalto (II) hexahidratado, sulfato de cobre (II) pentahidratado y molibdato amónico tetrahidratado (para el cultivo con ^{15}N se empleó molibdato sódico).

- Disolución de fosfato: Fosfato potásico dibásico y fosfato potásico monobásico.

- Medio de cultivo: Tris(hidroximetil)aminometano para bioquímica 99% (Acros Organics, Geel, Bélgica), ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, España), ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania) e hidróxido de potasio.

Reactivos para la extracción de proteínas:

Nitrógeno líquido (Air Liquide, París, Francia), tris(hidroximetil)aminometano (Tris) para bioquímica 99%, dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck), glicerol 99.5% (v/v), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Thermo Fisher), ditiotreitól (DTT), acetato amónico, fenol, sacarosa (Thermo Fisher), β -mercaptoetanol, metanol y acetona (Fluka).

Reactivos para la extracción de ácidos nucleicos:

Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Tris-HCl, PVP 40k, EDTA, ácido ascórbico, cloruro sódico, dietilditiocarbamato sódico (DIECA) fueron adquiridos en Sigma.

Cloroformo, alcohol isoamílico, etanol, isopropanol y betameraptoetanol fueron adquiridos en Sigma.

Las columnas de sílice MINI y MIDI Econospin® fueron adquiridas en Epoch LifeScience (EEUU).

Para la cuantificación de ADN y ARN se emplearon los kits de ensayo de ADNds y ARN Qubit™ BR (Thermo).

Reactivos para la hidrólisis de proteínas:

HCl 12N purificado mediante un proceso de destilación *sub-boiling* de la casa comercial ISC Science (Oviedo, España).

Para la hidrólisis de proteínas se emplearon tubos de hidrólisis para microondas focalizadas con un volumen de 2 mL adquiridos en Biotage (Suecia).

Reactivos para la hidrólisis de ácidos nucleicos:

Acetato sódico, cloruro de zinc, Nucleasa P1, fosfatasa alcalina, sulfato de amonio adquiridos de Sigma.

Reactivos para el análisis de aminoácidos:

Los aminoácidos glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-triptófano, L-serina, L-cisteína, L-treonina, L-aparagina, L-glutamina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-lisina, L-arginina y L-histidina se compraron a Sigma-Aldrich (MO, EEUU), todos ellos con purezas superiores al 99%. Los aminoácidos L-metionina, L-Prolina y L-tirosina fueron comprados a Fluka (Schnelldorf, Alemania), también con purezas superiores al 99%.

Como reactivo derivatizante de los aminoácidos se empleó Butanol/HCl 3N (99,9%).

Reactivos para el análisis de nucleósidos:

Los nucleósidos citidina, desoxicitidina, adenosina, desoxiadenosina, guanosina, desoxiguanosina, adenosina, desoxiadenosina, uridina, timidina se compraron en Fluka. La 5-metilcitidina, N⁶-metiladenosina, N⁶-metildesoxiadenosina y 5-metildesoxicitidina se compraron en Jena Bioscience (Alemania).

Los oligonucleótidos metilados (citosinas subrayadas) “Nanog” (TGTCACCCCGGTGGCGCGGGCCGGAAAAAAG), “CSF2” (ACCCCGCCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGCCAGC) y “Mest” (GTGGCTGGAGCGGGAGAAACCGGACTTTGTGCAACT) fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgica). El porcentaje de eficacia de metilación de citosinas era del 95%.

El set de ADN de ratón metilado Zymo D5019 se compró al distribuidor Comercial Hospitalaria Grupo3 (Santiago de Compostela, España).

Material para el cultivo y extracción de proteínas y ácidos nucleicos:

Tubos Eppendorf® de 2 mL (Sigma Aldrich), tubos de 15 mL y tubos Falcon® 50 mL (Fisher Sci, Barcelona, España), recipientes Dewar de varios tamaños (Isotherm, Alemania), matraces de 500 mL y 250 mL (Sigma Aldrich) y placas Elisa de 3 mL (Thermo).

Para la preparación de las fases móviles se empleó metanol grado LC-MS ($\geq 99,9\%$) adquirido en Fischer Scientific (Madrid, España) y ácido fórmico ($>98\%$) y ácido trifluoroacético (TFA) de Sigma-Aldrich. El agua ultrapura empleada en la preparación de las fases móviles y de las disoluciones se obtuvo con un sistema de destilación PureLab Flex 4 (Veolia, Francia).

Los disolventes acetona y acetonitrilo (calidad HPLC) fueron comprados a Fluka y a CarloErba reagents (Barcelona, España), respectivamente, mientras que la dimetilformamida (calidad HPLC) fue adquirida en VWR (Darmstadt, Alemania).

III. 3. 2. Instrumentación

Los cultivos de microalgas se realizaron en un agitador orbital HWY-200 (LAN Technologies, Bilbao) y en botellas de cristal borosilicato 3.3 de 10 L (WVR Internacional, EEUU). Para el cultivo en botella se empleó un frigorífico GRE1400 (Metro Professional, Alemania), equipado con tubos de luz de neón (Philips, Países Bajos). La esterilización de los medios de cultivo se realizó en una autoclave Autotester-G (P-Selecta, España). La manipulación e inoculación de las microalgas se realizó en una campana de flujo laminar TH-100 (Telstar, Barcelona). La compactación de los cultivos en pellets se realizó en una centrífuga Centrikon T-124 (Kontron Instruments, Alemania). Para la extracción de proteínas y ácidos nucleicos se empleó un equipo de ultrasonidos UP200S (Hielscher, Alemania), una centrífuga 5415R (Eppendorf, Alemania) y una centrífuga Micro STAR 17 (VWR, EEUU). Para las pesadas se emplearon las balanzas analíticas MS205DU semi-micro y AB204-S, ambas de Mettler Toledo (Suiza). Todas las disoluciones se homogeneizaron empleando un agitador tipo Vortex (VELP Scientifica, Italia).

Las hidrólisis de ácidos nucleicos se realizaron en un termociclador UNO96 HPL (VWR) y en un horno Heraeus® (Thermo, EEUU). Las hidrólisis de proteínas se realizaron en un equipo de microondas focalizadas Biotage Initiator de Biotage (Suecia). Para la evaporación de las disoluciones se empleó un evaporador MiVac (Supelco, EEUU). La conservación de muestras se

realizó en un congelador -86 Igloo U570 °C (Telstar) y en un congelador a -20 °C (Samsung, Corea del Sur), dependiendo del tiempo de conservación.

La separación cromatográfica de los aminoácidos butilados y de los nucleósidos se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) de Agilent series 1290 (Agilent Technologies, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent modelo 6460, equipado con una fuente de ionización “jet-stream”.

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó empleando un fluorímetro portátil Invitrogen Qubit™ 4 de Thermo.

Así mismo, también se empleó un pH-metro Basic 20 de Crison (Barcelona, España) para ajustar el pH de las disoluciones y las fases móviles.

III. 3. 3. Procedimientos

III. 3. 3. 1. Cultivo de *Chlamydomonas*

Las condiciones para el cultivo de *Chlamydomonas* en matraces de 500 mL se han descrito previamente¹⁴. El cultivo que se ha llevado a cabo durante esta tesis doctoral es un escalado a 10 L, siendo este el paso previo a la producción con un biorreactor. El medio de cultivo y los componentes de tres disoluciones empleadas en el mismo se detallan en las tablas 1, 2 y 3. Previo a su uso, el medio de cultivo es esterilizado en la autoclave a 125 °C y 2,5 atm de presión durante 21 minutos. A continuación, se deja enfriar y se inoculan las algas dentro de una campana de flujo laminar, tomando una pequeña cantidad de microalgas con un asa de siembra de una placa Petri de agar y empleando 250 mL de medio de cultivo en un matraz de 500 mL. Finalmente, se esteriliza la boca del matraz acercándola a la llama de un mechero Bunsen, se deja enfriar y se sella con tapones de difusión de gases. Los matraces son llevados a la cámara de cultivo para comenzar el crecimiento. Para asegurar un enriquecimiento isotópico elevado se requiere realizar, al menos, dos cultivos sucesivos en el medio enriquecido en ¹⁵N. Para los subcultivos se emplean puntas de pipeta con filtro esterilizadas. Para el cultivo en botella de 10 L, 250 mL de microalgas marcadas en ¹⁵N se inoculan 5 L de medio de cultivo.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo

Componente	Cantidad/L
Disolución TAP	25,0 mL
Tris*	2,42 g
Ácido acético	1,00 mL
Disolución fosfato**	0,375 mL

Tabla 2. Componentes de la disolución de Hutner

Sal	Concentración (g/L)
EDTA	50,00
H ₃ BO ₃	11,40
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,00
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,06

CAPÍTULO 3

Disolución de Hutner	1,00 mL	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99
pH	7,5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,61
<hr/>		CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57
*Tris(Hidroximetil)aminometano		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,10
<hr/>			
** 288 g/L K ₂ HPO ₄ + 144 g/L KH ₂ PO ₄			

Tabla 3. Componentes de la disolución TAP

Sal	C (g/L)
NH ₄ Cl	15,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,0

Los diferentes elementos empleados para llevar a cabo el cultivo en botellas de 10 L se resumen en la Figura 1. El elemento A representa la botella de 10 L, B representa el medio de cultivo, C es un agitador magnético para generar movimiento en la disolución, D es una placa magnética, E son burbujas de aire desacidificado para mejorar el movimiento de microalgas en la zona intermedia y superior de la disolución, F es un filtro estéril de 0,2 µm para evitar la transmisión de microorganismos presentes en el aire al cultivo, G es una botella que contiene una disolución de hidróxido de calcio 0,1 M, por la que se burbujea aire para desacidificarlo, H es un soplador de aire, I es un tubo que sirve para contrarrestar el aumento de presión y J es un vaso que sirve de desagüe en caso de un aumento puntual de la presión. Por último, todo el sistema se encuentra en una cámara termostatzada a 20°C e iluminada con tubos de neón en los laterales y arriba y debajo de la botella, aplicando fotoperiodos de 16:8 horas de luz:oscuridad (elemento J).

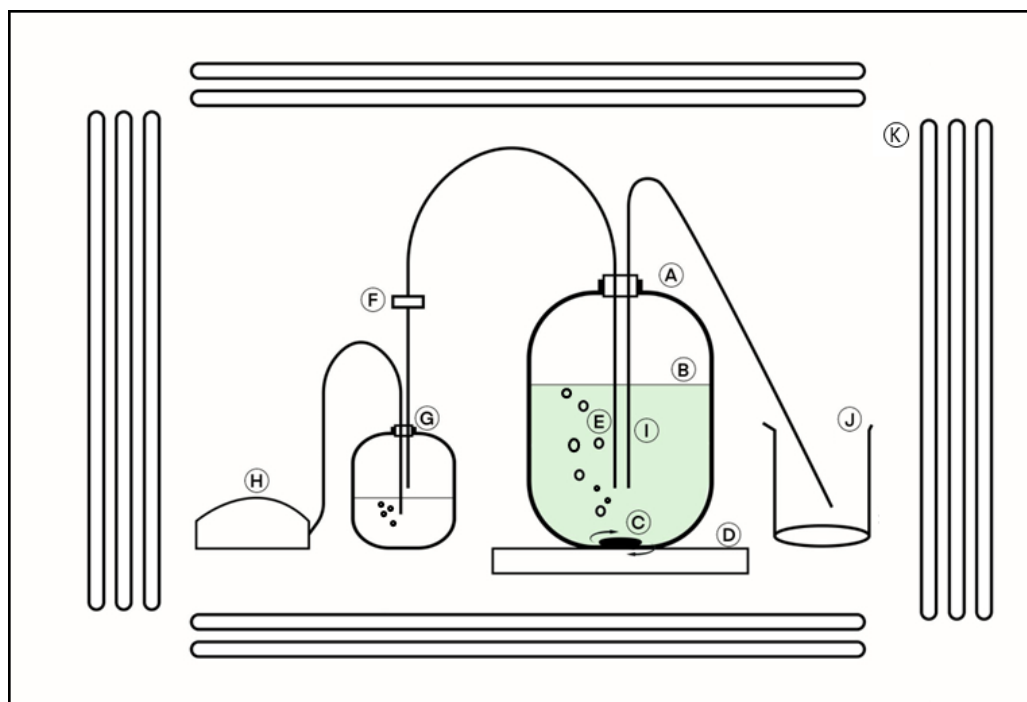


Figura 1. Esquema de cultivos realizados en botellas de 10 L. A) botella de 10 L, B) medio de cultivo, C) agitador magnético, D) placa magnética, E) burbujas de aire desacidificado, F) filtro estéril de 0,2 μm , G) botella con disolución de hidróxido de calcio 0,1 M, H) soprador de aire, I) tubo hueco, J) vaso de 500 mL.

III. 3. 3. 2. Extracción conjunta de ácidos nucleicos y proteínas

Con el fin de obtener el mayor número posible de compuestos de alto valor añadido se emplea un procedimiento de extracción múltiple desarrollado en el Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo²¹, en versión escalada. La extracción se realiza en un tubo de 50 mL con 1 g de biomasa (peso fresco). Sobre el pellet se añaden 7 mL de buffer de extracción preparado *in situ* (Tabla 4) y se homogeniza la mezcla, en primer lugar, pipeteando y luego agitando con un vortex durante un minuto. A continuación, se sumerge el tubo en nitrógeno líquido unos segundos para congelar la mezcla. Se aplican tres ciclos de congelado-descongelado para conseguir la ruptura de las células. Seguidamente, se deja el tubo 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y luego se centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente y máxima velocidad. El sobrenadante se transfiere a columnas de sílice para extraer ácidos nucleicos. Tras un minuto de incubación a temperatura ambiente, se centrifugan las columnas durante 10 minutos a máxima velocidad y se transfiere el eluyente a otra columna de sílice para realizar una reextracción. El eluyente se mezcla con 3 mL de acetonitrilo y la mezcla se transfiere a otra columna de sílice (extracción de ARN), se incuba durante 1 minuto y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos. El eluyente se transfiere a una segunda columna de sílice para realizar una reextracción. Tras la segunda extracción, el eluyente se transfiere a un tubo de 15 mL y se conserva a 4 °C y en oscuridad para la extracción de proteínas

Las columnas con los ácidos nucleicos se lavan con 5 mL de la disolución WB1 (2 mM Tris-HCl pH = 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA y 90% etanol), se centrifugan (10 minutos, 10000 rpm), se desecha el eluyente y se vuelven a lavar con la misma disolución al 70 % de etanol. A continuación, se desecha el eluyente y se centrifugan las columnas vacías durante un minuto a máxima velocidad para secarlas. Para obtener los ácidos nucleicos se añade, como mínimo, 200 µL de agua a la columna, se incuba 5 minutos a 37 °C con agitación suave y se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm. Este proceso se repite dos veces para un mayor rendimiento.

Tabla 4. Componentes de la reguladora de extracción

Componente	Concentración
SDS	5 %
Tris	100 Mm
Glicerol	10 %
PMSF	2 Mm
DTT	10 Mm
pH	8,00

Respecto a las proteínas, estas se separan del resto de la matriz a través de una extracción con fenol. Sobre la mezcla obtenida previamente se añaden 3 mL de sacarosa 3 M con ditiotreitól (DTT, 10 mM) y 4 mL de fenol (pH = 8,0) con 0,5 % de β-mercatóetanol. Esta mezcla se agita vigorosamente y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm. Seguidamente, se centrifugan los tubos y se toma el sobrenadante, que se lleva a un tubo de 50 mL conteniendo 10 mL de disolución PWB (sacarosa 3M, Tris-HCl 50 mM pH = 7,5 y EDTA 50 mM). Esta mezcla se agita vigorosamente y se centrifuga a temperatura ambiente y máxima velocidad durante 5 minutos. A continuación, se toma la fase superior (fase orgánica), se transfiere a otro tubo y la fase acuosa se reextrae de la misma manera. Una vez reextraída, se juntan las dos fases orgánicas y se reextraen. En este paso del procedimiento, al tomar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo hay que tener mucha precaución de no coger fase acuosa. En este tubo se añaden 20 mL de acetato amónico 0,1 M en metanol, se agita suavemente y se deja 12 h a -20 °C. Una vez precipitadas las proteínas, se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 4 °C y 6000 rpm y se retira el sobrenadante. El sólido que queda se lava dos veces con metanol y posteriormente una vez con acetona, conteniendo estos disolventes 0,5 % de β-mercatóetanol, salvo en el último lavado. Todo el proceso es llevado a cabo a 4 °C, salvo cuando se mencione otra temperatura.

III. 3. 3. Extracción de ácidos nucleicos a gran escala

Para procesar y obtener cantidades mayores de ácidos nucleicos se realiza un escalado del protocolo clásico de extracción con el reactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)^{22,23}. Se parte de 1 g de pellet húmedo o 200 mg de pellet seco en un tubo de 15 mL, se añaden 8 mL del medio de extracción (2 % CTAB, 1 % polivinil pirrolidona (PVP), 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 % β-mercaptoetanol), se homogeniza con agitación y con pulsos de ultrasonidos y se deja 30 minutos en un baño a 60 °C. A continuación, se centrifuga a 6000 rpm 5 min y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. A éste se le añaden 4 mL de una mezcla 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico, se agita suavemente hasta que se homogenicen las fases y se centrifuga nuevamente a 6000 rpm durante 5 min. Se toma el sobrenadante y se repite este último proceso otra vez. Por último, se añaden 4 mL de isopropanol a -20 °C, se mezcla cuidadosamente y se deja 24 h para que precipiten los ácidos nucleicos. Una vez obtenido el sólido, se lava con etanol frío varias veces para eliminar las sales que puedan haber coprecipitado.

III. 3. 3. 4. Hidrólisis ácida de proteínas

Las muestras de proteína marcada en ¹⁵N, liofilizadas y almacenadas a -86 °C, se descongelan a temperatura ambiente y se introducen aproximadamente 50 mg en viales de cristal de 5 mL. Seguidamente, se añaden, aproximadamente, 300 µL de agua y 300 µL de HCl 12N *sub-boiling*. Por último, los viales se sellan y el aire interior se sustituye por nitrógeno con el fin de evitar oxidaciones. Este procedimiento es similar al descrito en el Capítulo 2 para la hidrólisis de péptidos. Las hidrólisis transcurren durante 3 horas. Por último, se transfiere el hidrolizado a un tubo Eppendorf® de 2 mL, se centrifuga a 10000 rpm durante 5 minutos, se toma el sobrenadante, se transfiere a otro vial y se evapora. Tras la reconstitución en la fase móvil de la cromatografía, la mezcla se puede inyectar directamente en el HPLC-MS.

III. 3. 3. 5. Derivatización de aminoácidos

Las muestras de hidrólisis de proteínas se someten a un proceso de derivatización usando butanol-clorhídrico para la posterior separación y detección de los aminoácidos por cromatografía líquida en fase reversa²⁴. Brevemente, las disoluciones con los aminoácidos se evaporan en tubos Eppendorf® empleando vacío. A continuación, se añaden a los tubos 100 µL de butanol-HCl 3 N y se calientan en un termobloque a 60 °C durante 30 minutos. Por último, esta disolución se evapora empleando vacío y el residuo seco se reconstituye en la fase móvil inicial para su posterior análisis.

III. 3. 3. 6. Análisis de aminoácidos por LC-MS/MS

La separación cromatográfica de arginina, prolina, valina, tirosina, isoleucina, leucina y fenilalanina se lleva a cabo como ésteres butilados empleando cromatografía en fase reversa. Este método incluye un gradiente cromatográfico usando como fase móvil A 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua y como fase B 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo. Las condiciones para la separación cromatográfica se detallan en la Tabla 5. Los análisis MS/MS se llevan a cabo empleando ionización positiva y el modo de detección SRM. Los valores de los parámetros del espectro de masas se detallan en la Tabla 6. La adquisición de datos y el tratamiento de estos se ha llevado a cabo usando el software Agilent MassHunter Workstation versión B.06.00.

Tabla 5. Parámetros seleccionados para la separación por cromatografía de líquidos de los aminoácidos butilados

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1290	
Columna	Zorbax Eclipse C18	
Dimensiones	50 x 2,1 mm x 1,6 µm	
Temperatura	25 °C	
Volumen de inyección	1 µL	
Flujo	0,4 mL/min	
Fase A	0,1 % ácido fórmico en agua	
Fase B	0,1 % ácido fórmico en ACN	
Separación cromatográfica	Tiempo (min)	% B
	0	5
	1	5
	8	40
	9	60
	10	5
	12	5

Tabla 6. Parámetros seleccionados para la detección por MS/MS de los aminoácidos butilados.

Espectrómetro de masas	Agilent 6460
Fuente de ionización	Electrospray jet stream
Modo de ionización	Positivo
Temperatura del gas	250 °C
Flujo del gas	8 mL/min
Temperatura del gas envolvente	300 °C
Flujo del gas envolvente	10 mL/min
Presión del nebulizador	50 psi
Voltaje del capilar	2000 V
Voltaje de la entrada	500 V

III. 3. 3. 7. Hidrólisis enzimática de ácidos nucleicos

Para la hidrólisis de los ácidos nucleicos se empleó un protocolo clásico de hidrólisis enzimática de ADN, escalado para cantidades mayores en el caso de la hidrólisis de ácidos nucleicos marcados isotópicamente. Las condiciones de hidrólisis no fueron optimizadas para el escalado y el mismo fue empleado tanto para ADN como para mezclas de ADN y ARN. El protocolo escalado para grandes cantidades de ADN es el siguiente: En primer lugar, se toman 100 µL de ADN o ARN y se incuban a 99 °C durante 5 minutos. Inmediatamente después de esta desnaturalización se colocan los viales en hielo y se añaden 8 µL de acetato sódico 50 mM, 3,3 µL de cloruro de zinc 40 mM y 2,5 µL de nucleasa P1 (200 U/mL) a pH = 7,2. A continuación, los reactivos se mezclan en el vial a través de ligeros movimientos y se dejan 12 h a 37 °C en una estufa. Seguidamente se añaden, por este orden, 25 µL de Tris-HCl 0,5 M (pH = 8,3) y 5 µL de fosfatasa alcalina (0,2 U/mL), se mezclan suavemente y se incuban los viales durante 2 h a 37 °C. Después se añaden 55 µL de agua, se transfieren a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añaden suavemente 800 µL de etanol absoluto a -20 °C sin agitar. La mezcla se deja una hora a -20 °C para que precipiten las diferentes sales del medio. Por último, se centrifuga a 4 °C durante 15 minutos a 14000 rpm, se toma el sobrenadante, se evapora y se reconstituye en la fase móvil, ya sea para cromatografía líquida a escala analítica o a escala semipreparativa.

III. 3. 3. 8. Purificación de nucleósidos marcados

La purificación de los nucleósidos marcados se lleva a cabo empleando cromatografía líquida semi-preparativa, Para ello, el producto obtenido de la hidrólisis se disuelve en 500 µL de agua 0,1 % (v/v) TFA y se inyectan directamente 50 µL de esa disolución en el equipo, empleando las condiciones que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros empleados para la separación por cromatografía de líquidos semipreparativa de los nucleósidos marcados.

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1260	
Columna	Jupiter C18 (Phenomenex)	
Dimensiones	250x10 mm x5 µm, 300Å	
Temperatura	25 °C	
Volumen de inyección	50 µL	
Longitud de onda	260 nm	
Flujo	2 mL/min	
Fase A	0,1 % ácido trifluoroacético en agua	
Fase B	Metanol, 0,1 % ácido trifluoroacético	
Separación cromatográfica	Tiempo (min)	% B
	0	5
	60	5

III. 3. 3. 9. Análisis de nucleósidos por ID-LC-MS/MS

Para llevar a cabo los estudios de Dilución Isotópica se añaden a las muestras, aproximadamente, 50 µL de disoluciones de nucleósidos marcados isotópicamente con concentraciones entre 10 y 150 µg·g⁻¹. La separación cromatográfica de los nucleósidos se lleva a cabo empleando cromatografía en fase reversa. Este método incluye un gradiente cromatográfico usando como fase móvil A 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua y como fase B 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en metanol. Las condiciones para la separación cromatográfica se detallan en la Tabla 8. Los análisis MS/MS se llevan a cabo empleando ionización positiva y el modo de detección SRM. Los valores de ionización del espectro de masas y otros valores empleados en el funcionamiento de este fueron optimizados empleando una disolución 1 µg/g de los nucleósidos disueltos en 100 % fase A. Estos valores se detallan en la Tabla 9. La adquisición de datos y el tratamiento de estos se llevó a cabo usando el software Agilent MassHunter Workstation versión B.06.00.

Tabla 8. Parámetros seleccionados para la separación por cromatografía de líquidos de los nucleósidos

Cromatógrafo	Agilent Infinity 1290
Columna	Luna® Omega Polar C18
Dimensiones	100x2,1 mm x1,6 µm
Precolumna	SecurityGuard™ UPLC C18-Peptide
Temperatura	25 °C
Volumen de inyección	1 µL
Flujo	200 µL/min
Fase móvil A	H ₂ O, 0,1 % ácido fórmico
Fase móvil B	Metanol
Gradiente	0 min – 0 % fase B 4 min – 0 % fase B 14 min – 3 % fase B 15 min – 3 % fase B 20 min – 0 % fase B 25 min – 0 % fase B

Tabla 9. Parámetros seleccionados para la detección por MS/MS de los nucleósidos

Espectrómetro de masas	Agilent 6460
Fuente de ionización	Electrospray (ESI) – jet stream (AJS)
Modo de ionización	Positivo
Temperatura del gas envolvente	400 °C
Flujo del gas envolvente	12 mL/min
Presión del nebulizador	40 psi
Potencial del capilar	3000 V
Potencial de la entrada	0 V
Temperatura del gas	300 °C
Flujo del gas	7 mL/min
Voltaje del capilar	2000 V
Voltaje de la entrada	0 V

III. 4. RESULTADOS Y DISCUSION

III. 4. 1. Cultivo de *Chlamydomonas*

El grupo de investigación donde se ha realizado la presente tesis tiene una amplia experiencia en el cultivo de microorganismos a escala de laboratorio para obtener compuestos marcados isotópicamente²⁵⁻²⁷. Sin embargo, muchos compuestos de interés bioanalítico se encuentran presentes en baja proporción en los microorganismos y por ello se requiere obtener una elevada cantidad de biomasa para conseguir cantidades suficientemente elevadas con el fin de purificarlos y emplearlos como patrones. En este trabajo se ha realizado un escalado del cultivo de *Chlamydomonas* de matraces de 500 mL a botellas de 10 L. Para ello se ha empleado el dispositivo que se muestra en la sección de procedimientos (Figura 1). A continuación, los cultivos realizados se compactaron en pellets empleando una centrífuga Centrikon T-124 con capacidad de 6 recipientes de 300 mL. Este es un paso importante para tener en cuenta, pues los cultivos presentan un volumen muy elevado para las centrífugas utilizadas habitualmente en los laboratorios y las células deben compactarse, lavarse y congelarse lo más rápidamente posible. Se llevaron a cabo tres cultivos consecutivos con ¹⁵N empleando el sistema descrito (Imagen 1) y se obtuvieron $17,2 \pm 0,6$ g/L de biomasa, requiriendo 6 días para un crecimiento completo. Estos valores son inferiores a los obtenidos previamente para esta microalga y la cepa empleada²¹, lo cual es de esperar, ya que se trata de un sistema no optimizado donde la agitación y la iluminación no son óptimas. Por ello, se estudió el potencial valor del medio de cultivo remanente. Aunque es sabido que, durante su crecimiento y con el aumento de la densidad celular en el medio, las microalgas liberan al medio de cultivo sustancias que interfieren en el crecimiento y proliferación de estas, a nivel de producción industrial es interesante comprobar si tras realizar un cultivo y peletear las microalgas se puede emplear el mismo medio de cultivo para volver a inocular microalgas y seguir creciendo las mismas, en casos como este, donde quedan nutrientes en la disolución. Se realizaron dos cultivos empleando el medio de cultivo remanente, previa esterilización, y se compactaron en pellets de la misma manera, obteniéndose $3,2 \pm 0,3$ g/L de biomasa. Aunque a nivel industrial este no es un proceso rentable, este experimento demuestra que en el medio de cultivo quedan nutrientes sin aprovechar y que el proceso se podría optimizar para obtener, al menos, entre un 15 y un 20 % más de la cantidad obtenida inicialmente. La suma de estas dos cantidades sí está en consonancia con la cantidad de biomasa esperable para este cultivo, pues las condiciones de frío, luz y agitación no están optimizadas, lo que afecta al rendimiento^{14,21,28-30}.

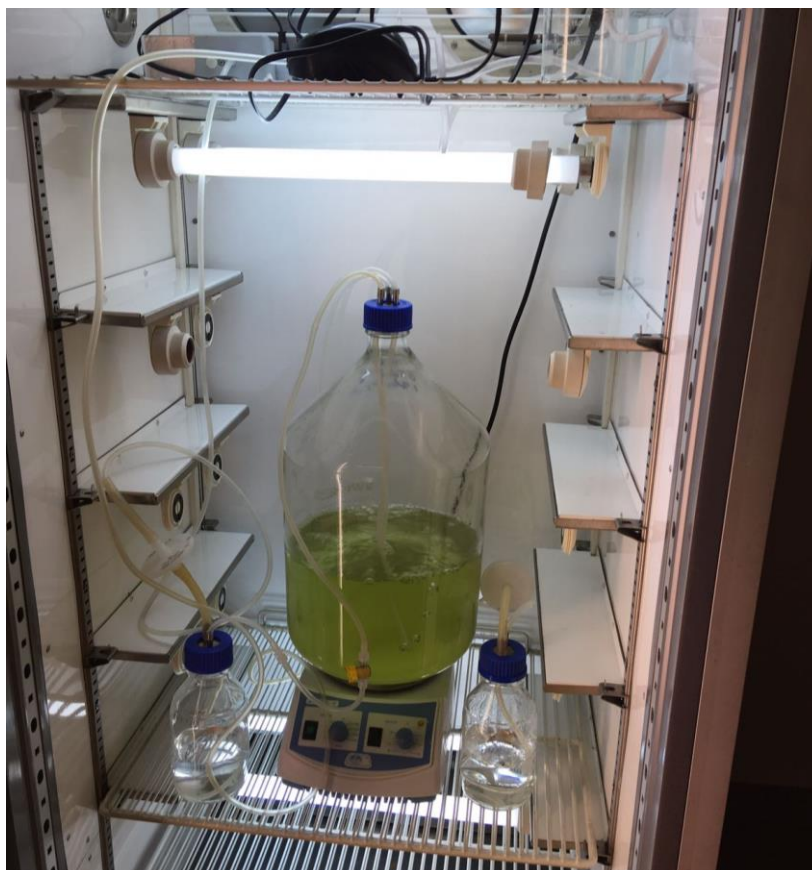


Imagen 1. Cultivo de *Chlamydomonas* en un medio enriquecido en ^{15}N , escalado a 5 L en una botella de 10 L.

III. 4. 2. Extracción conjunta de proteínas y ácidos nucleicos

La extracción conjunta de proteínas y de ácidos nucleicos llevada a cabo en este capítulo es novedosa ya que no había sido realizada previamente empleando un gramo de biomasa. A pesar de tratarse de un proceso escalado, la extracción y purificación de ácidos nucleicos se realizó con columnas de sílice MINI. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10. Como se puede observar, los valores obtenidos para la extracción de proteínas son similares a los publicados previamente para esta microalga y este tipo de extracción^{14,21}. Sin embargo, la extracción de ácidos nucleicos a través de esta vía presenta resultados por debajo del rendimiento obtenido empleando una cantidad de biomasa inicial menor (100 mg). Generalmente, el escalado de procesos de laboratorio suele conllevar una pérdida en el rendimiento de estos, ya que determinados pasos como la dinámica de fluidos, la homogenización de materia o la distribución de calor ocurre de manera y en tiempos diferentes a los procesos miniaturizados. Esto es especialmente significativo en procesos que involucran microorganismos, pero, en este caso, en la extracción de ácidos nucleicos, el principal reto se encuentra en la propia extracción en la columna de sílice. Un aspecto importante a considerar aquí es la cantidad de fuerza que ejerce la centrífuga sobre el filtro, la cual es dependiente no solo de la potencia de la centrífuga sino

también de la masa líquida que hay sobre el filtro. Así, un procedimiento de extracción con columnas MINI requiere 3 minutos a 15 000 rpm para procesar 800 µL de disolución y extraer entre 30 y 40 µg de ADN³¹. Dado que en esta extracción escalada se manejan volúmenes y cantidades de materia muy superiores, se decidió ensayar el mismo procedimiento empleando columnas MIDI, con capacidad de procesar 6,5 mL y con capacidad de retención entre 200 y 300 µg de ADN (rendimiento teórico similar a las columnas mini). Sin embargo, no se consiguió una extracción satisfactoria en todos los ensayos realizados, pues las columnas se quedaban obturadas al centrifugar y el extracto y los disolventes no circulaban a través de la columna, lo cual repercute en largos tiempos de elución y en una pérdida de material.

Tabla 10. Cantidad de microalga empleada en cinco extracciones y rendimientos de extracción de proteínas y de ácidos nucleicos.

	Masa pellet (g, peso húmedo)	Masa proteína (mg)	Masa DNA (µg)	Masa RNA (µg)	% extracción proteínas	% extracción DNA
muestra 1	1057	45,7	48,03	735	4,32	0,045
muestra 2	984	40,3	35,20	546	4,10	0,036
muestra 3	965	38,5	39,74	576	3,99	0,041
muestra 4	1120	45,4	24,61	394	4,05	0,022
muestra 5	1195	45,9	19,80	300	3,84	0,017

Como alternativa a la extracción empleando centrifugación se utilizó una cámara de extracción a vacío (Imagen 2). En este tipo de extracción también se emplearon columnas MINI con el objetivo de comparar las características de la elución con esa columna en un sistema alternativo a la centrifugación. Con este tipo de extracción no se obtuvieron mejores resultados, ya que las columnas MIDI también se obturaban a pesar de tratarse de un sistema de elución en condiciones más suaves de presión, mientras que las columnas MINI no se obturaban, pero requerían el triple de tiempo (10 minutos) de elución frente al método de centrifugación. De acuerdo con estos resultados se concluye que, dado que el método de extracción con columnas de sílice se aplica a procedimientos miniaturizados, las columnas MIDI, aunque iguales en composición química, no están diseñadas para este tipo de procesos. De acuerdo con la opinión de diferentes casas comerciales, el empleo de este tipo de columna es, principalmente, extracciones SPE en cámaras de vacío. Sin embargo, en el procedimiento desarrollado, aparentemente, la cámara de vacío no generaba un vacío suficiente. Por otro lado, para el empleo de estos tubos en centrífugas se requeriría unos tubos colectores con una morfología que contrarrestase la sobrepresión que se generaba en el colector al centrifugar, cosa que ocurría con las columnas MINI, que estaban encajadas al tubo colector girando libremente sobre él, mientras que las columnas MIDI no podían girar.

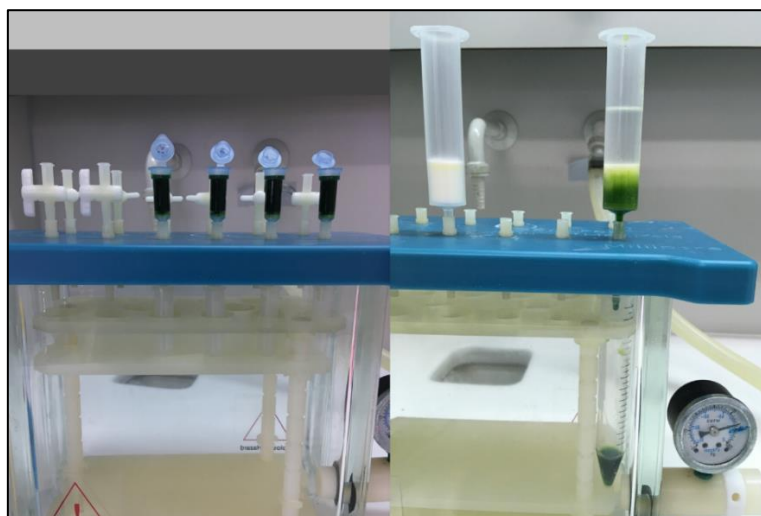


Imagen 2. Extracción de ácidos nucleicos en columnas de sílice MINI y MIDI empleando una cámara de vacío.

III. 4. 3. Extracción selectiva de ácidos nucleicos

Como se ha descrito previamente, el procedimiento desarrollado para la extracción conjunta de proteínas y ácidos nucleicos es eficaz si no se requieren elevadas cantidades de ácidos nucleicos. Sin embargo, como proceso de obtención de ácidos nucleicos marcados a gran escala es poco eficaz. El empleo de columnas de sílice, además de extraer los ácidos nucleicos, permite limpiar y purificar los mismos. Dado que en los procesos de síntesis de patrones analíticos generalmente se suele aplicar un proceso de purificación por cromatografía, se decidió llevar a cabo un procedimiento de extracción selectiva de ácidos nucleicos, el cual permitiera el empleo de volúmenes y cantidades mucho mayores y no requiera el uso de columnas de sílice, reduciendo así el tiempo de extracción.

La extracción de ácidos nucleicos empleando reactivos selectivos (CTAB, TRIzol, etc.) y su posterior purificación mediante precipitación es un procedimiento ampliamente empleado en laboratorios de investigación tanto para obtener muestras de ADN como de ARN^{22,32,33}. Este tipo de procedimientos son más rápidos y requieren menos materiales que los que emplean una purificación con columnas de sílice, si bien, como contrapartida, las muestras obtenidas suelen presentar una menor pureza.

En este caso se empleó un protocolo estándar modificado y adaptado al tipo de muestra y a las cantidades empleadas. En la Imagen 3 se muestra un ovillo de ADN precipitado para una muestra de aproximadamente un gramo en peso fresco. Una ventaja de este tipo de extracción es que los precipitados presentan una forma típica y se encuentran agregados, por lo que, para muestras abundantes, los precipitados obtenidos mediante este procedimiento son lo suficientemente grandes como para transferirlos con una pipeta a otros viales y realizar múltiples lavados de los

ácidos nucleicos empleando etanol frío, sin tener que aplicar múltiples pasos de centrifugación, eliminación del sobrenadante y desagregación del sólido para limpiar el mismo. Las diferentes muestras extraídas empleando este procedimiento se secaron empleando vacío y se disolvieron en 500 μL de agua para cuantificar el rendimiento de la extracción, obteniéndose una media de $0,029 \pm 0,006$ % de rendimiento de extracción de ADN. Aunque este valor es similar al obtenido empleando el procedimiento de extracción conjunta de proteínas y ácidos nucleicos, este proceso requiere un total de 45 minutos, esto es, 3 horas menos que con el otro método. Además, en este caso no se requiere ni centrifugación ni columnas de sílice, con el ahorro económico que ello implica.

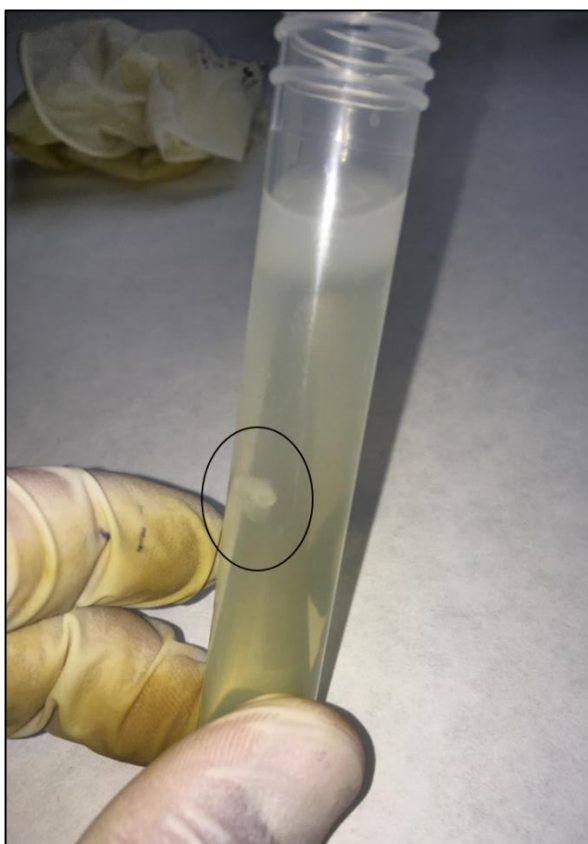


Imagen 3. Ovillo de ácidos nucleicos obtenidos durante la extracción realizada con reactivos selectivos.

III. 4. 4. Determinación del enriquecimiento isotópico de aminoácidos marcados por LC-MS

Las proteínas marcadas se hidrolizaron empleando una hidrólisis ácida y los hidrolizados se analizaron por HPLC-MS empleando las condiciones que se detallan en la sección de procedimientos. En la Figura 2 se muestra el cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína marcada (concentración aproximada $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en modo SCAN. Como se puede

observar, los picos principales se corresponden con aminoácidos y la mayoría de los aminoácidos proteinogénicos están presentes. No se pudo determinar los aminoácidos asparagina, glutamina y glicina. La ausencia de los dos primeros se debe a que, durante la hidrólisis, estos se convierten en ácido aspártico y glutámico, respectivamente. Sin embargo, no se ha encontrado una explicación para la ausencia de glicina. Tratándose del aminoácido de menor tamaño, se esperaría su elución en cabeza de columna, al igual que ocurre con la lisina y la histidina. Así mismo, destaca la presencia de triptófano que no pudo ser determinado en un estudio previo¹⁴. Así mismo, no se consiguió la separación de todos los aminoácidos debido a la similitud entre algunos de ellos, a su carácter iónico y al tipo de cromatografía empleada para la separación. A pesar de la falta de resolución cromatográfica, dado que la mayoría de los aminoácidos presentan masas diferentes, la separación obtenida resultó suficiente para poder determinar el enriquecimiento isotópico con exactitud y precisión. Para determinar el enriquecimiento isotópico se ha empleado el procedimiento descrito en la introducción y desarrollado previamente por el grupo de investigación donde se ha realizado la presente tesis³⁴. La Tabla 11 muestra los tiempos de retención obtenidos para los aminoácidos marcados en ¹⁵N y su enriquecimiento isotópico determinado por HPLC-MS. Como se puede observar, para los isómeros leucina e isoleucina no se pudo determinar el enriquecimiento isotópico, debido a la coelución de los mismos. Así mismo, para el aminoácido histidina tampoco fue posible determinar su enriquecimiento isotópico, al eluir en cabeza de columna y encontrarse el clúster seleccionado interferido. Se obtuvo un enriquecimiento isotópico medio de $99,2 \pm 0,2$ %. Este valor es ligeramente inferior al del enriquecimiento isotópico teórico del reactivo suministrado a las *Chlamydomonas* (¹⁵NH₄, 99,9 %). No obstante, es importante resaltar aquí que un enriquecimiento isotópico del 99,9 % es poco probable, pues esa cifra es muy elevada y la medida depende altamente de la técnica de análisis empleada. Así mismo, el proveedor no indica la incertidumbre de ese valor.

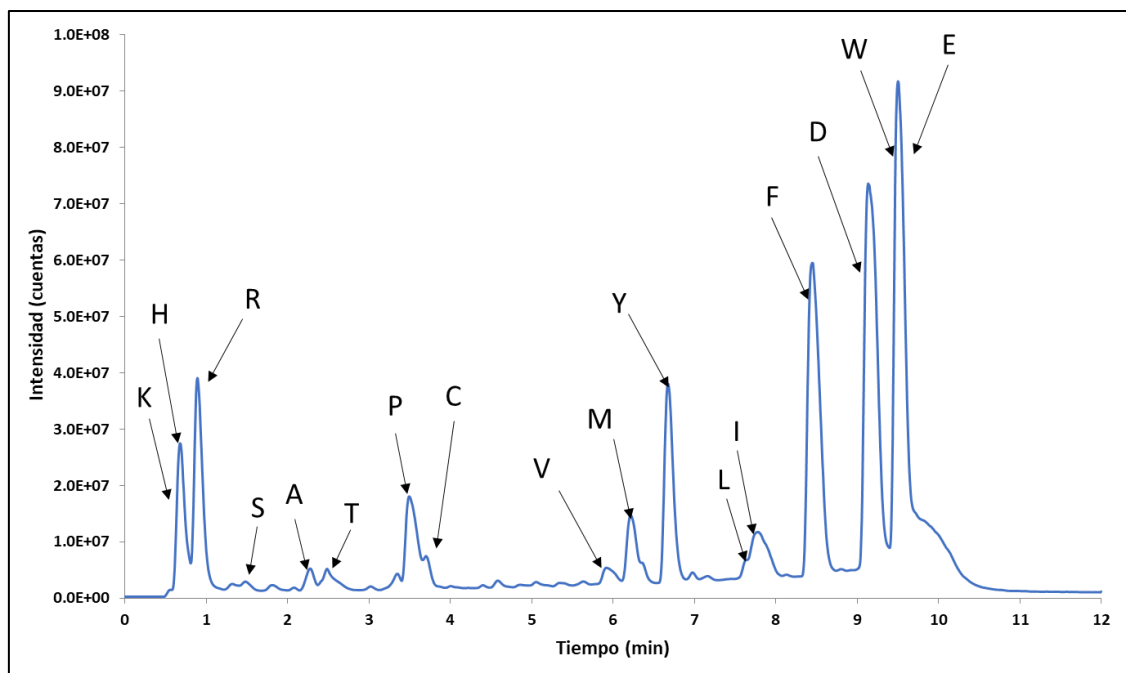


Figura 2. Separación cromatográfica de un hidrolizado de proteína marcada en ^{15}N determinada en modo SCAN a una concentración aproximada de $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Tabla 11. Aminoácidos marcados en ^{15}N determinados por HPLC-MS: tiempos de retención y enriquecimientos isotópicos.

Letra	Aminoácido	Tiempo de retención (min)	Clúster (m/z)	Fórmula fragmento	Enriquecimiento isotópico \pm d.e. (%)
H	Histidina	0,66	212-218	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}^{15}\text{N}_3\text{O}_3$	-
K	Lisina	0,69	203-209	$\text{C}_{10}\text{H}_{23}^{15}\text{N}_2\text{O}_3$	$99,32 \pm 0,02$
R	Arginina	0,89	231-237	$\text{C}_{10}\text{H}_{23}^{15}\text{N}_4\text{O}_3$	$98,84 \pm 0,06$
S	Serina	1,48	162-168	$\text{C}_7\text{H}_{16}^{15}\text{NO}_4$	$99,32 \pm 0,02$
T	Treonina	2,49	176-182	$\text{C}_8\text{H}_{18}^{15}\text{NO}_4$	$99,34 \pm 0,02$
A	Alanina	2,60	246-252	$\text{C}_7\text{H}_{16}^{15}\text{NO}_3$	$98,86 \pm 0,04$
P	Prolina	3,55	172-178	$\text{C}_9\text{H}_{18}^{15}\text{NO}_3$	$99,20 \pm 0,02$
C	Cisteína	3,55	194-200	$\text{C}_7\text{H}_{16}^{15}\text{NO}_4\text{S}$	$99,34 \pm 0,02$
V	Valina	5,95	174-180	$\text{C}_9\text{H}_{20}^{15}\text{NO}_3$	$99,12 \pm 0,02$
M	Metionina	6,27	206-212	$\text{C}_9\text{H}_{20}^{15}\text{NO}_3\text{S}$	$99,16 \pm 0,04$
Y	Tirosina	6,69	238-244	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}^{15}\text{NO}_4$	$99,22 \pm 0,02$
L	Leucina	7,80	188-194	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}^{15}\text{NO}_3$	-
I	Isoleucina	7,84	188-194	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}^{15}\text{NO}_3$	-
F	Fenilalanina	8,50	222-228	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}^{15}\text{NO}_3$	$98,96 \pm 0,04$
D	Ácido aspártico	9,14	190-196	$\text{C}_8\text{H}_{16}^{15}\text{NO}_5$	$99,18 \pm 0,04$
E	Ácido glutámico	9,60	204-210	$\text{C}_9\text{H}_{18}^{15}\text{NO}_5$	$99,42 \pm 0,02$
W	Triptófano	9,60	261-267	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}^{15}\text{NO}_3$	$99,40 \pm 0,02$

III. 4. 5. Hidrólisis y purificación de nucleósidos por HPLC semipreparativa

Las muestras de ácidos nucleicos obtenidas se hidrolizaron para obtener nucleósidos empleando nucleasa P1 y fosfatasa alcalina. Tras las hidrólisis, se comprobó la ausencia de ADN o ARN en las muestras. A continuación, se separaron los nucleósidos marcados empleando cromatografía líquida preparativa en modo isocrático. En la Figura 3 se muestra un cromatograma de una mezcla de patrones de nucleósidos tanto de ADN como de ARN. Como se puede observar, en las condiciones empleadas se consigue una separación de todos los nucleósidos de ADN y ARN, a excepción de la guanosina y la desoxiadenosina. Esto es especialmente relevante en muestras reales, donde los picos de los nucleósidos de ARN son mucho mayores por su abundancia que los de ADN, por lo que estos dos patrones no pueden ser obtenidos aislados usando la separación empleada. Así mismo, se incluyen en este cromatograma flechas indicando los picos de los nucleósidos metilados de citosina y adenina, tanto para ADN como ARN (metilcitosina y la metildesoxiadenosina no se encontraron en las muestras).

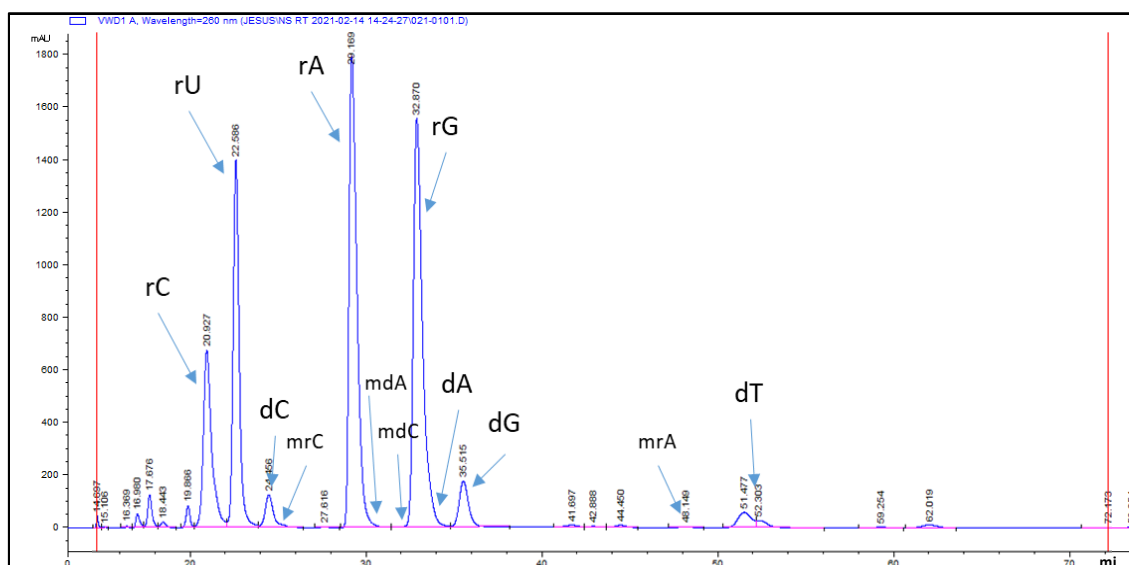


Figura 3. Cromatograma de la separación de una mezcla de patrones de nucleósidos de ADN y ARN por HPLC preparativo. Detección a 260 nm.

III. 4. 6. Medida del enriquecimiento isotópico de nucleósidos marcados por LC-MS y validación del método de medida de metilación

Los nucleósidos marcados obtenidos se analizaron por HPLC empleando las condiciones que se detallan en la Tabla 8. El empleo de una columna C18 funcionalizada con grupos polares permitió la separación de todos los nucleósidos en 25 minutos. Con el fin de estudiar la pureza espectral de los compuestos naturales y el enriquecimiento isotópico de sus análogos marcados se midieron los clústeres completos del ion molecular en modo SIM, inyectando disoluciones (n=5) de

nucleósidos con una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La Tabla 12 muestra los tiempos de retención obtenidos para los nucleósidos, los clústeres medidos y el enriquecimiento isotópico obtenido para cada uno de ellos. En este caso, el enriquecimiento isotópico promedio obtenido ($99,3 \pm 0,1\%$) es prácticamente igual al obtenido para los aminoácidos

A continuación, se caracterizaron en concentración, utilizando la dilución isotópica inversa, las disoluciones de los compuestos aislados enriquecidos isotópicamente. Para ello, se determinó la exactitud del equipo para realizar las medidas MRM de los analitos estudiados en la metilación (dC, 5mdC, A y N⁶-mA). En primer lugar, se estudió la fragmentación de los nucleósidos seleccionados y se optimizaron las energías de colisión, obteniéndose valores de 5, 12, 20 y 20 eV, para dC, 5-mdC, A y N⁶-mA, respectivamente. Los principales iones producto encontrados fueron las bases nitrogenadas, surgidas de la pérdida del azúcar (pentosa) de la molécula, con lo que durante la fragmentación no se pierde la marca isotópica. Por otro lado, para la 5-metildesoxicitidina se empleó la base nitrogenada como ion parental, ya que en la fuente de ionización se pierde la desoxirribosa, lo que ha sido reportado por otros autores^{35,36}. Por ello, para la 5-mdC se tomó como ion producto el generado por la pérdida de un grupo amino, $[\text{M}-\text{NH}_3]^+$, perdiéndose en este caso una de las tres marcas isotópicas presentes en la molécula. Respecto a las medidas realizadas en MRM, las abundancias experimentales para las transiciones seleccionadas de cada nucleósido se compararon con los valores teóricos, calculados con el programa IsoPattern³⁷. Este experimento se realizó con nucleósidos naturales y marcados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13. En ella se muestra que, tanto para los compuestos naturales como para los marcados, hay una buena correlación entre los valores teóricos y los valores experimentales, siendo la incertidumbre de estos últimos la desviación estándar de 5 medidas independientes. A continuación, una vez realizadas las medidas se determinó la concentración de los 4 nucleósidos por Dilución Isotópica inversa, encontrándose $14,8 \pm 0,2$, $0,354 \pm 0,004$, $265,5 \pm 6,4$ y $0,86 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para dC, 5-mdC, A y N⁶-mA, respectivamente.

Tabla 12. Tiempos de retención, fórmula del ion y clústeres medidos, y enriquecimientos isotópicos determinados por HPLC-MS para los nucleósidos marcados en ¹⁵N purificados.

Abreviación	Nucleósido	Tiempo de retención (min)	Fórmula molecular	Clúster (m/z)	Enriquecimiento isotópico ± d.e. (%)
C	Citidina	2,22	C ₉ H ₁₃ ¹⁵ N ₃ O ₅	243-250	99,35 ± 0,25
dC	Desoxicitidina	2,81	C ₉ H ₁₃ ¹⁵ N ₃ O ₄	227-234	99,42 ± 0,35
5-mrC	5-metilcitidina	3,19	C ₁₀ H ₁₅ ¹⁵ N ₃ O ₅	257-264	-
U	Uridina	3,37	C ₉ H ₁₂ ¹⁵ N ₂ O ₆	244-251	99,21 ± 0,10
5-mdC	5-metil desoxicitidina	4,93	C ₄ H ₅ ¹⁵ N ₃ O	125-132	99,17 ± 0,08
A	Adenosina	5,94	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₄	267-275	99,31 ± 0,02
dA	Desoxiadenosina	7,29	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₃	251-259	99,35 ± 0,08
G	Guanosina	7,78	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₅	283-291	99,42 ± 0,02
dG	Desoxiguanosina	10,06	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₄	267-275	99,18 ± 0,05
T	Timidina	11,69	C ₁₀ H ₁₄ ¹⁵ N ₂ O ₅	242-249	99,50 ± 0,09
N ⁶ -mA	N ⁶ -metiladenosina	15,87	C ₁₁ H ₁₅ ¹⁵ N ₅ O ₄	281-289	99,30 ± 0,02
N ⁶ -mdA	N ⁶ -metil-desoxiadenosina	19,34	C ₁₁ H ₁₅ ¹⁵ N ₅ O ₃	265-272	-

Tabla 13. Transiciones medidas, valores teóricos y experimentales de las abundancias isotópicas de esas transiciones y desviación estándar de las medidas realizadas por HPLC-MS/MS para los nucleósidos indicados.

Nucleósido	Transición	Valor teórico	Valor experimental	Desviación estándar (n=5)
dC	228→112	0,945	0,944	0,0
	229→113	0,052	0,052	0,2
¹⁵ N ₃ -dC	231→115	0,955	0,955	0,0
	232→116	0,042	0,042	0,1
5-mdC	126→109	0,938	0,940	0,2
	127→110	0,058	0,057	2,9
¹⁵ N ₃ -5-mdC	129→111	0,945	0,947	0,2
	130→112	0,052	0,051	1,7
A	268→136	0,930	0,929	0,1
	269→137	0,068	0,068	0,8
¹⁵ N ₅ -A	273→141	0,947	0,948	0,2
	274→142	0,052	0,051	2,3
N ⁶ -mA	282→150	0,920	0,920	0,0
	283→151	0,077	0,077	0,2
¹⁵ N ₅ -N ⁶ -mA	287→155	0,937	0,937	0,1
	288→156	0,062	0,061	1,0

III. 4. 7. Determinación de la metilación de ADN empleando Dilución Isotópica

Una vez aislados y caracterizados los nucleósidos marcados, se procedió a realizar un estudio de metilación de ADN, empleando para ello en primer lugar tres oligonucleótidos sintéticos metilados NANOG, MEST y CSF2 (entre 32 y 36 bases). Los oligonucleótidos seleccionados por su interés biomédico se presentan en la Tabla 14. Las islas CpG indicadas (subrayadas) en la secuencia presentan un 95% de citosinas metiladas. Se prepararon disoluciones de estos en torno a 10 µg/µL y se llevaron a cabo las hidrólisis empleando 10 µL de disolución. Los valores de metilación obtenidos para NANOG, MEST y CSF2 fueron 29,6 ± 0,3 %, 30,4 ± 0,3 % y 23,8 ± 0,8 %, respectivamente. Estos valores, si bien cercanos al valor real, no son estadísticamente diferentes teniendo en cuenta la desviación estándar de las medidas. La explicación de esta inexactitud se debe a la pureza de los oligonucleótidos adquiridos, pues, de acuerdo con el departamento comercial de Integrated DNA Technologies, estos oligonucleótidos no fueron purificados por cromatografía preparativa, con lo que es posible que en la disolución se encuentren presentes secuencias incompletas de los mismos oligonucleótidos. Así mismo, dado que una muestra de ADN es más compleja que estos patrones y que los valores de metilación frecuentemente presentan intervalos de exactitud menores, se decidió realizar el mismo experimento empleando patrones de ADN comerciales que están caracterizados en el porcentaje de metilación por LC-MS/MS.

Tabla 14. Secuencias oligonucleótidos seleccionados, porcentaje de metilación de los patrones y referencias de interés.

Nombre	Secuencia	Metilación citosinas (%)	REF.
NANOG	TGTCCCCACCCGGT <u>GGCGCGGGCC</u> GGAAAAAG	27,3 ± 1,4	38,39
MEST	GTGGCTGGAG <u>CGGGAGAAACCG</u> GACTTTGTGCAACT	28,6 ± 1,4	40,41
CSF2	AC <u>CG</u> CCCGCT <u>CG</u> CCCAGCCCCAGCA <u>CG</u> CAGC	21,1 ± 1,1	42,43

Para llevar a cabo el siguiente ensayo se emplearon patrones de ADN de diferentes órganos de ratón (Zymo D5014), concretamente ADN metilado de cerebro, riñón, hígado y timo, cada uno de ellos con diferente porcentaje de metilación entre el 6 y el 8%. Dado que los patrones se encontraban en una concentración de 0,25 µg/µL, se estudió en primer lugar el límite de detección de los analitos de interés, con el fin de emplear una cantidad de ADN suficiente en experimentos posteriores. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis de 5 muestras de agua desionizada y se determinó el contenido de dC y 5-mdC por dilución isotópica. El límite de detección se calculó como 3 veces la desviación estándar de los blancos. Se obtuvieron valores de 0,57 y 0,74 pmol para dC y 5-mdC, respectivamente. En comparación con otros estudios, estos valores no son los más bajos encontrados empleando esta técnica, pero resultan adecuados para llevar a cabo la

cuantificación en las muestras^{44,45}. Así mismo, la obtención de blancos con valores inferiores es una tarea relativamente complicada, pues cualquier microorganismo puede depositarse en la disolución por vía aérea, degradarse, y contaminar el blanco con ADN, lo cual puede interferir en la determinación a concentraciones tan bajas. Los patrones de ADN se hidrolizaron cinco veces, empleando el procedimiento descrito en la sección de procedimientos adaptado a muestras de 1 μ L. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4. Como puede observarse, tres de las cuatro muestras se determinaron con exactitud y precisión, encontrándose el resultado de la muestra de ADN de cerebro ligeramente por debajo del valor certificado. Así mismo, la incertidumbre de las medidas realizadas, entre el 3 y el 10 % de RSD, hace que el método no sea capaz de discernir entre muestras con un 0,5% de diferencia de porcentaje de metilación, como ocurre en las muestras de riñón e hígado (valores teóricos 6,6 y 7,1%, respectivamente). Esta precisión es, sin embargo, similar a la reportada por otros autores⁴⁶⁻⁴⁸.

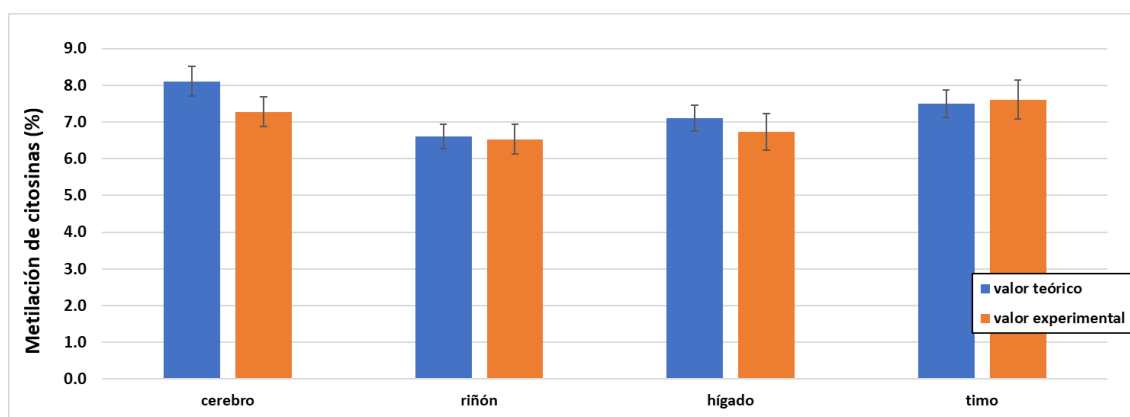


Figura 4. Porcentaje de metilación de citosinas obtenido para los patrones de ADN metilado.

III. 5. Conclusiones

El proceso de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* a gran escala ha demostrado ser eficaz para la producción de biomasa marcada isotópicamente, requiriendo pocos materiales, reactivos y tiempo. Así mismo, los procedimientos de extracción de fracciones desarrollados permiten obtener una mayor cantidad de proteínas y ácidos nucleicos que los procesos análogos miniaturizados sin perder significativamente rendimiento gravimétrico. Por otro lado, los métodos de hidrólisis y de separación y detección de aminoácidos y nucleósidos posibilitan una adecuada caracterización de las moléculas marcadas. Así mismo, el método de Dilución Isotópica empleando los nucleósidos marcados purificados ha permitido la determinación del porcentaje de metilación de citosinas en dos tipos de muestras diferentes con un elevado grado de exactitud y precisión.

III. 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Elizabeth H. Harris. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use, Vol.1*; 2009;
- (2) Harris, E. H. Chlamydomonas as a Model Organism. *Annu Rev Plant Biol* **2001**, 52. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>.
- (3) Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L. K.; Maréchal-Drouard, L.; Marshall, W. F.; Qu, L. H.; Nelson, D. R.; Sanderfoot, A. A.; Spalding, M. H.; Kapitonov, V. v.; Ren, Q.; Ferris, P.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Lucas, S. M.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Grigoriev, I. v.; Rokhsar, D. S.; Grossman, A. R.; Cardol, P.; Cerutti, H.; Chanfreau, G.; Chen, C. L.; Cognat, V.; Croft, M. T.; Dent, R.; Dutcher, S.; Fernández, E.; Fukuzawa, H.; González-Ballester, D.; González-Halphen, D.; Hallmann, A.; Hanikenne, M.; Hippler, M.; Inwood, W.; Jabbari, K.; Kalanon, M.; Kuras, R.; Lefebvre, P. A.; Lemaire, S. D.; Lobanov, A. v.; Lohr, M.; Manuell, A.; Meier, I.; Mets, L.; Mittag, M.; Mittelmeier, T.; Moroney, J. v.; Moseley, J.; Napoli, C.; Nedelcu, A. M.; Niyogi, K.; Novoselov, S. v.; Paulsen, I. T.; Pazour, G.; Purton, S.; Ral, J. P.; Riaño-Pachón, D. M.; Riekhof, W.; Rymarquis, L.; Schroda, M.; Stern, D.; Umen, J.; Willows, R.; Wilson, N.; Zimmer, S. L.; Allmer, J.; Balk, J.; Bisova, K.; Chen, C. J.; Elias, M.; Gendler, K.; Hauser, C.; Lamb, M. R.; Ledford, H.; Long, J. C.; Minagawa, J.; Page, M. D.; Pan, J.; Pootakham, W.; Roje, S.; Rose, A.; Stahlberg, E.; Terauchi, A. M.; Yang, P.; Ball, S.; Bowler, C.; Dieckmann, C. L.; Gladyshev, V. N.; Green, P.; Jorgensen, R.; Mayfield, S.; Mueller-Roeber, B.; Rajamani, S.; Sayre, R. T.; Brokstein, P.; Dubchak, I.; Goodstein, D.; Hornick, L.; Huang, Y. W.; Jhaveri, J.; Luo, Y.; Martínez, D.; Ngau, W. C. A.; Otilar, B.; Poliakov, A.; Porter, A.; Szajkowski, L.; Werner, G.; Zhou, K. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science (1979)* **2007**, 318 (5848). <https://doi.org/10.1126/science.1143609>.
- (4) Lefebvre, P. A.; Laudon, M.; Silflow, C. The Chlamydomonas Resource Center. In *The Biological Resources of Model Organisms*; 2019. <https://doi.org/10.1201/9781315100999-6>.
- (5) <https://www.chlamycollection.org/>.
- (6) Wijffels, R. H.; Barbosa, M. J. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*. 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>.
- (7) Scranton, M. A.; Ostrand, J. T.; Fields, F. J.; Mayfield, S. P. Chlamydomonas as a Model for Biofuels and Bio-Products Production. *Plant Journal* **2015**, 82 (3). <https://doi.org/10.1111/tpj.12780>.

- (8) Reyes-Barrera, K. L.; Soria-Guerra, R. E.; López-Martínez, R.; Huerta, L.; Salinas-Jazmín, N.; Cabello-Gutiérrez, C.; Alpuche-Solís, Á. G. The Entry Blocker Peptide Produced in *Chlamydomonas Reinhardtii* Inhibits Influenza Viral Replication in Vitro. *Front Plant Sci* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.641420>.
- (9) Torzillo, G.; Scoma, A.; Faraloni, C.; Giannelli, L. Advances in the Biotechnology of Hydrogen Production with the Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.900734>.
- (10) Sauer, M. L. A.; Xu, B.; Sutton, F. Metabolic Labeling with Stable Isotope Nitrogen (¹⁵N) to Follow Amino Acid and Protein Turnover of Three Plastid Proteins in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Proteome Sci* **2014**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-14>.
- (11) Mühlhaus, T.; Weiss, J.; Hemme, D.; Sommer, F.; Schroda, M. Quantitative Shotgun Proteomics Using a Uniform ¹⁵N-Labeled Standard to Monitor Proteome Dynamics in Time Course Experiments Reveals New Insights into the Heat Stress Response of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Molecular and Cellular Proteomics* **2011**, *10* (9). <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004739>.
- (12) Singh, H.; Shukla, M. R.; Chary, K. V. R.; Rao, B. J. Acetate and Bicarbonate Assimilation and Metabolite Formation in *Chlamydomonas Reinhardtii*: A ¹³C-NMR Study. *PLoS One* **2014**, *9* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106457>.
- (13) Martzloff, A.; Cahoreau, E.; Cogne, G.; Peyriga, L.; Portais, J. C.; Dechandol, E.; le Grand, F.; Massou, S.; Gonçalves, O.; Pruvost, J.; Legrand, J. Photobioreactor Design for Isotopic Non-Stationary ¹³C-Metabolic Flux Analysis (INST ¹³C-MFA) under Photoautotrophic Conditions. *Biotechnol Bioeng* **2012**, *109* (12). <https://doi.org/10.1002/bit.24575>.
- (14) Nicolás Carcelén, J.; Marchante-Gayón, J. M.; González, P. R.; Valledor, L.; Cañal, M. J.; Alonso, J. I. G. A Cost-Effective Approach to Produce ¹⁵N-Labelled Amino Acids Employing *Chlamydomonas Reinhardtii* CC503. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0759-9>.
- (15) Wasito, H.; Hermann, G.; Fitz, V.; Troyer, C.; Hann, S.; Koellensperger, G. Yeast-Based Reference Materials for Quantitative Metabolomics. *Anal Bioanal Chem* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03694-w>.
- (16) Rampler, E.; Abiead, Y. el; Schoeny, H.; Rusz, M.; Hildebrand, F.; Fitz, V.; Koellensperger, G. Recurrent Topics in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics - Standardization, Coverage, and Throughput. *Analytical Chemistry*. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04698>.
- (17) Kilpatrick, E. L.; Liao, W. L.; Camara, J. E.; Turko, I. v.; Bunk, D. M. Expression and Characterization of ¹⁵N-Labeled Human C-Reactive Protein in *Escherichia Coli* and *Pichia*

- Pastoris for Use in Isotope-Dilution Mass Spectrometry. *Protein Expr Purif* **2012**, 85 (1). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.06.019>.
- (18) Yue, H.; Nie, X.; Yan, Z.; Weining, S. N6-Methyladenosine Regulatory Machinery in Plants: Composition, Function and Evolution. *Plant Biotechnology Journal*. 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13149>.
- (19) Breiling, A.; Lyko, F. Epigenetic Regulatory Functions of DNA Modifications: 5-Methylcytosine and Beyond. *Epigenetics and Chromatin*. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0016-6>.
- (20) Fu, Y.; Luo, G. Z.; Chen, K.; Deng, X.; Yu, M.; Han, D.; Hao, Z.; Liu, J.; Lu, X.; Doré, L. C.; Weng, X.; Ji, Q.; Mets, L.; He, C. N6-Methyldeoxyadenosine Marks Active Transcription Start Sites in Chlamydomonas. *Cell* **2015**, 161 (4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.010>.
- (21) Valledor, L.; Escandón, M.; Meijón, M.; Nukarinen, E.; Cañal, M. J.; Weckwerth, W. A Universal Protocol for the Combined Isolation of Metabolites, DNA, Long RNAs, Small RNAs, and Proteins from Plants and Microorganisms. *Plant Journal* **2014**, 79 (1). <https://doi.org/10.1111/tpj.12546>.
- (22) Winnepeninckx, B. DNA Extraction - CTAB Method. *Cell Harvesting* **2009**, No. March. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec11731>.
- (23) Heikrujam, J.; Kishor, R.; Behari Mazumder, P. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. In *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*; 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92206>.
- (24) Turgeon, C.; Magera, M. J.; Allard, P.; Tortorelli, S.; Gavrilov, D.; Oglesbee, D.; Raymond, K.; Rinaldo, P.; Matern, D. Combined Newborn Screening for Succinylacetone, Amino Acids, and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clin Chem* **2008**, 54 (4). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101949>.
- (25) Reyes, L. H.; Sanz, F. M.; Espílez, P. H.; Marchante-Gayón, J. M.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Meder, A. Biosynthesis of Isotopically Enriched Selenomethionine: Application to Its Accurate Determination in Selenium-Enriched Yeast by Isotope Dilution Analysis-HPLC-ICP-MS. In *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*; 2004; Vol. 19. <https://doi.org/10.1039/b403662j>.
- (26) Giner Martínez-Sierra, J.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Biosynthesis of Sulfur-34 Labelled Yeast and Its Characterisation by Multicollector-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* **2007**, 22 (9). <https://doi.org/10.1039/b706217f>.
- (27) Fernández-Fernández, M.; Rodríguez-González, P.; Hevia Sánchez, D.; González-Menéndez, P.; Sainz Menéndez, R. M.; García Alonso, J. I. Accurate and Sensitive Determination of Molar Fractions of ¹³C-Labeled Intracellular Metabolites in Cell Cultures Grown in the Presence of

Isotopically-Labeled Glucose. *Anal Chim Acta* **2017**, 969.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.019>.

- (28) Kwak, M.; Park, W. K.; Shin, S. E.; Koh, H. G.; Lee, B.; Jeong, B. ryool; Chang, Y. K. Improvement of Biomass and Lipid Yield under Stress Conditions by Using Diploid Strains of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Algal Res* **2017**, 26. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.027>.
- (29) Valledor, L.; Furuhashi, T.; Recuenco-Muñoz, L.; Wienkoop, S.; Weckwerth, W. System-Level Network Analysis of Nitrogen Starvation and Recovery in *Chlamydomonas Reinhardtii* Reveals Potential New Targets for Increased Lipid Accumulation. *Biotechnol Biofuels* **2014**, 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0171-1>.
- (30) Valledor, L.; Furuhashi, T.; Hanak, A. M.; Weckwerth, W. Systemic Cold Stress Adaptation of *Chlamydomonas ReinhardtIII*. *Molecular and Cellular Proteomics* **2013**, 12 (8). <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.026765>.
- (31) <http://www.epochlifescience.com/Product/SpinColumn/minispin.aspx>.
- (32) Jordon-Thaden, I. E.; Chanderbali, A. S.; Gitzendanner, M. A.; Soltis, D. E. Modified CTAB and TRIzol Protocols Improve RNA Extraction from Chemically Complex Embryophyta. *Appl Plant Sci* **2015**, 3 (5). <https://doi.org/10.3732/apps.1400105>.
- (33) Bo, Y. Y.; Liang, L. D.; Hua, Y. J.; Zhao, Z.; Yao, M. S.; Shan, L. B.; Liang, C. Z. High-Purity DNA Extraction from Animal Tissue Using Picking in the TRIzol-Based Method. *Biotechniques* **2020**, 70 (3). <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0142>.
- (34) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I. Determination of the Enrichment of Isotopically Labelled Molecules by Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, 49 (8). <https://doi.org/10.1002/jms.3397>.
- (35) Dudley, E.; Bond, L. Mass Spectrometry Analysis of Nucleosides and Nucleotides. *Mass Spectrom Rev* **2014**, 33 (4). <https://doi.org/10.1002/mas.21388>.
- (36) Neubauer, S.; Rugova, A.; Chu, D. B.; Drexler, H.; Ganner, A.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Hann, S.; Koellensperger, G. Mass Spectrometry Based Analysis of Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases-Application to Feed Supplements. *Anal Bioanal Chem* **2012**, 404 (3). <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6170-9>.
- (37) Ramaley, L.; Herrera, L. C. Software for the Calculation of Isotope Patterns in Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, 22 (17). <https://doi.org/10.1002/rcm.3668>.

- (38) Hart, A. H.; Hartley, L.; Parker, K.; Ibrahim, M.; Looijenga, L. H. J.; Pauchnik, M.; Chow, C. W.; Robb, L. The Pluripotency Homeobox Gene NANOG Is Expressed in Human Germ Cell Tumors. *Cancer* **2005**, *104* (10). <https://doi.org/10.1002/cncr.21435>.
- (39) Pan, G.; Thomson, J. A. Nanog and Transcriptional Networks in Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cell Research*. 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310125>.
- (40) Koza, R. A.; Rogers, P.; Kozak, L. P. Inter-Individual Variation of Dietary Fat-Induced Mesoderm Specific Transcript in Adipose Tissue within Inbred Mice Is Not Caused by Altered Promoter Methylation. *Epigenetics* **2009**, *4* (7). <https://doi.org/10.4161/epi.4.7.10031>.
- (41) Karbiener, M.; Glantschnig, C.; Pisani, D. F.; Laurencikiene, J.; Dahlman, I.; Herzig, S.; Amri, E. Z.; Scheideler, M. Mesoderm-Specific Transcript (MEST) Is a Negative Regulator of Human Adipocyte Differentiation. *Int J Obes* **2015**, *39* (12). <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.121>.
- (42) Lin, C. C. Clinical Development of Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (Csf1r) Inhibitors. *J Immunother Precis Oncol* **2021**, *4* (2). <https://doi.org/10.36401/JIPO-20-32>.
- (43) Chockalingam, S.; Ghosh, S. S. Macrophage Colony-Stimulating Factor and Cancer: A Review. *Tumor Biology*. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2627-0>.
- (44) Lai, W.; Mo, J.; Yin, J.; Lyu, C.; Wang, H. Profiling of Epigenetic DNA Modifications by Advanced Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.031>.
- (45) Huang, W.; Qi, C. B.; Lv, S. W.; Xie, M.; Feng, Y. Q.; Huang, W. H.; Yuan, B. F. Determination of DNA and RNA Methylation in Circulating Tumor Cells by Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2016**, *88* (2). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03962>.
- (46) Godderis, L.; Schouteden, C.; Tabish, A.; Poels, K.; Hoet, P.; Baccarelli, A. A.; van Landuyt, K. Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/845041>.
- (47) Kurdyukov, S.; Bullock, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*. 2016. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>.
- (48) Nakagawa, T.; Wakui, M.; Hayashida, T.; Nishime, C.; Murata, M. Intensive Optimization and Evaluation of Global DNA Methylation Quantification Using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (27). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02115-3>.

CAPÍTULO 4

***Desarrollo de una metodología para la
identificación de metabolitos intracelulares
naturales y marcados en ^{15}N
en *Chlamydomonas reinhardtii****

IV. 1. INTRODUCCIÓN

IV. 1.1. Identificación de compuestos en metabolómica no dirigida

En 2005 se creó la Iniciativa de Estándares en Metabolómica, MSI¹, dedicada a generar un consenso global sobre estándares de calidad y buenas prácticas en metabolómica. Entre estas prácticas se encuentra, por ejemplo, que en los estudios de metabolómica se incluya una clara descripción del sistema biológico y de los demás componentes del estudio (metodología, finalidad, etc.). De este modo, el objetivo último de este tipo de investigaciones debe ser que los resultados y el contenido de estas puedan ser compartidos y reutilizados. Así mismo, de los cinco grupos de trabajo que componen el MSI, el grupo de análisis químico (CAWG) estableció los mínimos de información requerida respecto de la identificación de compuestos². Esto implicaba clasificar los metabolitos detectados en cuatro grupos de identificación con diferentes niveles de confianza, que fueron ampliados por Schymanski *et al.*³ a cinco principales grupos de identificación. Los dos primeros grupos se refieren a la identificación de la estructura, siendo el nivel 1 el de más confianza, ya que, a través de la comparación con patrones, se confirma la estructura molecular, el tiempo de retención e información espectral MS y MS/MS. Por otro lado, el nivel 2 indica una estructura probable, no confirmada con patrones, pero cuya información coincide con información bibliográfica o con una base de datos de espectros o, aun si no existe esta información de referencia, se ha llevado a cabo un meticuloso diagnóstico que evidencia la identificación. A continuación, se encuentran los niveles 3, 4 y 5. El nivel 3 se refiere a una estructura molecular no exacta, donde la posición de ciertos elementos o grupos funcionales no se puede asignar (isómeros posicionales), mientras que el nivel 4 se refiere a la determinación de una fórmula empírica que es obtenida a través de la masa exacta, los isótopos y los aductos, y el nivel 5 se refiere a “masa inequívoca”.

Actualmente, la mayoría de las identificaciones reportadas en metabolómica no dirigida se encuentran en el nivel de confianza 2, por ser realizadas a través de bases de datos de espectros. Para ello se suele emplear el propio software del instrumento analítico, como por ejemplo: Compound Discoverer (Thermo), Progenesis QI (Waters), MetaboScape (Bruker) y MassHunter Profinder o Unknowns (Agilent); o software abierto como MS-DIAL⁴, METLIN⁵, LipidAnnotator⁶ o MS-Finder⁷, que emplean bases de datos de espectros públicas como METLIN⁸, MassBank⁹, LipidBlast¹⁰ o GNPS¹¹.

La mayoría de los compuestos identificados en metabolómica no dirigida no se cumplen los requisitos de una identificación de nivel 1 o 2. Generalmente esto no es debido a que falte información de fragmentación (MS2) o por variaciones en la determinación o asignación (diferente energía de colisión empleada, incertidumbre en la masa exacta, etc.), sino porque el 98 % de los picos detectados en metabolómica no dirigida se corresponden con *materia oscura*¹²,

esto es, analitos para los que no se disponen patrones. Sin embargo, que un analito no esté completamente identificado no quiere decir que no pueda ser relevante, ya sea por el hecho de tratarse de un analito estadísticamente significativo y con importancia biológica, o por el hecho de que, al ser detectado y reportado, se proporcione información valiosa a otros grupos de investigación. Este último es uno de los objetivos de la MSI, llevar a cabo la anotación completa de metabolomas a través de la coordinación o colaboración de diferentes equipos a nivel global y de forma descentralizada¹³. Así mismo, otra iniciativa interesante en la identificación de compuestos es el concurso CASMI (Critical Assessment of Small Molecule Identification), el cual supone una plataforma de contacto y de ayuda para científicos a nivel global a través del planteamiento de retos¹⁴.

IV. 1.2. Identificación de compuestos marcados en metabolómica

Previamente se han descrito diversas plataformas y sus particularidades en la identificación de metabolitos empleando Espectrometría de Masas de alta resolución. En lo que respecta a la identificación de metabolitos marcados isotópicamente, las estrategias de identificación dependen del objetivo de la investigación. Si se trata de metabolómica dirigida o semidirigida, la mayoría de las herramientas presentadas previamente pueden ser empleadas, por ejemplo, en el caso de experimentos de fluxómica empleando moléculas marcadas. Sin embargo, en lo que respecta a metabolómica no dirigida, la identificación de compuestos marcados es más compleja y requiere de herramientas específicas que van más allá de la comparación con bases de datos de compuestos marcados¹⁵. A tal efecto se han desarrollado paquetes (código) para este tratamiento de datos específico, así como software libre como Metandem¹⁶, geoRge¹⁷, mzMatch-ISO¹⁸, MAVEN¹⁹, HiResTech²⁰, DynaMet²¹, X13CMS²² o MetExtract²³²⁴. Las diferencias entre estas herramientas son el lenguaje de programación (Java, Python, R, etc.) y los algoritmos empleados durante las diferentes etapas del procesado de datos (peak picking, agrupamiento y evaluación estadística). Así mismo, a la hora de comparar estas herramientas también deben tenerse en cuenta otros factores como si disponen de una *interfaz gráfica de usuario* (GUI) o si realiza una identificación de los picos y su presentación gráfica²⁵, así como las características concretas de la investigación y sus objetivos.

MetExtract es un software desarrollado en la Universidad de agronomía de Viena en 2012²⁶. Este software procesa datos de LC-HRMS y LC-HRMS/MS de mezclas de muestras conteniendo analitos marcados y no marcados. Generalmente las mezclas se realizan de tal forma que los metabolitos presentan abundancias similares, observándose en el espectro de masa, idealmente, una contribución del 50 % por parte del análogo marcado. En general, el adecuado funcionamiento del software requiere que se haya realizado el experimento con un solo isótopo

estable, que la molécula marcada presente un elevado enriquecimiento isotópico (>98 %) y que los clústeres del compuesto natural y marcado no se solapen. Así mismo, el procesamiento de datos se realiza de acuerdo a determinados parámetros introducidos en el software. Entre esos parámetros, que pueden ser reales o tentativos, destacan la abundancia del isótopo ligero y la del isótopo pesado, el ratio ligero:pesado que se espera encontrar en los metabolitos, el número de isótopos pesados presentes en una o más moléculas y la máxima desviación de masa permitida (error de masa). Con todo ello, para cada característica detectada, a cada tiempo de retención, el software clasifica y ordena parejas de relaciones masa-carga. Así, los incrementos de masa, característicos y únicos, y los clústeres isotópicos de los metabolitos natural y marcado se emplean para discriminar entre metabolitos marcados y no marcados y asignar el número total de isótopos pesados en la molécula marcada. Es una herramienta que, por lo tanto, presenta una elevada fiabilidad en la anotación de los compuestos. Por otro lado, MetExtract II, una versión actualizada, presenta tres módulos de trabajo: AllExtract, TracExtract y FragExtract, siendo el primero de ellos el que se emplea para el tratamiento de datos MS1. El empleo de FragExtract es interesante porque permite identificar moléculas marcadas a través de la comparación de fragmentos MS2 de los iones seleccionados y en sus fragmentos.

IV. 2. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo ha sido caracterizar a través de HPLC-HRMS una mezcla de metabolitos marcados en ^{15}N procedentes de la extracción de metabolitos intracelulares de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas en un medio enriquecido en ^{15}N . Para la identificación de los compuestos marcados será necesaria primero la identificación de los compuestos análogos naturales a través del programa MSDIAL. Una vez identificados los compuestos naturales, el programa MetExtract selecciona características químicas experimentales (MS1) de un espectro de masas como compuestos marcados, siendo parte de una pareja de compuestos (natural y marcado). Así mismo, los compuestos seleccionados se fragmentarán para estudiar la similitud de sus espectros de fragmentación, estableciendo así la adecuación de la correspondencia de los analitos marcados con los naturales. Para todo ello, el procesado de los datos se realizará con el programa Rstudio desarrollando un código en lenguaje R.

Esta investigación ha sido llevada a cabo durante una estancia predoctoral en la Universidad de Viena bajo la tutela de la profesora Gunda Koellensperger.

IV. 3. EXPERIMENTAL

IV. 3.1. Reactivos y materiales

Las *Chlamydomonas reinhardtii* (cepa CC503 cw92 mt+) se adquirieron al Chlamydomonas Resource Center de la Universidad de Minnesota, Estados Unidos (EEUU). La obtención de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas en ^{14}N y en ^{15}N se detalla en el Capítulo 3. El formiato amónico se adquirió en Sigma-Aldrich (MO, EEUU). Ácido fórmico, agua, acetonitrilo y metanol (grado LC-MS) se adquirieron en Fisher Scientific (Reino Unido). El cloroformo se compró en Merck (Alemania). Los tubos Eppendorf® de 2 mL se adquirieron en Eppendorf (Hamburgo, Alemania). La disolución de calibrado Pierce FlexMix para calibrar el espectrómetro de masas se adquirió en Thermo (MA, EEUU).

IV. 3.2. Instrumentación

La separación cromatográfica se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de alta resolución Vanquish de Thermo, el cual estaba conectado a un espectrómetro de masas Q Exactive HF (Thermo) a través de una fuente de ionización HESI operando en modo positivo y negativo. Para la pesada de las muestras se empleó una balanza analítica MS205DU semi-micro (Mettler Toledo). Una centrífuga Thermo Micro (Thermo) y un evaporador SP Genevac EZ-2 Series (SP Industries, Warminster, PA) se emplearon durante la preparación de las muestras. Un pH-metro Mettler Toledo (Barcelona, ES) se empleó para ajustar el pH de las fases móviles.

IV. 3.3. Procedimientos

IV. 3.3.1. Extracción de metabolitos

Todo el proceso se realiza en frío, con las muestras depositadas en una caja con hielo para su mejor conservación. Para la extracción se tomaron 20 mg de material liofilizado (^{15}N) o 150 mg de material húmedo (^{14}N). Las muestras se homogenizan en 800 μL de mezcla de extracción (metanol:cloroformo:agua 2,5:1:0,5 v/v/v) a 4 °C realizando 5 ciclos de congelado-descongelado para romper las células, aplicando vortex entre un congelado y otro. A continuación, se centrifugan las muestras (6 min, 20000 G, 4 °C), se toma el sobrenadante y se transfiere a un tubo de 2 mL que contiene 400 μL de cloroformo:agua 1:1 (*tubo A*). Este proceso de extracción del pellet se repite y el sobrenadante se vuelve a añadir al *tubo A*. Seguidamente, se agita vigorosamente el *tubo A* y se centrifuga (6 min, 20000 G, 4 °C) para separar las fases polar y no polar. La fase polar se transfiere a un *tubo B* con 600 μL de cloroformo:agua 1:1 para volver a

extraer. Finalmente, la fase polar se transfiere a un *tubo C* y se evapora a temperatura ambiente en un evaporador.

IV. 3.3.2. Separación y determinación de compuestos por UPLC-HRMS/MS

Para la separación se emplea una columna Waters Acquity UPLC BEH Amide (1,7 μm x 2,1 x 150 mm) con una precolumna Waters Acquity UPLC BEH Amide VanGuard (1,7 μm x 2,1 mm x 5 mm). La separación cromatográfica se realiza en gradiente empleando como fase A agua con formiato amónico 10mM, ácido fórmico 0,125 % (pH 3) y fase B acetonitrilo:agua 95:5 (v/v) con formiato amónico 10mM, ácido fórmico 0,125 % (pH 3). La temperatura de la columna es 45 °C y el flujo 0,4 mL/min. El programa cromatográfico se detalla en la Tabla 1.

Para los análisis por MS se realiza un barrido completo (Full Scan) entre 60 y 900 m/z (resolución 120.000), mientras que para los análisis MS/MS se emplea Monitorización de Reacciones Paralelas (PRM) en modo dependiente de datos (ddMS2), seleccionando los 5 iones precursores con más abundancia (top 5) y una rampa de energía de colisión de 20 a 40 eV. En la fragmentación se excluyen los isotopólogos y se establece un umbral de intensidad de 10.000 cuentas. Las medidas se realizan tanto en ionización positiva como en ionización negativa. La velocidad de adquisición es 500 ms por espectro de masas y 130 ms por espectro de fragmentación. Los parámetros instrumentales se optimizan mediante inyección directa de una disolución estándar de aminoácidos 1 $\mu\text{g/g}$. Los valores óptimos se recogen en la Tabla 1. Para la determinación de compuestos en modo dependiente de datos se introducen listas de inclusión provenientes de los resultados del programa MetExtract. Se llevan a cabo medidas *Full Scan* de mezclas de metabolitos y de extractos con abundancia isotópica natural y enriquecidos isotópicamente de forma individual y como mezclas, mientras que las medidas con fragmentación se realizan solo de los extractos individuales.

Tabla 1. Parámetros seleccionados para la separación y detección de metabolitos.

Cromatógrafo	Vanquish
Columna	Waters Acquity BEH Amide 130A (150 x 2,1mm x 1,7 μm)
Precolumna	VanGuard 130A (5 x 2,1mm x 1,7 μm)
Flujo	0,4 mL·min ⁻¹
Fase móvil A	H ₂ O, 0,125 % ácido fórmico, 10 mM formiato amónico
Fase móvil B	5% fase móvil A 95 % ACN, 0,125 % ácido fórmico, 10 mM formiato amónico
Programa de separación	0 min (100 %B) 2 min (100 %B) 7,7 min (70 %B)

Programa de separación	9,5 min (40 %B) 10,75 min (30 %B) 12,75 min (100 %B) 17 min (100 %B)
Volumen de inyección	1 µL
Temperatura de la columna	40 °C
Espectrometro de masas	Q Exactive HF
Fuente de ionización	Heated Electrospray (HESI)
Modo de ionización	Positivo y negativo
Temperatura del capilar	300 °C
Temperatura del gas de recubrimiento	370 °C
Flujo del gas de recubrimiento	60 mL/min
Flujo del gas auxiliar	25 mL/min
Flujo del gas de barrido	2 mL/min
Voltaje del spray	3,5 kV
Corriente del spray	50 µA
Nivel RF de lentes S	30

IV. 3.3.3. Pretratamiento de datos

Los archivos crudos (.raw) obtenidos se transforman a formatos .mzXML y .abf para su posterior uso (MetExtract, MSDIAL y SIRIUS) empleando software libre. Así, ProteoWizard MSConvert se emplea para la conversión a mzXML²⁷, mientras que para convertir los archivos al formato .abf se emplea SFile Reader y Reifycs ABF converter²⁸. En ambos casos los datos se centran. Adicionalmente, se emplea TOPP View para la inspección visual de los datos y obtener información básica de los mismos²⁹.

Los tres programas empleados en el pretratamiento de los datos presentan sencillas interfaces (GUI) para su uso, las cuales se muestran en la Figura 1.

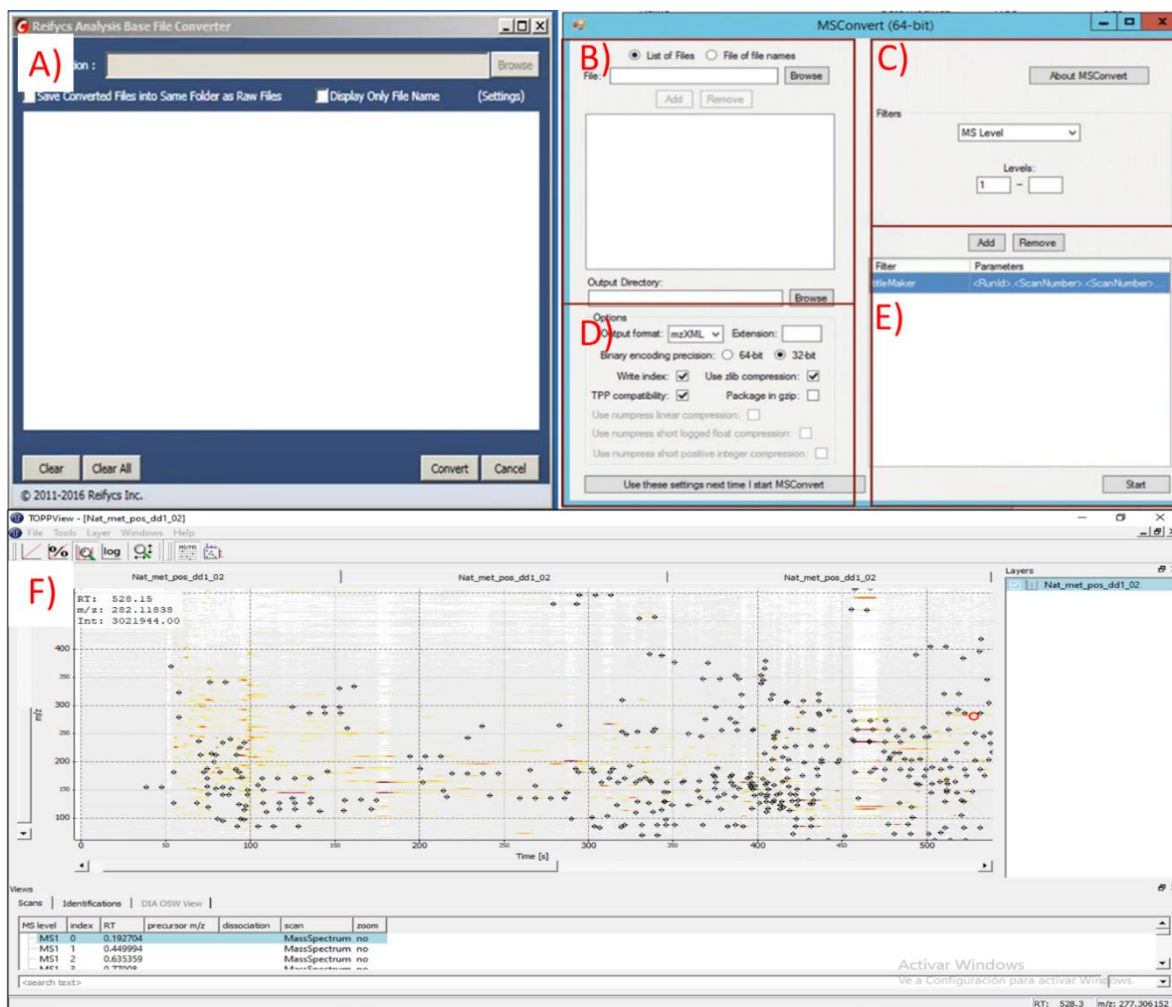


Figura 1. Diferentes interfaces gráficas de usuario empleadas en el pretratamiento de datos: A) Reifycs ABF converter, B,C,D,E) MSConverter, F) TOPPView.

IV. 3.3.4. Identificación de parejas de compuestos naturales y marcados con MetExtract II

El programa MetExtract II presenta tres módulos de trabajo: AllExtract, TracExtract y FragExtract. El primero de ellos se emplea para el tratamiento de datos MS1. Los archivos Full Scan de mezclas natural: marcado, alineados y en formato .mzXML, se introducen en el software MetExtract con la opción de anotación múltiple (n=3). Adicionalmente, un archivo de una muestra de disolvente se introduce como blanco para la automática corrección del mismo. Los datos adquiridos en modo positivo y en modo negativo se tratan independientemente. Se establece una relación natural: marcado mínima de 0,05 y máxima de 2. Los principales parámetros seleccionados para el procesado de los datos se detallan en la Tabla 2. No se realiza ningún tipo de posprocesado (anotación o identificación) de los resultados con MetExtract.

Tabla 2. Principales parámetros seleccionados para el tratamiento de datos con MetExtract.

Parámetro	Valor
Elemento ligero, M (abundancia, %)	¹⁴ N (98,93%)
Elemento pesado, M' (abundancia, %)	¹⁵ N (99,51%)
Relación M:M' mínima	≥0,05
Relación M:M' máxima	≤2
Número de átomos M'	1-10
Rango cromatográfico	0-17 min
Intensidad umbral	≥100.000
Número de cargas	+1
Desviación en masa	± 5 ppm
Ventana para agrupar	≤ 4 ppm
Scans para agrupar	≥ 6

IV. 3.3.5. Identificación de compuestos naturales con MSDIAL

Los archivos en formato .abf se introducen en el software MSDIAL. Los datos adquiridos en modo positivo y en modo negativo se tratan independientemente. Para el agrupamiento de los datos se selecciona una tolerancia de 0.01 Da en MS1 y de 0.05 Da para archivos MS2. Los datos sobre la duración del cromatograma y rango de masas medido se adaptan del método. En el procesamiento de datos solo se consideran los iones monocargados (+1/-1), con intensidad mínima de pico de 10.000 y no se consideran los átomos de Cl ni de Br ni se aplica ningún método de suavizado de datos (*smoothing*). Para la identificación se emplean las librerías MSP “Fiehn-HILIC”, “MassBank” y “ESI(+)-MS/MS from authentic standards”³⁰, la cuales presentan características de espectros de masas de 3.000, 13.000 y 25.000 compuestos, respectivamente, en ionización positiva y negativa. No se puntúan ni filtran los resultados por comparación con el tiempo de retención o con la identificación automática (la tolerancia en masa es la misma que la seleccionada en el agrupamiento). En ionización positiva se seleccionan los aductos de sodio, potasio, amonio y acetonitrilo. En ionización negativa se seleccionan los aductos de cloruro. Los resultados obtenidos se inspeccionan para su curación.

IV. 3.3.6. Tratamiento de datos con comandos

Debido al volumen y a la complejidad de los datos, para su procesamiento, limpieza y análisis se emplea el lenguaje de programación R (versión 4.1.0) y R studio (versión 1.4.1717) usando los siguientes paquetes de datos: data.table, tibble, dplyr, stringr, enviPat, ggplot2 y ggpmisc.

Los archivos de ionización positiva y de ionización negativa se tratan de forma independiente, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- 1) Se instalan y se cargan los paquetes necesarios en RStudio
- 2) Se cargan las tablas de compuestos naturales identificados (“tabla NAT”) de MSDIAL y se funcionalizan como data.table

- 3) Se juntan las diferentes tablas en una sola.
- 4) Compuestos naturales:
 - a. Se eliminan los compuestos que no han sido identificados.
 - b. Se eliminan los compuestos que no presentan espectro de fragmentación.
 - c. Se genera una columna con valores redondeados de m/z .
 - d. Análisis de nitrógenos:
 - i. Se detectan las moléculas que tienen nitrógeno.
 - ii. Se eliminan las moléculas que no tienen nitrógeno.
 - iii. Se genera una columna con el número de nitrógenos de cada molécula.
 - iv. Se genera una columna con los valores teóricos de m/z para el compuesto marcado.
- 5) Se cargan los datos de MetExtract II, se eliminan duplicidades y se redondean los m/z .
- 6) Se comparan los m/z de los compuestos naturales de la Tabla Nat y la tabla de MetExtract. Se fusionan ambas tablas de acuerdo con los valores de m/z naturales y marcados. A su vez, se eliminan aquellos compuestos identificados que no coinciden.
- 7) Se eliminan aquellos compuestos que presentan un tiempo de retención fuera del rango de tiempo de retención asignado por MetExtract.
- 8) Se cargan las tablas de los compuestos marcados fragmentados (“tabla LAB”):
 - a. Se eliminan los compuestos que no tienen espectro de fragmentación
 - b. Se genera una columna con los valores de m/z redondeados.
- 9) Se fusiona la tabla NAT con la tabla LAB.
- 10) Se eliminan las filas cuyo tiempo de retención para el compuesto marcado no coincide con el asignado por MetExtract.
- 11) Se generan dos columnas con los pesos moleculares teóricos para cada fórmula molecular (natural y marcado).
- 12) A partir de las columnas que contienen los espectros de fragmentación del compuesto natural y marcado se desarrolla el código para representar los espectros de fragmentación enfrentados de los compuestos naturales y marcados.

IV. 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 4.1. Inspección de la separación cromatográfica y la detección

La separación cromatográfica se realizó empleando las condiciones HILIC establecidas por Fiehn *et. al* en el Metabolomics Center UC Davis para la separación de metabolitos con el objetivo de obtener resultados similares y tener una referencia para los resultados obtenidos³¹. La librería Fiehn-HILIC presenta 1.700 compuestos, separados y detectados bajo estas condiciones.

Estas condiciones se emplearon para analizar una muestra de patrones de 178 metabolitos, los extractos naturales, los extractos marcados y las mezclas de extractos naturales y marcados. La separación cromatográfica se llevó a cabo en 17 minutos. De la muestra de patrones (aminoácidos, intermediarios energéticos y bases nitrogenadas) se obtuvieron tiempos de retención y masas exactas de referencia, los cuales se emplearon en el posterior tratamiento de datos para alcanzar una identificación con nivel de confianza 1.

En la Figura 2 se presentan dos cromatogramas de muestras de extracto natural y marcado en ionización positiva. Se representan sólo los primeros diez minutos al ser la zona de elución de compuestos. Dado que el método de extracción elimina compuestos apolares de la muestra, se observa un cromatograma relativamente limpio. Por otro lado, dado el diferente estado inicial de las muestras se observa una mayor intensidad en los picos del extracto natural y diferencias sustanciales en la línea base debido a la matriz de la muestra.

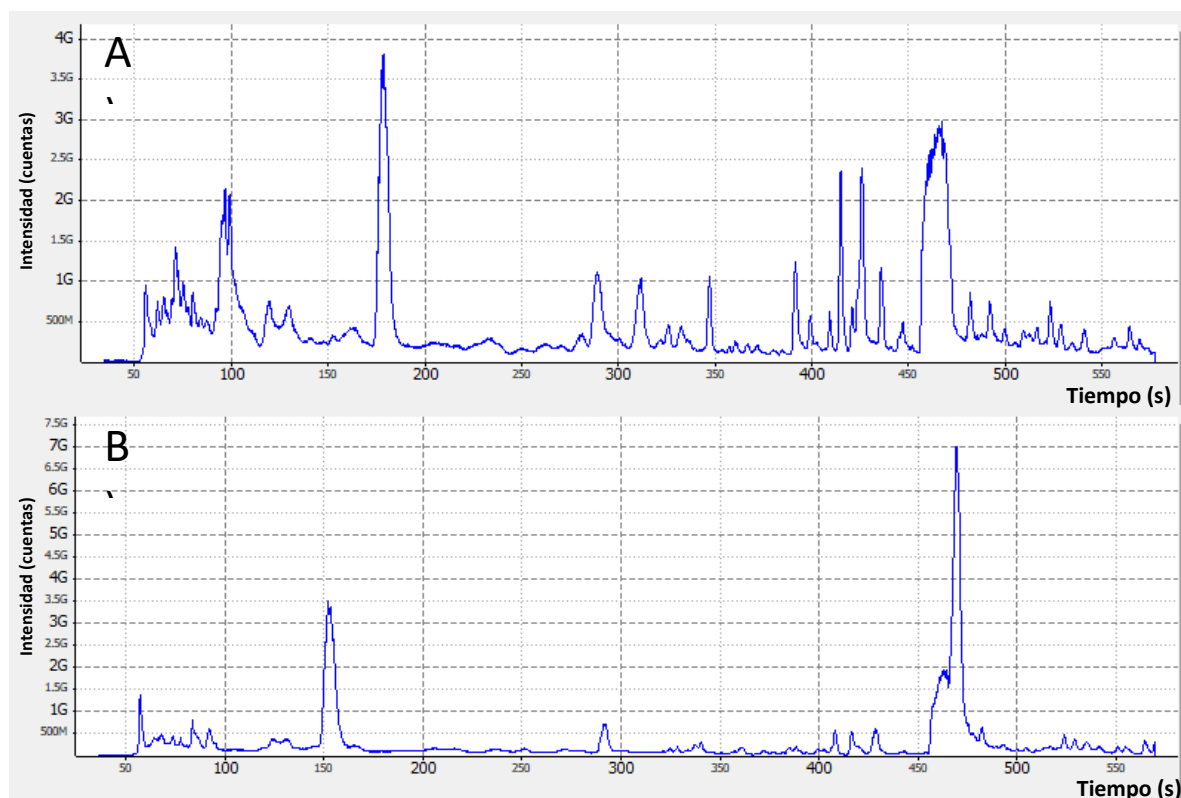


Figura 2. Cromatogramas LC-MS de extracto natural (A) y de extracto marcado (B) en ionización positiva.

IV. 4.2. Identificación de parejas de compuestos naturales y marcados con MetExtract II

El programa MetExtract II está diseñado para funcionar de forma óptima cuando la relación compuesto natural:compuesto marcado es 1:1. Sin embargo, esta relación entre analitos rara vez se encuentra dado que los metabolitos de muestras biológicas presentan rangos dinámicos de concentración y las muestras no siempre se encuentran en el mismo estado. Así mismo, también influye el estado inicial de la muestra (diferentes porcentajes de agua) y los procesos de tratamiento de muestra y extracción. Como se ha mencionado previamente, la matriz de cada extracto es diferente. Ese es el motivo principal por el cual MetExtract solo funciona para mezclas de compuesto natural:compuesto marcado ya que es la única forma de asegurar la coelución (siempre y cuando no se trate de marcaje con deuterio ni ocurran efectos isotópicos).

Los extractos de metabolitos se mezclaron en diferentes proporciones natural:compuesto marcado (1:5, 1:10, 1:50) para comprobar las variaciones en los resultados obtenidos con MetExtract y determinar empíricamente la estequiometría de la mezcla más adecuada (la más cercana al ratio de señales 1:1) para los siguientes experimentos. En la Tabla 3 se recogen los resultados más relevantes obtenidos para las diferentes mezclas. Como se puede ver en la tabla, para las tres mezclas el software identifica entre 400 y 550 compuestos apareados, de los cuales $\frac{2}{3}$ se encuentran en ionización positiva. Así mismo, se observan enriquecimientos isotópicos entre el 52% y el 9 %.

En esta tabla el enriquecimiento isotópico da una idea del enriquecimiento isotópico global del ajuste realizado y las características y compuestos seleccionados por el software. Este parámetro es muy informativo pues, sabiendo que el enriquecimiento isotópico esperable es superior al 99 %³², se puede deducir el porcentaje (probabilidad) de compuestos seleccionados que verdaderamente se podrían encontrar marcados. Sin embargo, cabe destacar que la medida del enriquecimiento isotópico aquí es muy inexacta, pues coeluyen un elevado número de compuestos, algunos de ellos con valores de m/z iguales (ion molecular o fragmentos de diferentes compuestos). Por ello se encuentran valores de enriquecimiento muy bajos en algunos casos. Por otro lado, a pesar de que la mezcla A es aquella en la que más compuestos pareados se detectaron, su enriquecimiento isotópico global es menor que en las otras mezclas.

Con el fin de establecer la adecuación de los resultados se llevó a cabo la búsqueda del aminoácido alanina (para el patrón: m/z=90, r.t.=8,05 min) entre los resultados de ionización positiva y no se encontraron sus características en la mezcla A ni C. Sin embargo, en la mezcla B (1:10) sí se encontraron las características de la alanina, un aminoácido estable y esperable tanto en las muestras de extractos naturales como marcados. Por otro lado, dado que la muestra natural era fresca y la marcada liofilizada, una proporción 1:10 sería la más cercana a la proporción 1:1 en masa³². Por lo tanto, se tomaron los datos de salida de las mezclas 1:10 (lista de pares de m/z natural-marcado y sus tiempos de retención) para proseguir con la estrategia de identificación de compuestos marcados. Cabe destacar que el número de elementos global no coincide con la suma del número de características. Esto se debe a que es un valor promedio de tres inyecciones y se dan algunas duplicidades. Con el fin de ilustrar la apariencia de los resultados, los diez primeros elementos de la lista obtenida con MetExtract se presentan en la Tabla 4. A pesar de que esta tabla no contiene los 676 elementos de la tabla original, a efectos de tratamiento de datos, cuando se haga referencia a la Tabla 4 se referirá a la tabla completa con los 676 elementos.

Tabla 3. Resultados obtenidos con MetExtract (AllExtract) para diferentes mezclas de compuestos natural:marcado.

Mezcla	Relación natural: marcado	Polaridad	Características detectadas (promedio)	Número de compuestos (promedio)	Enriquecimiento isotópico (promedio)	Número de elementos global
A	1:5	+	433	381	32 %	646
		-	215	163	22 %	
B	1:10	+	533	366	52 %	676
		-	196	140	9 %	
C	1:50	+	355	263	45 %	508
		-	167	128	34 %	

Tabla 4. Primeras 10 filas de la tabla de resultados de MetExtract para la mezcla de extractos de metabolitos naturales: marcados en proporción 1:10. Cn = número de nitrógenos marcados.

Compuesto	Masa natural (m/z)	Masa marcado (m/z)	Cn	Carga	Polaridad	Inicio (min)	Fin (min)
1	156,13842	165,11205	9	1	Positiva	0,64	1,04
2	224,06322	225,06046	1	1	Positiva	0,70	1,10
3	185,11742	187,11192	2	1	Positiva	0,70	1,10
4	298,08191	299,07928	1	1	Positiva	0,70	1,10
5	372,10000	373,09798	1	1	Positiva	0,70	1,10
6	127,07540	129,06989	2	1	Positiva	0,76	1,16
7	129,09102	131,08558	2	1	Positiva	0,76	1,16
8	240,19575	244,18342	4	1	Positiva	0,76	1,16
9	282,27915	291,25294	9	1	Positiva	0,77	1,17
10	293,19580	296,18561	3	1	Positiva	0,78	1,18

A continuación, para obtener la lista de inclusión con el fin de fragmentar los valores de m/z seleccionados, se empleó un código en R, el cual toma la Tabla 4 y la procesa para generar dos listas individuales de valores de m/z (ionización positiva y negativa), las cuales pueden cargarse en el equipo, con lo que se evita escribir manualmente todos los compuestos que se desea fragmentar. Este código es propiedad del grupo de investigación de la Profesora Gunda Koellenspeger (Universidad de Viena) y no puede ser publicado en este documento. Por último, dado que la fragmentación depende de la intensidad de los iones y del número de compuestos coeluyendo, no todos los m/z de la lista de inclusión fueron fragmentados en la primera determinación. Se empleó un código en R para obtener la lista de los iones fragmentados de los archivos “.raw” generados y para eliminar los mismos de la lista de fragmentación inicial, con el fin de generar una segunda lista de inclusión para fragmentar iones que no hubieran sido fragmentados en la primera tanda. Este código es propiedad del grupo de investigación de la profesora Gunda Koellenspeger (Universidad de Viena) y no puede ser publicado en este documento. Finalmente, se comprobó que los compuestos de mayor intensidad de la Tabla 4 se habían fragmentado, por lo que no se generaron listas de inclusión adicionales. De los compuestos seleccionados por MetExtract, de 510 características en ionización positiva y 166 características en ionización negativa, 145 y 103 quedaron sin fragmentar, respectivamente.

En la Figura 3 se muestran los mismos cromatogramas de la Figura 2 en formato de mapa de calor, con la intensidad de los picos como referencia de color. En ellos se muestran los iones fragmentados como puntos sobre el cromatograma. Como se puede observar la mayoría de los analitos con elevada intensidad fueron fragmentados. Adicionalmente, se han señalado iones muy

abundantes no fragmentados (círculos en rojo). Esto se debe a que, a pesar de ser compuestos abundantes en la muestra de compuestos naturales, en la mezcla natural:marcado esos valores de m/z no fueron seleccionados por MetExtract como analitos con ^{15}N en su análogo marcado.

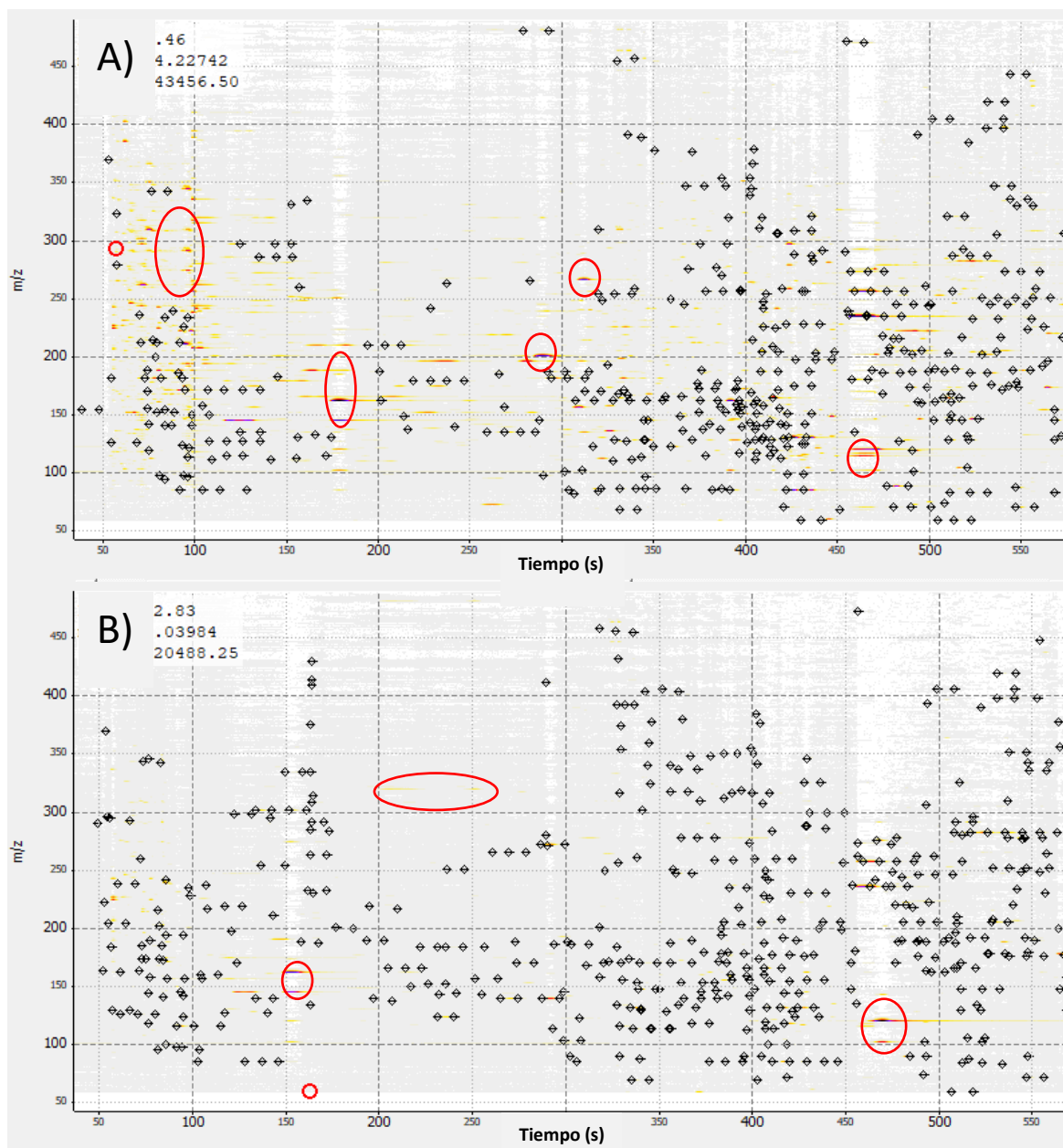


Figura 3. Cromatogramas en formato de calor: A) extracto de compuestos naturales y B) extracto de compuestos marcados.

IV. 4.3. Identificación de compuestos naturales con MSDIAL

Los resultados obtenidos para los extractos de metabolitos naturales empleando MSDIAL se encuentran en tablas que presentan un formato tubular: organizados en columnas y filas que representan variables y unidades de análisis, respectivamente. Las unidades de análisis son

compuestos químicos potencialmente identificados. Cada celda de la tabla contiene el valor de una determinada variable para un determinado compuesto. Dado que simultáneamente se realizaron medidas *full scan* y PRM, los resultados presentan información MS1 (m/z) e información MS2 para 428 iones fragmentados. MSDIAL genera una tabla con un elevado número de columnas (32), cada una de ellas con información distinta, la cual es demasiado grande como para incluirla en este documento. Por ello, se van a seleccionar y mostrar sólo aquellas columnas consideradas más relevantes. Para el tratamiento de datos son imprescindibles las columnas *Title*, *RT..min.*, *Precursor.*, *Formula*, *MS.MS.matched* y *MSMS.spectrum*. Estas columnas refieren, por orden, al nombre del compuesto identificado, el tiempo de retención que presenta en el cromatograma, su valor m/z exacto con 5 decimales, su fórmula molecular, un filtro de identificación de acuerdo con el espectro de fragmentación y el espectro de fragmentación. Adicionalmente, son importantes para la identificación y caracterización del analito el aducto obtenido, el valor de la relación señal:ruido, los comentarios sobre sus espectros de masas, la ontología asignada, el InChIKey, los SMILES y el valor de puntuación total (score), asignado de acuerdo a diferentes parámetros. Relacionado con esto último, cabe destacar que los compuestos naturales identificados no se han cribado por puntuación de similitud en el espectro de fragmentación, ya que se ha considerado suficiente la curación de los datos con la Interfaz Gráfica de Usuario de MSDIAL. Tampoco se ha empleado el filtro del tiempo de retención de la librería. De esta manera no se eliminan potenciales candidatos en una etapa temprana del tratamiento de datos. Así mismo, los compuestos no identificados se han eliminado de las tablas generadas.

Las tablas presentan compuestos con nivel de identificación 2, 3 y 4. Los primeros son aquellos compuestos cuya masa exacta y su espectro de fragmentación coinciden con el de una librería. En este caso, la coincidencia con la librería presenta un porcentaje de acierto o puntuación y suele requerir un estudio de los resultados para su confirmación³³. Las identificaciones nivel 3 y 4 son aquellas donde no se ha empleado una librería o, donde a pesar de haber empleado una librería no hay coincidencias con ningún compuesto de la librería. En ese caso se considera que pertenecen a nivel de identificación 3 aquellos compuestos que son anotados (fórmula molecular) y que, presentando espectro de fragmentación, se puede obtener la clase de compuesto y/o los grupos funcionales presentes. Por otro lado, los compuestos con nivel de identificación cuatro son aquellos en los que solamente se reporta la masa exacta, isótopos, aductos y el tiempo de retención. Estos compuestos, junto a los del nivel 5 (masa exacta), en caso de ser verdaderamente compuestos desconocidos, son los que forman parte de la denominada *materia oscura*¹². Finalmente, la librería puede tener registrado el espectro de una sustancia desconocida y, en ese caso, puede proporcionar información sobre la muestra donde se encontró esa sustancia previamente y las condiciones del experimento (columna *Comentarios*).

De los resultados obtenidos solo se presentan los compuestos identificados con nivel de confianza 2. Además, dado que se emplearon tres bases de datos diferentes, se obtuvo una tabla de resultados para cada una de ellas: “Fiehn”, “All public spectra” y “MassBank”. En estas tablas para cada tipo de ionización se encontraron duplicados (mismo compuesto a diferentes tiempos de retención). Esto puede deberse a una incorrecta asignación por la presencia de isómeros con espectros de fragmentación similares o por la presencia de especies que, siendo diferentes en la muestra, en la fuente de ionización se transforman en especies idénticas. Eliminando duplicidades, para ionización positiva se obtuvieron 96, 224 y 74 compuestos, y uniendo estas tablas se obtiene una tabla con 394 compuestos. Como es de esperar, algunos de los compuestos se encuentran en ambas tablas, por lo que eliminando los compuestos con el mismo nombre se obtienen 327 compuestos, de los cuales, 221 compuestos presentan una fórmula molecular única. En la Anexo I se presenta la Tabla anexa I donde están estos 221 compuestos con los nombres, la fórmula molecular, la ontología, el tiempo de retención, la relación masa-carga, el aducto determinado, la relación señal-ruido, la puntuación obtenida y un booleano “MS2.matched” que hace referencia a si su espectro de fragmentación ha sido comparado con uno en la librería. Esta simplificación de los resultados se ha realizado porque los datos son demasiado extensos como para incluirlos en su totalidad en este documento.

Como era de esperar, para una muestra de metabolitos intracelulares, la Tabla anexa I presenta una mayoría de compuestos de los principales ciclos metabólicos: ácidos carboxílicos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Adicionalmente, los compuestos de la Tabla anexa I deberían presentar en su mayoría átomos de nitrógeno, ya que presentan espectro de fragmentación porque han sido previamente seleccionados por MetExtract y es un requisito indispensable para ser candidatos para tener un análogo marcado. En la tabla encontramos un 87% de moléculas con átomos de nitrógeno (285). De acuerdo con MetExtract, para ionización positiva había un 52% de enriquecimiento isotópico, lo que se puede traducir en que un 52% de los valores m/z seleccionados estaban marcados (Tabla 3), con lo que los primeros indicios indican que ese porcentaje de compuestos seleccionados por MetExtract puede ser correcto. Este aspecto es importante en la curación de los datos en MSDIAL ya que, ante dos posibles fórmulas, una con nitrógeno y otra sin nitrógeno, la más probable es la que presenta nitrógeno, ya que está respaldada por los resultados de MetExtract. Esta es una de las principales ventajas del empleo de isótopos estables enriquecidos en metabolómica no dirigida, la mejora en la anotación²⁶.

Por otro lado, cabe resaltar que en las tablas también se encuentran compuestos orgánicos que, en principio, no forman parte de procesos biológicos, como son el compuesto “Levetiracetam” o el compuesto “(1s,5s)-1,5-dimetil-3,7-diazabicyclo [3.3.1]nonan-9-ona”. Ello se debe, probablemente, a una asignación errónea, donde la fragmentación y el ruido o la matriz pueden ser la causa. La presencia de estos compuestos se pueden minimizar en el procesado de datos

umentando el ratio señal:ruido en el cribado y la intensidad mínima de pico para la identificación o, instrumentalmente, modificando la energía de fragmentación. Aun así, la presencia de estos compuestos no pasa inadvertida y es preferible tratar los datos con unas condiciones menos selectivas para no perder información en un paso temprano del procesado de datos y eliminarlos al final del procedimiento si se consideran resultados incorrectos.

De los resultados obtenidos se concluye que la mayoría de los compuestos identificados con las librerías Fiehn y MassBank también estaban presentes en la librería “All public spectra”, lo cual no es de extrañar, ya que esa librería incluye (en teoría) los datos de las otras librerías. Sin embargo, es interesante analizar los datos con diferentes librerías, ya que los espectros que pueden presentar para un mismo analito no suelen ser idénticos, lo cual puede repercutir en una asignación de identidad diferente.

Otro parámetro importante en la identificación es el tiempo de retención, ya que en muchos casos los espectros de fragmentación y la masa exacta son iguales (isómeros). Por ello, se compararon los tiempos de retención de algunos analitos identificados con los obtenidos en una mezcla de patrones (sin matriz) y los reportados en la base de datos del UCDavis para la misma separación cromatográfica³¹. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos. Como se puede comprobar, los tiempos de retención son reproducibles y, al presentar un alto grado de coincidencia, se puede considerar que estos analitos han sido identificados con nivel de confianza 1. Adicionalmente, en el posterior tratamiento de datos, para aquellos analitos de los que no se disponga patrón se considerará como correcto el valor indicado por la base de datos del UCDavis.

Tabla 5. Tiempos de retención obtenidos para 25 compuestos en las muestras, tiempos de retención de sus patrones y tiempos de retención reportados por la base de datos de UCDAVIS.

Nombre	RT (min)	RT estándar (min)	RT Fiehn (min)
Nicotinamida	1,62	1,51	1,75
5'-Metiltioadenosina	2,03	2,23	2,52
Ácido nicotínico	3,94	3,74	4,01
Adenina	4,51	4,57	4,59
Adenosina	4,84	4,87	4,77
Colina	5,18	5,04	5,23
Citosina	5,75	5,76	5,77
Guanina	6,66	6,40	6,40
Triptófano	6,83	6,78	6,82
Guanosina	7,24	7,13	7,25
Isoleucina	7,10	7,13	7,18

Nombre	RT (min)	RT estándar (min)	RT Fiehn (min)
Guanosina	7,28	7,15	7,25
Tirosina	7,67	7,63	7,61
Alanina	8,04	8,04	8,05
Treonina	8,21	8,23	8,21
Ácido aminoadípico	8,42	8,39	-
Glutamina	8,54	8,56	8,52
Serina	8,61	8,62	8,65
Asparagina	8,68	8,70	8,65
5'-AMP	9,00	9,01	-
Histidina	9,49	9,42	9,41
Arginina	9,40	9,43	9,44
Lisina	9,49	9,52	9,54
L-Carnosina	9,29	9,54	9,54
Ornitina	9,55	9,58	9,60

Así mismo, en el siguiente procesado y análisis de datos se estudian en detalle las duplicidades y se describen pautas para establecer la verdadera identidad (o la identidad más probable) en el caso de que haya duplicidades.

IV. 4.4. Tratamiento de datos para la identificación de parejas de compuestos naturales y marcados

IV.4.4.1 Tratamiento de datos con comandos: Explicación del código desarrollado.

Para el tratamiento de datos se ha desarrollado un código en R, el cual se presenta en el Anexo II para los datos en ionización positiva (para ionización negativa es el mismo, simplemente habría que cargar los datos de ionización negativa). Este código se ha llevado a cabo siguiendo pautas de buenas prácticas de desarrollo de código (*Good coding practices*)³⁴, lo cual es importante para la reproducibilidad y consistencia de los resultados y para la revisión, el empleo y la mejora del código por parte de otros usuarios. Entre las indicaciones seguidas se encuentran las siguientes: Se ha procurado emplear el mínimo número de paquetes de datos y los que se han empleado o son generales o son de uso habitual en el tratamiento de datos de metabolómica. Así mismo, se han empleado expresiones sencillas, intuitivas, fáciles de leer y de entender. Por lo general, no se han agrupado operaciones ni llamadas a funciones en una misma línea. El tratamiento de datos ha seguido una pauta descrita por secciones y en cada sección se detallan las funciones empleadas.

Del mismo modo, las variables, funciones y tablas empleadas han sido creadas con nombres descriptivos. En general, el código es comentado constantemente, empleando frases completas y descriptivas. También se ha evitado escribir líneas de más de 72-79 caracteres para facilitar su lectura y mejorar la estructura y estética del código. Por último, con el fin de minimizar su extensión, el código ha sido revisado varias veces y se han eliminado duplicidades y funciones no estrictamente necesarias.

El código desarrollado se aplica a la obtención de parejas de compuestos naturales y marcados identificados con niveles de confianza 1 y 2. Los compuestos con nivel de identificación 1 son aquellos en los que se han comparado los tiempos de retención y la masa exacta de patrones con los resultados obtenidos para los extractos naturales. Los compuestos con nivel de identificación 2 son aquellos determinados según se ha comentado en la sección previa. En ambos casos, la identificación de los compuestos marcados está basada en la información obtenida de MetExtract: se han considerado como verdaderos los valores de m/z (pareados) de los compuestos naturales y marcados proporcionados por el software con sus tiempos de retención correspondientes.

El primer paso en el cribado de los datos es eliminar de la tabla de compuestos naturales identificados por MSDIAL aquellos compuestos que no tienen nitrógeno (paso 4 en el tratamiento de datos). En el siguiente paso (paso 6 del tratamiento de datos) se eliminan aquellos compuestos cuya identificación propuesta por MSDIAL presenta una fórmula con un valor de m/z que tiene un par marcado a un tiempo de retención concreto que no coincide con el propuesto por MetExtract. Esto se ejemplifica en la Figura 4. En ella se presenta en la tabla de compuestos identificados la timina y la melamina. Ambos compuestos presentan un valor de m/z de 127, pero presentan diferente número de nitrógenos, con lo que su análogo marcado presentará 129 y 133, respectivamente. Al comparar estos compuestos con la tabla de MetExtract observamos que en esta última no hay un par natural:marcado 127:133 y, por lo tanto, la melamina queda descartada como una posible especie marcada. Finalmente, estos candidatos eliminados pueden ser empleados para obtener una tabla de compuestos a re-identificar por MSDIAL o, pueden ser empleados para comprobar si durante la curación de los datos en MSDIAL había otras asignaciones (fórmulas) que generasen un m/z para su análogo marcado que sí coincide con los m/z asignados por MetExtract.

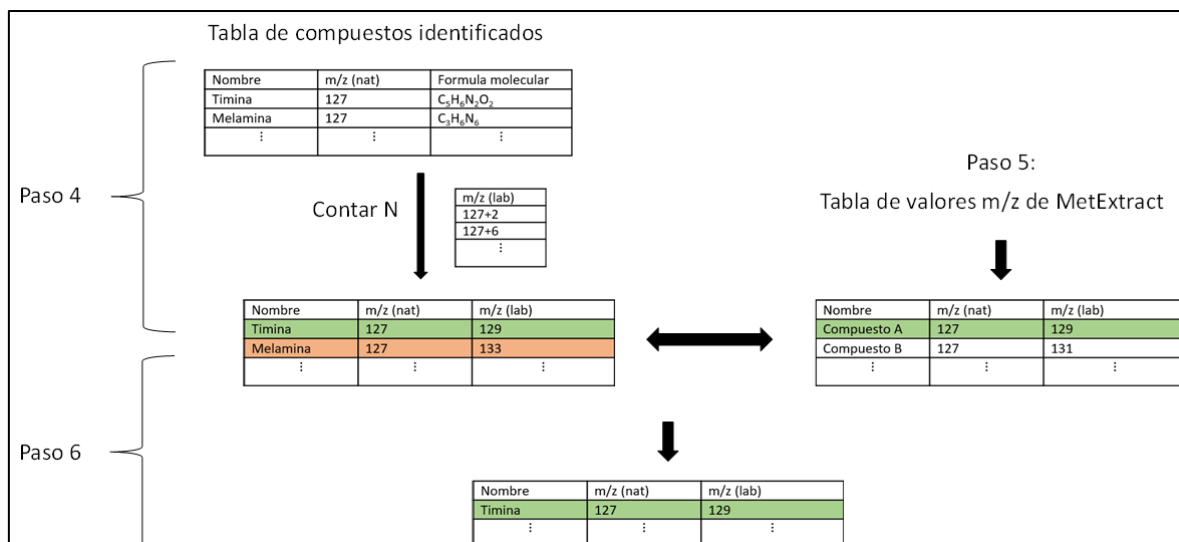


Figura 4. Tratamiento de datos. Pasos 4, 5 y 6.

El segundo paso consiste en comprobar si los tiempos de retención de los compuestos identificados coinciden con los reportados por MetExtract (paso 7 del tratamiento de datos). En la Figura 5 se presentan los tiempos de retención de leucina e isoleucina. Al comparar estos compuestos con la tabla de MetExtract observamos que para este último compuesto MetExtract no tiene un compuesto que presente valores compatibles. Por lo tanto, de acuerdo con MetExtract, ese compuesto identificado como isoleucina no tiene un análogo marcado. Del mismo modo que antes, los candidatos eliminados pueden ser reconsiderados en futuros experimentos.

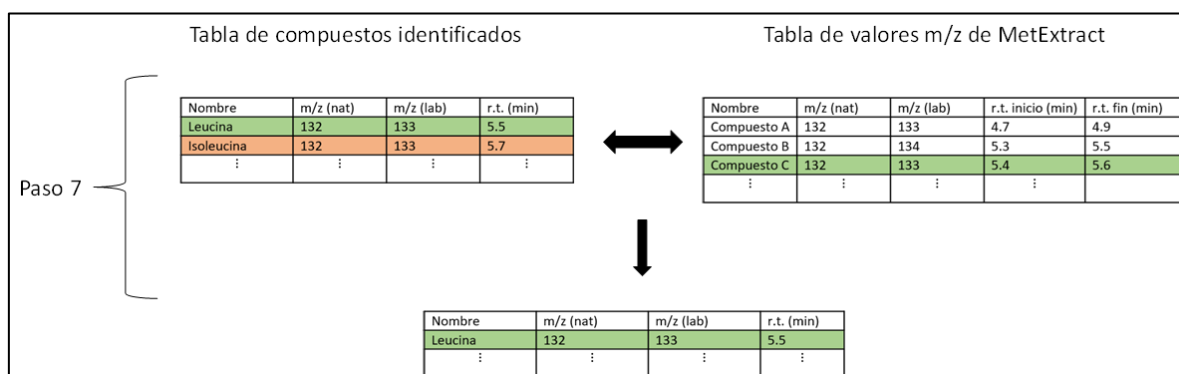


Figura 5. Tratamiento de datos. Paso 7.

El tercer paso se debe a que por las características del espectrómetro de masas no se fragmentaron el 100% de las m/z seleccionadas. Se debe comprobar en la tabla de compuestos marcados fragmentados si los sus valores de m/z están presentes en la tabla de compuestos identificados (paso 9 del tratamiento de datos). Esto se ejemplifica en la Figura 6 para los compuestos leucina y acetilornitina. Como se puede comprobar, para la leucina se encuentran dos espectros de fragmentación que cumplen los requisitos, mientras que la acetilornitina no presenta espectro de

fragmentación para su análogo marcado. Los compuestos identificados eliminados tendrían la consideración de compuestos identificados con nivel de confianza 4, al no disponer de espectro de fragmentación.

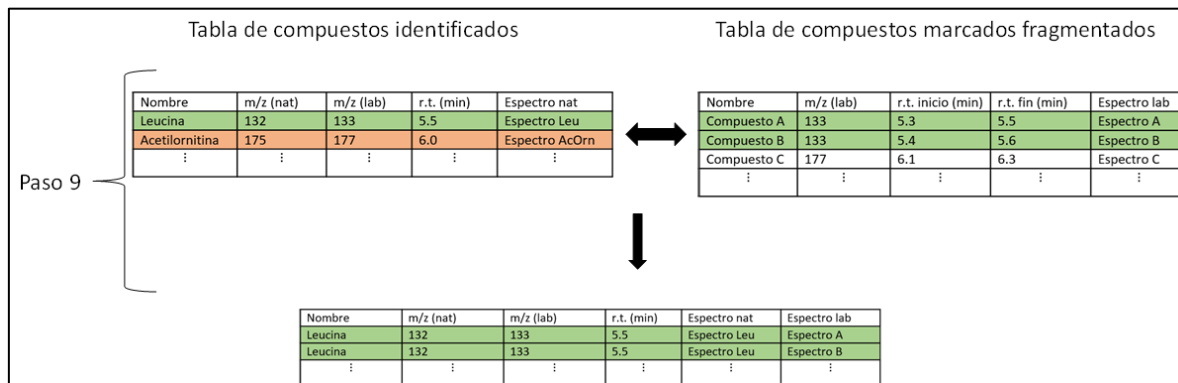


Figura 6. Tratamiento de datos. Paso 9.

El cuarto y último paso es la representación de los espectros de fragmentación para la asignación de correspondencia entre compuestos naturales y marcados. Dado que conceptualmente la asignación de espectros de masa enfrentados, realizada de forma individual y sin reglas de puntuación (*scoring*), es una metodología poco exacta, el código empleado genera un gráfico pobremente funcionalizado, sin comentarios, pero que permite una representación rápida e intuitiva para su inspección visual. Así, los gráficos desarrollados contienen en el eje de ordenadas positivo la intensidad relativa (%) de los picos del compuesto natural, en el eje de ordenadas negativo la intensidad relativa (%) de los picos del compuesto marcado y en el eje de abscisas los valores de m/z. Adicionalmente en el gráfico se incrusta una tabla descriptiva de los valores representados y el título del gráfico muestra el nombre del compuesto, su valor m/z (ion precursor, compuesto natural) y el número de átomos de N en la molécula. Aun así, para una adecuada asignación se requeriría una librería de espectros de fragmentación realizados en el mismo equipo y con las mismas condiciones (temperatura, energías de colisión, etc.). Otra alternativa sería obtener computacionalmente los árboles de fragmentación teóricos. Esto permitiría saber en qué clústeres se espera encontrar un desplazamiento de los picos de masa-carga, pero, por otro lado, computacionalmente no se tendrían en cuenta las diferencias en las intensidades relativas de los picos, pues dependen de las condiciones experimentales. Así mismo, cabe destacar que hay pocas librerías de compuestos marcados, las cuales no presentan un número de compuestos tan elevado como las librerías tradicionales, por lo que su asignación es, en cualquier caso, comprometida. Por último, cabe resaltar que esta etapa del código es mucho más demandante que el resto de las operaciones de código, pues requiere leer y procesar dos espectros de masa de alta resolución completos. La duración total del tratamiento de datos es de unos 30 segundos.

Un aspecto importante en la identificación es que la comparación de los espectros de fragmentación de los compuestos naturales y marcados permite discernir el compuesto más probable en el caso de compuestos duplicados. Este proceso se ejemplifica en la Figura 7 para la leucina, la cual presenta dos posibles espectros para su análogo marcado, con lo cual es necesario estudiar dos espectros para el mismo compuesto. La presencia de duplicidades se puede deber a: 1) una incorrecta asignación por la presencia de isómeros con espectros de fragmentación similares, 2) la presencia de especies que, siendo diferentes en la muestra, en la fuente de ionización se transforman en especies idénticas, 3) la presencia de diferentes identificaciones por el empleo de diferentes librerías, y 4) la presencia de diferentes espectros de fragmentación que cumplen las condiciones para ser espectros de fragmentación del compuesto marcado. Esto último se debe a que los compuestos naturales y marcados se fragmentaron en inyecciones de muestras diferentes, por separado, de tal forma que la matriz de una muestra y otra es diferente y, dado que la separación cromatográfica emplea un método estándar de metabolómica, donde la separación cromatográfica de los analitos es secundaria, se obtuvieron tiempos de retención diferentes para los analitos en los dos tipos de muestras, como se observa en la Figura 2. Dado que MetExtract incluye un rango de tiempos de retención, se emplea ese rango para asignar empíricamente las parejas natural-marcado. Sin embargo, el hecho de que haya un rango hace que pueda haber varios espectros de fragmentación para una misma relación masa-carga, explicándose así la existencia de duplicidades por espectros de fragmentación, las cuales se generan en el paso 9 del procedimiento de tratamiento de datos.

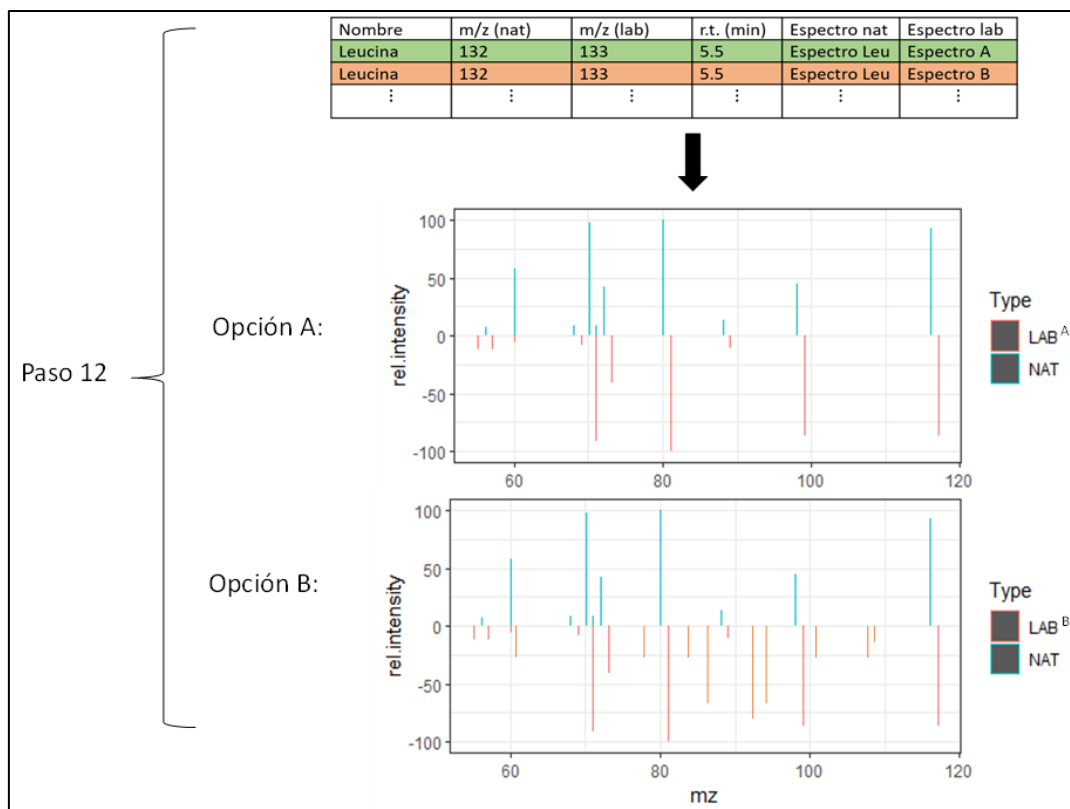


Figura 7. Tratamiento de datos. Paso 12: Comparación de espectros duplicados.

Adicionalmente, además de estas consideraciones, también se ha empleado la masa exacta en la identificación por parte de MSDIAL y MetExtract, pero no en el cribado de los resultados, donde lo que se pretende es ver, sin restricción a errores en la masa exacta, si un m/z o una pareja de m/z natural-marcado se corresponde o no entre una tabla y otra. Así mismo, se ha empleado el paquete enviPat para obtener la masa exacta teórica (con cinco decimales) para cada compuesto, de acuerdo con la identificación y la fórmula molecular, con el fin de obtener el error en masa de cada compuesto.

IV. 4.4.1. Resultados del tratamiento de datos con comandos

Se obtuvieron un total de 73 parejas de compuestos naturales y marcados pareados identificados con un elevado nivel de confianza, de acuerdo con sus masas exactas, sus espectros de fragmentación, la coincidencia con librerías de espectros y un análisis-diagnóstico de los espectros. En ionización positiva se identificaron 57 compuestos, en ionización negativa 7 y en ambos tipos de ionización fueron identificados 9 compuestos. En la Tabla 6 se presentan 35 compuestos naturales con parámetros identificativos como el nombre, la fórmula molecular, el tiempo de retención, la masa exacta, el aducto (ionización), su ontología y el InChIKey. De estos 35 compuestos, cinco presentan una identidad poco probable, al tratarse de compuestos orgánicos con peso molecular menor a 200 Da y diversos grupos funcionales. Entre ellos están el ácido 2-(4-aminotetrahydro-2H-piran-4-il)acético, el 2-metil-4-(piridin-2-il)but-3-in-2-ol y la 2-(5-

metoxi-1H-indol-3-il)etanamina, cuyos espectros de fragmentación natural y marcado enfrentados se presentan en la Figura 8. Dado que 1) la mayoría de las librerías de espectros de masa cubren principalmente compuestos naturales en lugar de compuestos orgánicos sintéticos y que 2) la identificación de compuestos orgánicos con un elevado número de sustituyentes es muy compleja, podemos considerar que la identidad de esos tres compuestos es errónea, a pesar de haber sido asignada por una librería y cumplir los demás requisitos de la estrategia de identificación desarrollada.

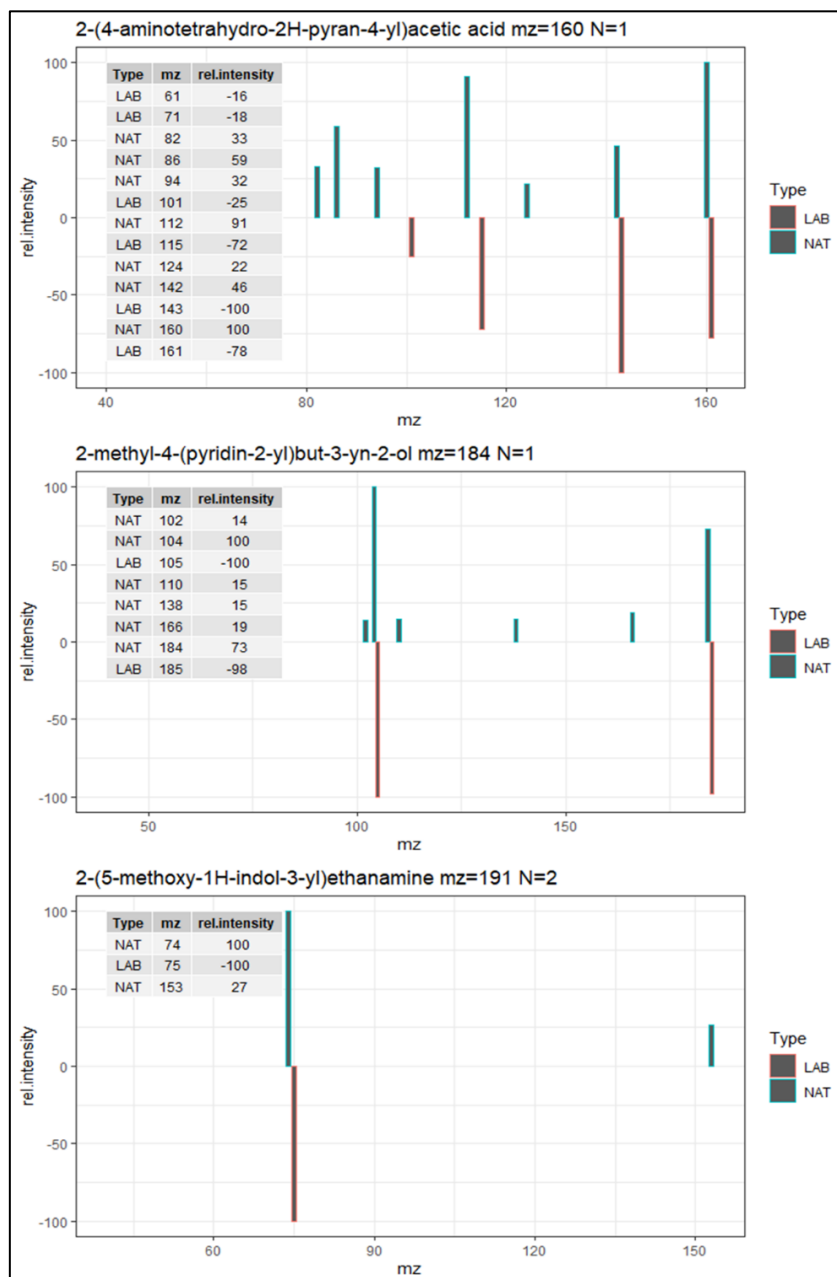


Figura 8. Espectros de fragmentación natural y marcado de compuestos típicamente sintéticos: ácido 2-(4-aminotetrahydro-2H-piran-4-il)acético, 2-metil-4-(piridin-2-il)but-3-in-2-ol y 2-(5-metoxi-1H-indol-3-il)etanamina, detectados en ionización positiva.

Tabla 6. Identidad de compuestos naturales identificados con nivel de confianza 2 que presentan un análogo marcado.

Nombre	Fórmula	Aducto	RT (min)	Precursor (m/z)	Ontología	InChIKey
(-)-Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	[M+H] ⁺	6,19	377,1457	Flavinas	AUNGANRZJHBGPY- -SCRDCRAPSA-N
Ácido (2R)-6-metilpiperidina-2-carboxílico	C ₇ H ₁₃ NO ₂	[M+Na] ⁺	6,70	166,0725	L-alfa-aminoácidos	IHLDCUQUFBWSJU- PRJDIBJQSA-N
Ácido 2-(4-aminotetrahydro-2H-pirano-4-il) acético	C ₇ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	6,78	160,0969	Pyranoid amino acids and derivatives	QRIAWCUEIMQLGG- -UHFFFAOYSA-N
2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl) ethanamine	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	[M+H] ⁺	8,37	191,1163	Tryptamines and derivatives	JTEJPPKMYBDEMY- UHFFFAOYSA-N
2-(methyl(2H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl) amino)ethanol	C ₈ H ₁₁ N ₅ O	[M+H] ⁺	2,02	194,1041	Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines	MRRQSPRCJKZSOG- UHFFFAOYSA-N
2-Amino adipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	[M-H] ⁻	7,48	160,0616	L-alpha-amino acids	OYIFNHXCXNCRBQI- BYPYZUCNSA-N
2-methyl-4-(pyridin-2-yl) but-3-yn-2-ol	C ₁₀ H ₁₁ NO	[M+Na] ⁺	4,31	184,0636	Pyridines and derivatives	YBUWIVMOMHEAL- F-UHFFFAOYSA-N
2-Methylindole	C ₉ H ₉ N	[M+H] ⁺	6,83	132,0808	Indoles	BHNHHSOHWZKFO- X-UHFFFAOYSA-N
2-Phenylacetamide	C ₈ H ₉ NO	[M+H] ⁺	7,67	136,0756	Phenylacetamides	LSBDFXRZDJMBSC- UHFFFAOYSA-N
2-Piperidone	C ₅ H ₉ NO	[M+H] ⁺	7,06	100,0757	Piperidinones	XUWHAWMETYGR- KB-UHFFFAOYSA-N
3-Methyladenine	C ₆ H ₇ N ₅	[M+H] ⁺	6,11	150,0775	6-aminopurines	FSASIHFSFGAIJM- UHFFFAOYSA-N
3-ureidopropionate	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	5,54	133,0609	Ureas	JSJWCHRYRHKBBW- -UHFFFAOYSA-N
4-Methyl-5-thiazoleethanol	C ₆ H ₉ NOS	[M+H] ⁺	6,72	144,0478	4,5-disubstituted thiazoles	BKAWJIRCKVUVED- -UHFFFAOYSA-N
4-ureidobutanoic acid	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	8,53	169,0583	Gamma amino acids and derivatives	QYTWIMMLQKHPG- L-UHFFFAOYSA-N
5-Methylcytosine	C ₅ H ₇ N ₃ O	[M+H] ⁺	5,83	126,0665	Hydroxypyrimidines	LRASMSXMSNRBT- -UHFFFAOYSA-N
Acetylcholine	C ₇ H ₁₆ NO ₂	[M] ⁺	4,77	146,1176	Acyl cholines	OIPILFWXSMYKGL- UHFFFAOYSA-N
Desoxypeganine	C ₁₁ H ₁₂ N ₂	[M+H] ⁺	1,61	173,1172	Quinazolines	WUFQLZTXIWKION- UHFFFAOYSA-N

CAPÍTULO 4

Nombre	Fórmula	Aducto	RT (min)	Precursor (m/z)	Ontología	InChIKey
Gentiannine	C ₁₀ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	7,12	176,0656	Pyranopyridines	DFNZYFAJQPLJFI-UHFFFAOYSA-N
haplamine	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	7,97	258,1083	Pyranoquinolines	IXRKDGGGFFCRIR-UHFFFAOYSA-N
Hypoxanthine	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	4,86	137,0460	Hypoxanthines	FDGQSTZJBFJUBT-UHFFFAOYSA-N
Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	6,29	190,0500	Quinoline carboxylic acids	HCZHHEIFKROPDY-UHFFFAOYSA-N
L-beta-Homothreonine	C ₅ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	7,69	132,0665	Beta amino acids and derivatives	NIVRJEVWVLMOZNV-QWWZWVQMSA-N
L-Pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	5,66	130,0977	Alpha amino acids	HXEACLLIILLPRG-YFKPBYRVSA-N
L-Pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	9,49	130,0865	Alpha amino acids	HXEACLLIILLPRG-YFKPBYRVSA-N
Leucylproline	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	7,08	229,1546	Dipeptides	VTJUNIYRYIAIHF-UHFFFAOYNA-N
N-alpha-Acetyl-L-Ornithine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	8,19	175,1076	N-acyl-L-alpha-amino acids	JRLGPAXAGHMNOL-LURJTMIESA-N
N-Methylcytosine	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	[M+Na] ⁺	1,57	227,1024	Cytisine and derivatives	CULUKMPMGVXCEI-VHSXEESVSA-N
N ² ,N ² -Dimethylguanosine	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	6,81	312,1299	Purine nucleosides	RSPURTUNRHNVGFI-UHFFFAOYNA-N
PIPERIDINE	C ₅ H ₁₁ N	[M+H] ⁺	7,10	86,0965	Piperidines	NQRYJNQNLNOLGT-UHFFFAOYSA-N
Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	2,12	116,0707	L-alpha-amino acids	ONIBWKKTOPOVIA-SCSAIBSYSAN
Pyrrolidine	C ₄ H ₉ N	[M+H] ⁺	7,02	72,0809	Pyrrolidines	RWRDLPLDKQPQOW-UHFFFAOYSA-N
Pyrrolidine	C ₄ H ₉ N	[M+H] ⁺	9,15	72,0809	Pyrrolidines	RWRDLPLDKQPQOW-UHFFFAOYSA-N
Salsolinol	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	6,60	180,1022	Tetrahydroisoquinolines	IBRKLUSXDYATLGI-UHFFFAOYNA-N
SDMA	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	8,82	203,1509	Arginine and derivatives	HVPFXCBJHIJGS-UHFFFAOYNA-N
Serylleucine	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	7,98	219,1340	Dipeptides	NFDYGNFETJVMSE-UHFFFAOYNA-N
sn-Glycero-3-phosphocholine	C ₈ H ₂₁ NO ₆ P	[M] ⁺	8,55	258,1093	Glycerophosphocholines	SUHOQUVVVLNYQR-MRVPVSSYSAN
Vincanidine	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	9,75	309,1658	Strychnos alkaloids	JDOFCMASVRMYJUI-JYTRXFNOSAN

Por otro lado, en la Tabla 7 se presentan de forma análoga los 39 compuestos naturales restantes que, al presentar un patrón con el mismo tiempo de retención o, alternativamente, el mismo tiempo de retención del patrón en la base de datos del UC Davis, se consideran identificados con un nivel de confianza 1. Así mismo, la Tabla 8 presenta los tiempos de retención y los valores de m/z obtenidos para los compuestos de la Tabla 7 y para sus análogos marcados, junto a los valores de tiempo de retención de los patrones y la masa exacta teórica de esos compuestos calculada con el paquete EnviPat³⁵. Como se puede comprobar, los errores en masa son inferiores a 1 ppm en la mayoría de los casos y, en general, los tiempos de retención presentan una variación en torno 0,05 minutos, salvo en algunos casos donde se observan variaciones en torno a 0,2 minutos. Como se ha comentado previamente, esto es debido a las diferentes matrices de las muestras de analitos naturales y marcados.

Tabla 7. Identidad de compuestos naturales identificados con nivel de confianza 1 que presentan un análogo marcado.

RT coincide	Nombre	Fórmula	Aducto	Ontología	InChIKey
Fiehn Library	2'-O-Methyl uridine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	Pyrimidine nucleosides	SXUXMRMBWZCMEN-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	3-Methyl cytidine	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	Pyrimidine nucleosides	RDPUKVRQKWBSPK-UHFFFAOYNA-N
Standard	5'-AMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	[M+H] ⁺	Nucleotides	UDMBCSSLTHHNCDC-QYNXXCUSA-N
Standard	5'-Methyl thioadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	[M+H] ⁺	5'-deoxy-5'-thionucleosides	WUUGFSXJNOTRMR-IOSLPCCCSA-N
Standard	Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	[M+H] ⁺	6-aminopurines	GFFGJBXGBJISGV-UHFFFAOYSA-N
Standard	Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	[M-H] ⁻	6-aminopurines	GFFGJBXGBJISGV-UHFFFAOYSA-N
Standard	Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	Purine nucleosides	OIRDTQYFTABQQQ-KQYNXXCUSA-N
Fiehn Library	Ala-Ala	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	Dipeptides	DEFJQIDDEAULHB-UHFFFAOYNA-N
Standard	Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	Alanine and derivatives	QNAYBMKLOCPYGI-UHFFFAOYNA-N
Standard	Amino adipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	[M+H] ⁺	L-alpha-amino acids	OYIFNHCXNCRBQI-SCSAIBSYSA-N
Standard	Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+Na] ⁺	L-alpha-amino acids	ODKSFYDXXFIFQNBYPYZUCNSA-N
Standard	Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M-H] ⁻	L-alpha-amino acids	ODKSFYDXXFIFQNBYPYZUCNSA-N
Standard	Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	Asparagine and derivatives	DCXYFEDJOCDFNAF-UHFFFAOYNA-N

CAPÍTULO 4

RT coincide	Nombre	Fórmula	Aducto	Ontología	InChIKey
Standard	Carnosine	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	Hybrid peptides	CQOVNPNJLQNMDC-ZETCQYMHSA-N
Standard	Choline	C ₅ H ₁₄ NO	[M] ⁺	Cholines	OEYIOHPDSNJKLS-UHFFFAOYSA-N
Standard	Cytosine	C ₄ H ₅ N ₃ O	[M+H] ⁺	Pyrimidones	OPTASPLRGRRNAP-UHFFFAOYSA-N
Standard	Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	Alpha amino acids	ZDXPYRJPNDTMRX-UHFFFAOYNA-N
Standard	Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	D-alpha-amino acids	ZDXPYRJPNDTMRX-GSVOUGTGSA-N
Fiehn Library	Gly-Val	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	Dipeptides	STKYPAFSDFAEPH-UHFFFAOYNA-N
Standard	Guanine	C ₅ H ₅ N ₅ O	[M+H] ⁺	Purines and purine derivatives	UYTPUPDQBNUYGX-UHFFFAOYSA-N
Standard	Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	Purine nucleosides	NYHBQMYGNKIUIF-UHFFFAOYNA-N
Standard	Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻	Purine nucleosides	NYHBQMYGNKIUIF-UHFFFAOYSA-N
Fiehn Library	Hexamethylene bisacetamide	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	Carboximidic acids	BNQSTAOJRULKXN-UHFFFAOYSA-N
Standard	Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	Histidine and derivatives	HNDVDQJGIGZPNO-YFKPBVRVSA-N
Standard	Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	Isoleucine and derivatives	AGPKZVBTJJNPAG-UHFFFAOYNA-N
Standard	Norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M-H] ⁻	L-alpha-amino acids	LRQKBLKVPFOOQJ-UHFFFAOYNA-N
Standard	Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	D-alpha-amino acids	KDXKERNBIBXSRK-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	[M+H] ⁺	Alpha amino acids	QEFRNWWLZKMPFJ-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	[M-H] ⁻	Alpha amino acids	QEFRNWWLZKMPFJ-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	Muramic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₇	[M+H] ⁺	Sugar acids and derivatives	MSFSPUZXLOGKHJ-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	N1-Methyl guanosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	Purine nucleosides	SLEHROROQDYRAW-UHFFFAOYNA-N
Standard	Nicotinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	Nicotinamides	DFPAKSUCGFBDDF-UHFFFAOYSA-N
Standard	Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	[M+H] ⁺	Pyridinecarboxylic acids	TWBYWOBDOCUKOW-UHFFFAOYSA-N
Standard	Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	[M-H] ⁻	Pyridinecarboxylic acids	PVNIIMVLHYAWGP-UHFFFAOYSA-N

CAPÍTULO 4

RT coincide	Nombre	Fórmula	Aducto	Ontología	InChIKey
Standard	Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	Alpha amino acids	AHLPHDHHMVZTML-UHFFFAOYSA-N
Fiehn Library	Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	Amino acids	ODHCTXKNWHHXJC-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻	Alpha amino acids and derivatives	ODHCTXKNWHHXJC-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	Amino acids	WHUUTDBJXRKMK-VKHMHEASA-N
Fiehn Library	S-(5'-adenosyl)-L-homocysteine	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	[M+H] ⁺	5'-deoxy-5'-thionucleosides	ZJUKTBDSGOFHSH-UHFFFAOYSA-N
Standard	Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	Serine and derivatives	MTCFGRXMJLQNBG-UHFFFAOYSA-N
Fiehn Library	Targinine	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	Arginine and derivatives	NTNWOCRCBQPEKQ-UHFFFAOYNA-N
Standard	Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	[M-H] ⁻	L-alpha-amino acids	AYFVYJQAPQTCCC-UHFFFAOYNA-N
Standard	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	Amino acids	QIVBCDIJAJPQS-UHFFFAOYNA-N
Standard	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	Indolyl carboxylic acids and derivatives	QIVBCDIJAJPQS-UHFFFAOYNA-N
Standard	Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	Tyrosine and derivatives	OUYCCASQSFEME-UHFFFAOYNA-N
Fiehn Library	Urocanic acid	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	Imidazolyl carboxylic acids and derivatives	LOIYMIARKYCTBW-UHFFFAOYSA-N
Fiehn Library	Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	Pyrimidones	ISAKRJDGNUQOIC-UHFFFAOYSA-N

ANEXO I

Tabla 8. Parejas de compuestos identificados naturales y marcados con nivel de confianza 1: Comparación de tiempo de retención y masa exacta del ion precursor con sus valores teóricos.

Nombre	Fórmula	Polaridad	RT (min)	RT St (min)	Precursor (m/z)	EnviPat (m/z)	Error m/z (ppm)
2'-O-Methyl uridine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆	-	2,45	2,24	257,0779	257,0774	0,5
2'-O-Methy luridine	C ₁₀ H ₁₄ ¹⁵ N ₂ O ₆	-	2,37	-	259,0718	259,0714	0,4
3-Methyl cytidine	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅	+	7,19	6,99	258,1081	258,1090	0,9
3-Methyl cytidine	C ₁₀ H ₁₅ ¹⁵ N ₃ O ₅	+	7,03	-	261,0999	261,1001	0,2
5'-AMP	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	+	9,00	9,01	348,0694	348,0709	1,5
5'-AMP	C ₁₀ H ₁₄ ¹⁵ N ₅ O ₇ P	+	9,01	-	353,0548	353,0561	1,3
5'-Methyl thioadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	+	2,03	2,23	298,0961	298,0974	1,3
5'-Methyl thioadenosine	C ₁₁ H ₁₅ ¹⁵ N ₅ O ₃ S	+	2,28	-	303,0824	303,0826	0,2
Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	+	4,51	4,57	136,0620	136,0623	0,3
Adenine	C ₅ H ₅ ¹⁵ N ₅	+	4,53	-	141,0468	141,0475	0,7
Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	-	4,56	4,57	134,0471	134,0467	0,4
Adenine	C ₅ H ₅ ¹⁵ N ₅	-	4,53	-	139,0321	139,0318	0,3
Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	+	4,84	4,87	268,1037	268,1046	0,9
Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₄	+	4,86	-	273,0885	273,0898	1,3
Ala-Ala	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	-	8,28	8,33	159,0775	159,0770	0,5
Ala-Ala	C ₆ H ₁₂ ¹⁵ N ₂ O ₃	-	8,28	-	161,0713	161,0710	0,3
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	+	8,04	8,04	90,0550	90,0555	0,5
Alanine	C ₃ H ₇ ¹⁵ NO ₂	+	8,04	-	91,0521	91,0525	0,5
Aminoadipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	+	8,42	8,39	162,0763	162,0766	0,3
Aminoadipic acid	C ₆ H ₁₁ ¹⁵ NO ₄	+	8,40	-	163,0732	163,0737	0,5
Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	-	9,41	9,44	173,1043	173,1039	0,4
Arginine	C ₆ H ₁₄ ¹⁵ N ₄ O ₂	-	9,41	-	177,0927	177,0920	0,7
Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	+	8,68	8,70	133,0608	133,0613	0,5
Asparagine	C ₄ H ₈ ¹⁵ N ₂ O ₃	+	8,68	-	135,0550	135,0554	0,4
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	+	5,18	5,04	104,1071	104,1075	0,4
Choline	C ₅ H ₁₄ ¹⁵ NO	+	5,03	-	105,1041	105,1046	0,5
Cytosine	C ₄ H ₅ N ₃ O	+	5,75	5,76	112,0504	112,0511	0,7

CAPÍTULO 4

Nombre	Fórmula	Polaridad	RT (min)	RT St (min)	Precursor (m/z)	EnviPat (m/z)	Error m/z (ppm)
Cytosine	C ₄ H ₅ ¹⁵ N ₃ O	+	5,76	-	115,0415	115,0422	0,7
Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	+	8,54	8,56	147,0766	147,0770	0,4
Glutamine	C ₅ H ₁₀ ¹⁵ N ₂ O ₃	+	8,55	-	149,0705	149,0710	0,5
Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	-	8,54	8,56	145,0619	145,0613	0,6
Glutamine	C ₅ H ₁₀ ¹⁵ N ₂ O ₃	-	8,54	-	147,0559	147,0554	0,5
Gly-Val	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	-	7,87	7,94	173,0933	173,0926	0,7
Gly-Val	C ₇ H ₁₄ ¹⁵ N ₂ O ₃	-	7,86	-	175,0871	175,0867	0,4
Guanine	C ₅ H ₅ N ₅ O	+	6,66	6,40	152,0569	152,0572	0,3
Guanine	C ₅ H ₅ ¹⁵ N ₅ O	+	6,66	-	157,0418	157,0424	0,6
Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	+	7,28	7,15	284,0989	284,0995	0,6
Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₅	+	7,16	-	289,0836	289,0847	1,1
Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	-	7,24	7,13	282,0841	282,0838	0,3
Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ ¹⁵ N ₅ O ₅	-	7,15	-	287,0690	287,0690	0
Hexamethylene bisacetamide	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₂	+	1,31	1,50	201,1598	201,1603	0,5
Hexamethylene bisacetamide	C ₁₀ H ₂₀ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	1,37	-	203,1540	203,1544	0,4
Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	+	9,49	9,42	156,0769	156,0773	0,4
Histidine	C ₆ H ₉ ¹⁵ N ₃ O ₂	+	9,48	-	159,0678	159,0684	0,6
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	+	7,10	7,13	132,1020	132,1025	0,5
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ ¹⁵ NO ₂	+	7,13	-	133,0991	133,0995	0,4
Norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-	7,14	7,13	130,0874	130,0868	0,6
Norleucine	C ₆ H ₁₃ ¹⁵ NO ₂	-	6,94	-	131,0842	131,0838	0,4
L-(+)-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	+	9,40	9,43	197,1009	197,1014	0,5
L-(+)-Arginine	C ₆ H ₁₄ ¹⁵ N ₄ O ₂	+	9,41	-	201,0893	201,0896	0,3
L-Carnosine	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	+	9,29	9,54	227,1136	227,1144	0,8
L-Carnosine	C ₉ H ₁₄ ¹⁵ N ₄ O ₃	+	9,29	-	231,1019	231,1026	0,7
Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	+	9,49	9,52	147,1129	147,1134	0,5
Lysine	C ₆ H ₁₄ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	9,50	-	149,1071	149,1074	0,3
Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	+	8,61	8,60	166,0535	166,0538	0,3
Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ ¹⁵ NO ₃ S	+	8,50	-	167,0504	167,0508	0,4
Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	-	8,50	8,61	164,0388	164,0381	0,7

CAPÍTULO 4

Nombre	Fórmula	Polaridad	RT (min)	RT St (min)	Precursor (m/z)	EnviPat (m/z)	Error m/z (ppm)
Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ ¹⁵ N ₃ O ₃ S	-	8,50	-	165,0356	165,0352	0,4
Muramic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₇	+	8,80	8,28	252,1079	252,1083	0,4
Muramic acid	C ₉ H ₁₇ ¹⁵ N ₃ O ₇	+	8,81	-	253,1046	253,1054	0,8
N1-Methyl guanosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅	+	5,71	5,65	298,1144	298,1151	0,7
N1-Methyl guanosine	C ₁₁ H ₁₅ ¹⁵ N ₅ O ₅	+	5,71	-	303,0994	303,1003	0,9
Nicotinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	+	1,62	1,51	123,0552	123,0558	0,6
Nicotinamide	C ₆ H ₆ ¹⁵ N ₂ O	+	1,59	-	125,0495	125,0499	0,4
Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	+	3,94	3,75	124,0395	124,0399	0,4
Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ ¹⁵ N ₃ O ₂	+	3,94	-	125,0364	125,0369	0,5
Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	-	3,94	3,74	122,0246	122,0242	0,4
Isonicotinic acid	C ₆ H ₅ ¹⁵ N ₃ O ₂	-	3,95	-	123,0218	123,0212	0,6
Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	+	9,55	9,58	133,0970	133,0977	0,7
Ornithine	C ₅ H ₁₂ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	9,55	-	135,0912	135,0918	0,6
Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	-	7,69	8,54	128,0353	128,0348	0,5
Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ ¹⁵ N ₃ O ₃	-	7,66	-	129,0322	129,0318	0,4
Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	+	8,54	8,54	130,0499	130,0504	0,5
Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ ¹⁵ N ₃ O ₃	+	8,55	-	131,0468	131,0475	0,7
S-(5'-adenosyl)-L- homocysteine	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	+	8,72	8,70	385,1296	385,1294	0,2
S-(5'-adenosyl)-L- homocysteine	C ₁₄ H ₂₀ ¹⁵ N ₆ O ₅ S	+	8,72	-	391,1284	391,1282	0,2
Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	+	8,61	8,62	106,0501	106,0504	0,3
Serine	C ₃ H ₇ ¹⁵ N ₃ O ₃	+	8,61	-	107,0469	107,0475	0,6
Targinine	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	+	9,11	9,10	189,1350	189,1352	0,2
Targinine	C ₇ H ₁₆ ¹⁵ N ₄ O ₂	+	9,12	-	193,1227	193,1233	0,6
Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	-	8,21	8,23	118,0510	118,0504	0,6
Threonine	C ₄ H ₉ ¹⁵ N ₃ O ₃	-	8,21	-	119,0480	119,0475	0,5
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	+	6,83	6,78	205,0975	205,0977	0,2
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	6,78	-	207,0915	207,0918	0,3
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-	6,85	6,78	203,0825	203,0821	0,4

Nombre	Fórmula	Polaridad	RT (min)	RT St (min)	Precursor (m/z)	EnviPat (m/z)	Error m/z (ppm)
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ ¹⁵ N ₂ O ₂	-	6,77	-	205,0768	205,0761	0,7
Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	+	7,67	7,63	182,0815	182,0817	0,2
Tyrosine	C ₉ H ₁₁ ¹⁵ NO ₃	+	7,63	-	183,0780	183,0788	0,8
Urocanic acid	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	+	3,65	3,65	139,0505	139,0508	0,3
Urocanic acid	C ₆ H ₆ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	3,31	-	141,0445	141,0448	0,3
Uracil (uridina)	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	+	4,89	4,72 (uridina)	113,0345	113,0348	0,3
Uracil (uridina)	C ₄ H ₄ ¹⁵ N ₂ O ₂	+	4.82	-	115,0285	115,0289	0,4

En la Figura 9 se muestran los espectros de fragmentación enfrentados para dos aminoácidos y una base nitrogenada: prolina, histidina y citosina. Como se puede observar, estos presentan un elevado grado de coincidencia, con lo que se concluye que se trata de esos compuestos. Así mismo, en la Figura 10 se presentan los espectros de fragmentación enfrentados para triptófano, ácido glutámico y arginina, tres aminoácidos encontrados tanto en ionización positiva como en negativa. En este caso, se observa que el triptófano y la arginina difieren entre ionización positiva y negativa. Esto puede deberse a las propias características de la detección, así como la diferente formación de especies iónicas. Tal y como se muestra en la Tabla 7, la arginina es detectada en ionización positiva como un aducto de sodio, mientras que en ionización negativa se trata de un aducto de hidrógeno, por lo que los valores de m/z de la Figura 10 en las dos polaridades no coinciden.

Por otro lado, en la Figura 11 se muestran los espectros de fragmentación enfrentados para glutamina, ácido 2-aminoadípico y niacina, detectados en ionización negativa. Como se puede observar, estos compuestos no presentan un elevado grado de similitud. Sin embargo, al tratarse de un aminoácido, un derivado de aminoácido y una vitamina, se considera que la probabilidad de que verdaderamente se trate de esos compuestos es alta. Así mismo, la glutamina también fue detectada en ionización positiva y el tiempo de retención coincidía con el de su patrón, por lo que su identificación tiene un nivel de confianza 1.

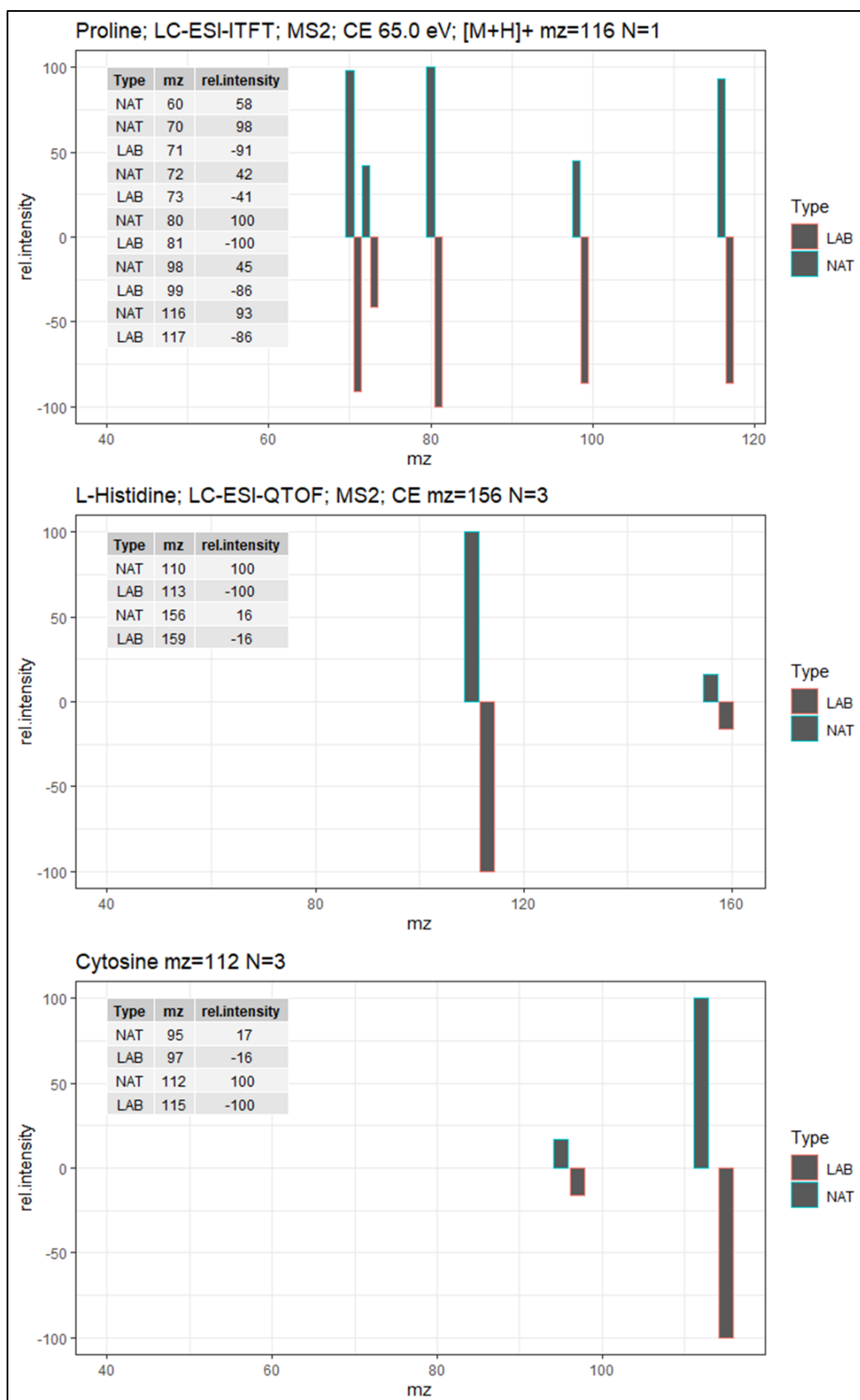


Figura 9. Espectros de fragmentación enfrentados para prolina, histidina y citosina en ionización positiva.

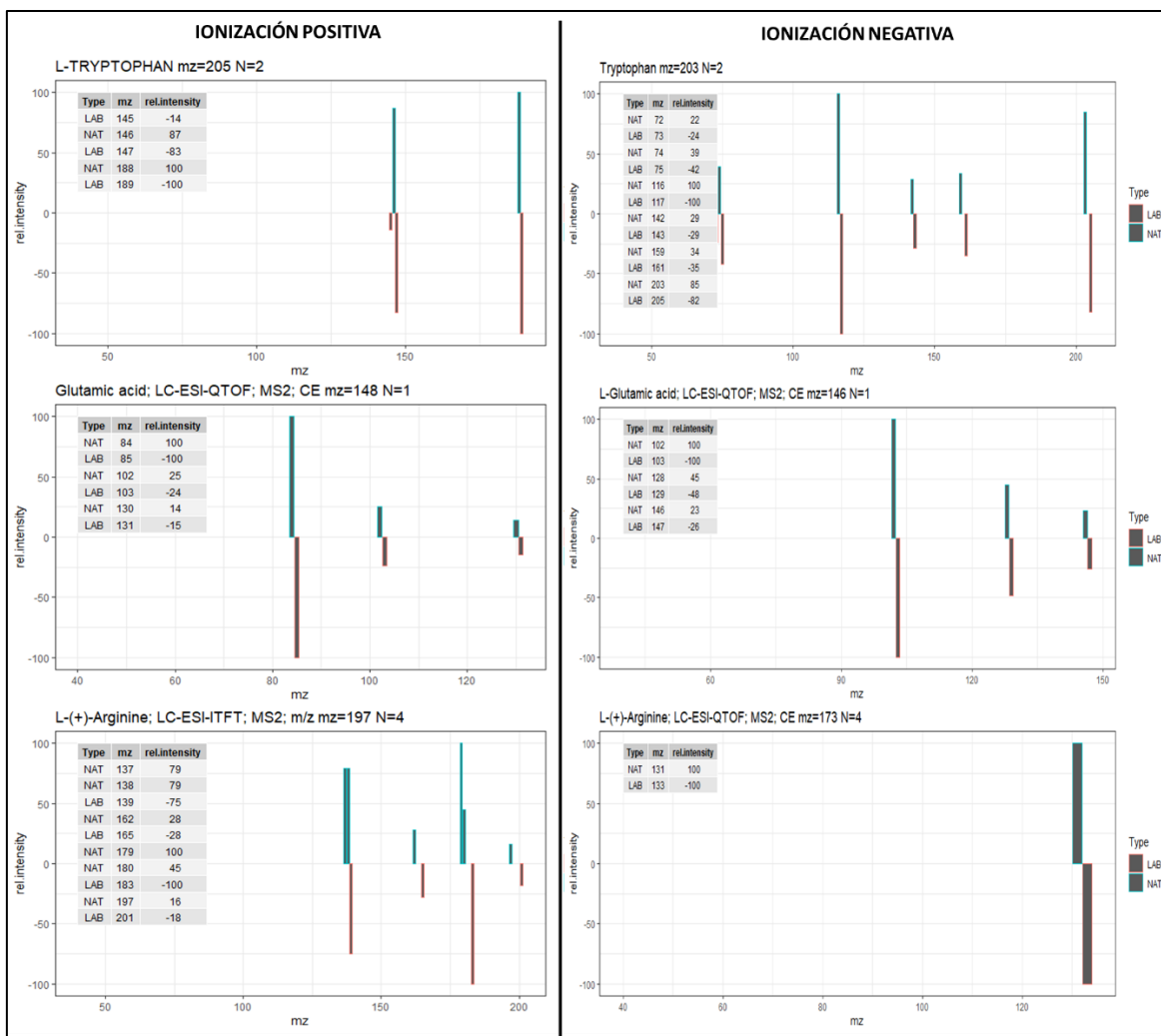


Figura 10. Espectros de fragmentación enfrentados para triptófano, ácido glutámico y arginina en ionización positiva y negativa.

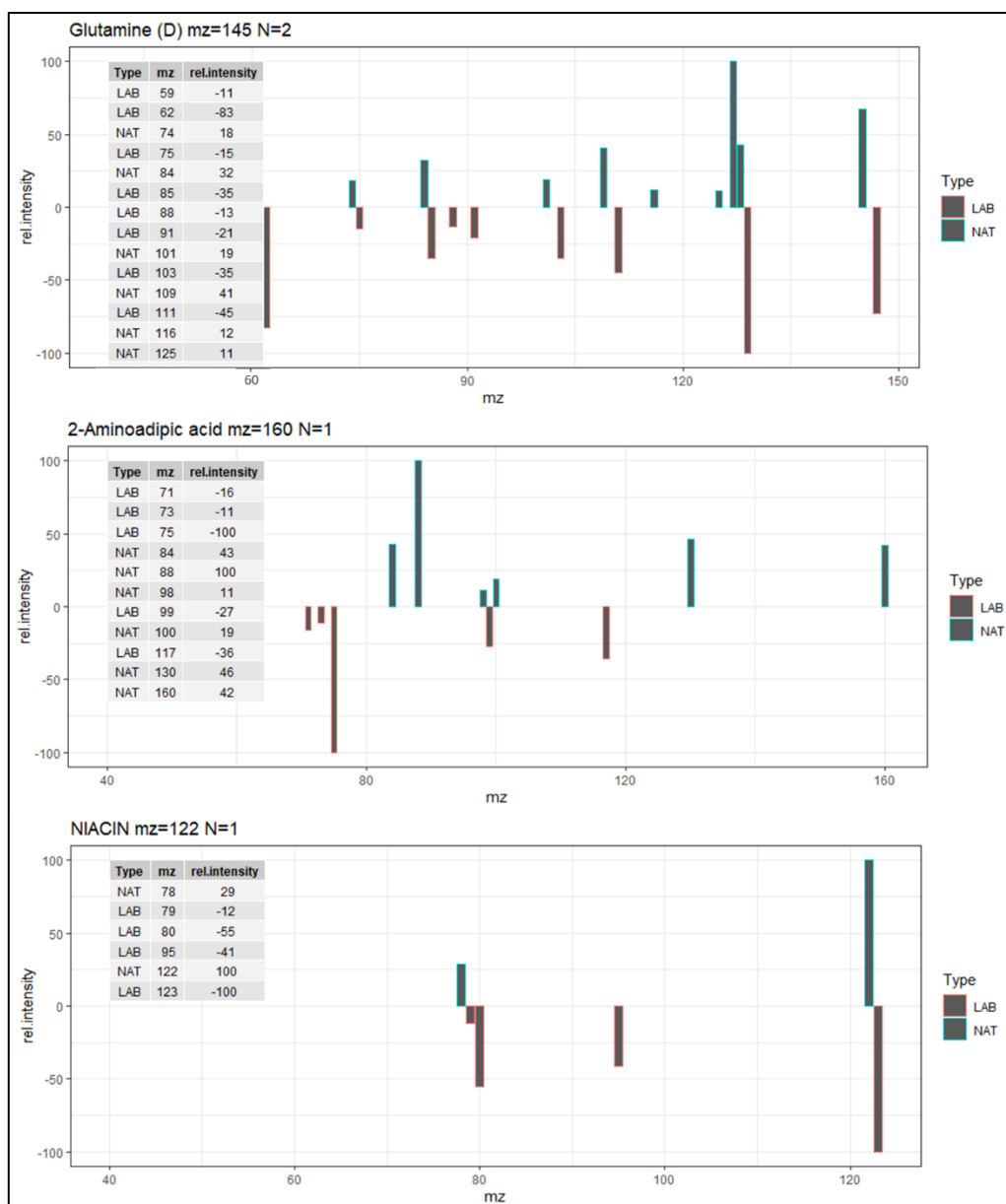


Figura 11. Espectros de fragmentación enfrentados para glutamina, ácido 2-aminoácido y niacina en ionización negativa.

Hasta este momento se han presentado resultados de compuestos identificados que son relativamente comunes: aminoácidos, bases nitrogenadas y derivados. Sin embargo, en las tablas 9 y 10 también se presentan otras clases de compuestos nitrogenados, aminas, amidas y compuestos heterocíclicos derivados de la piridina, pirrolidina, piperidina, quinolinas e indoles. También se han identificado diferentes ácidos orgánicos, dipéptidos y un azúcar (ácido murámico). Los espectros de fragmentación enfrentados para algunos de estos compuestos se presentan en la Figura 12. Así mismo, en la Figura 13 se muestran los espectros de fragmentación enfrentados de los dos compuestos identificados con mayor peso molecular, la riboflavina, que es una vitamina y el S-adenosil-homocisteína (SAH), un intermedio considerado como un marcador

en procesos de desmetilación de ADN³⁶. Este último compuesto es, además, el compuesto con el mayor número de átomos de nitrógeno identificado (6).

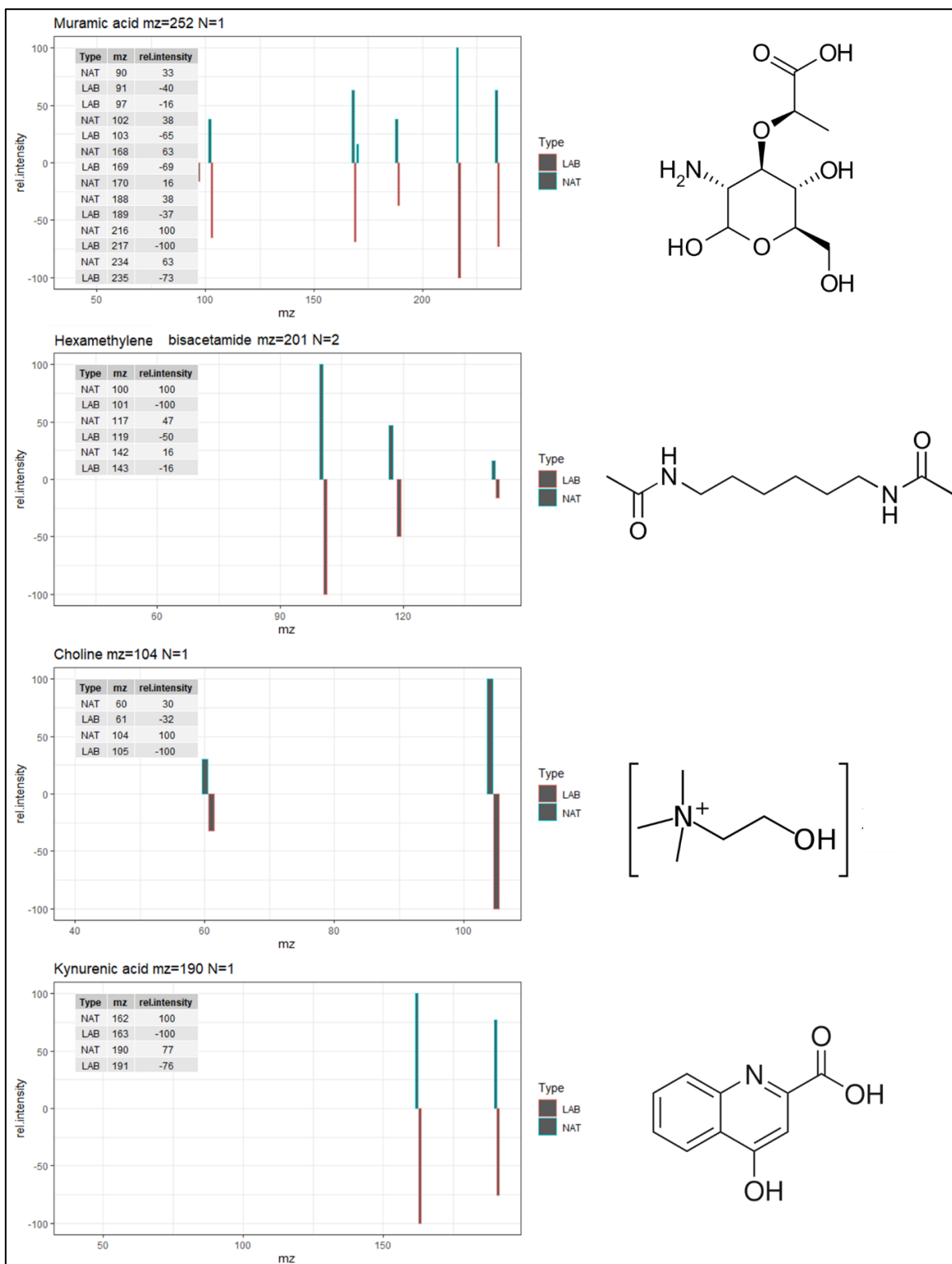


Figura 12. Espectros de fragmentación enfrentados para el ácido murámico, la hexametilénbisacetamida, la colina y el ácido quinurénico en ionización positiva.

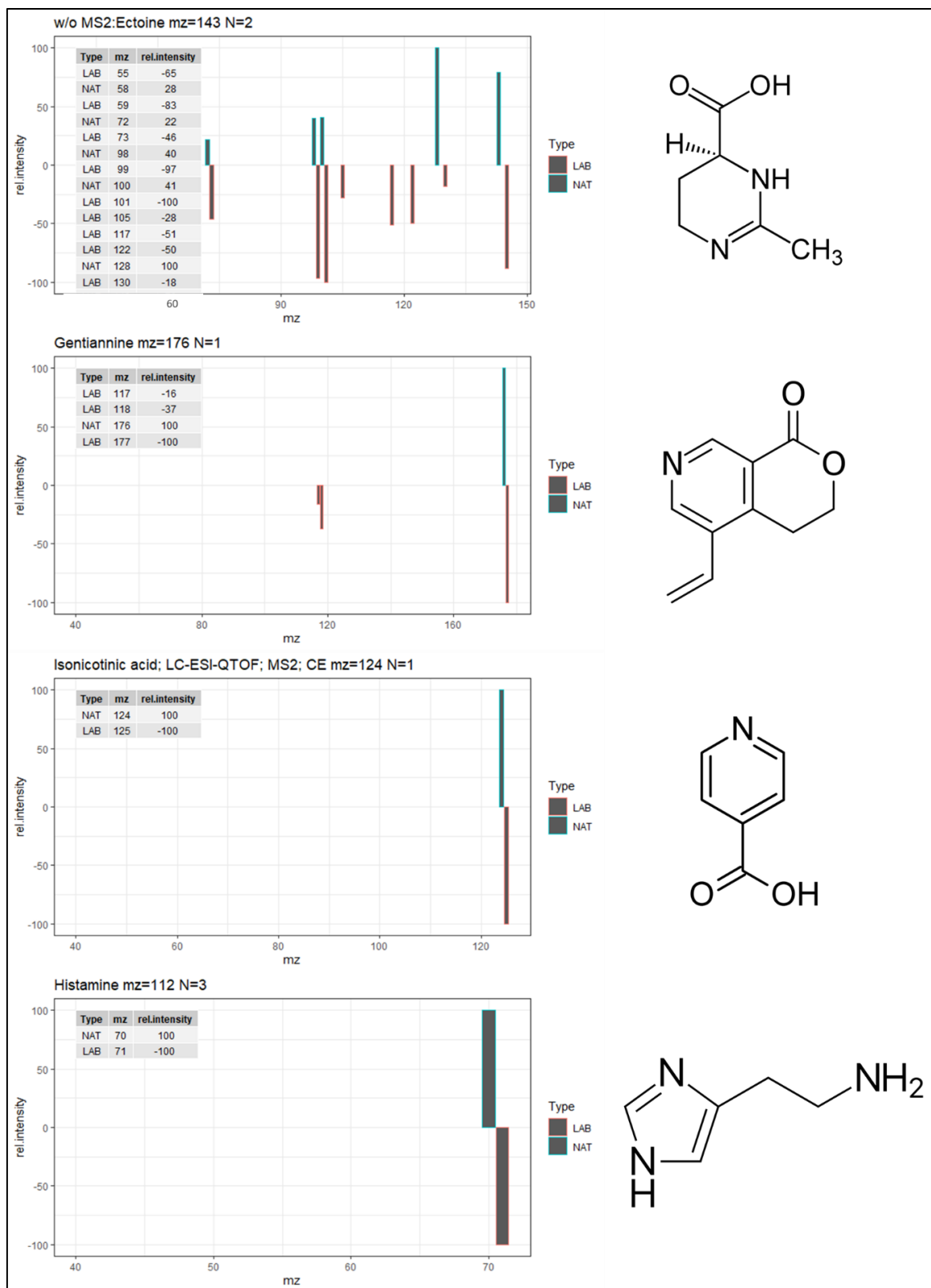


Figura 12. Espectros de fragmentación enfrentados para la ectoína, la gentianina, el ácido isonicotínico y la histamina en ionización positiva.

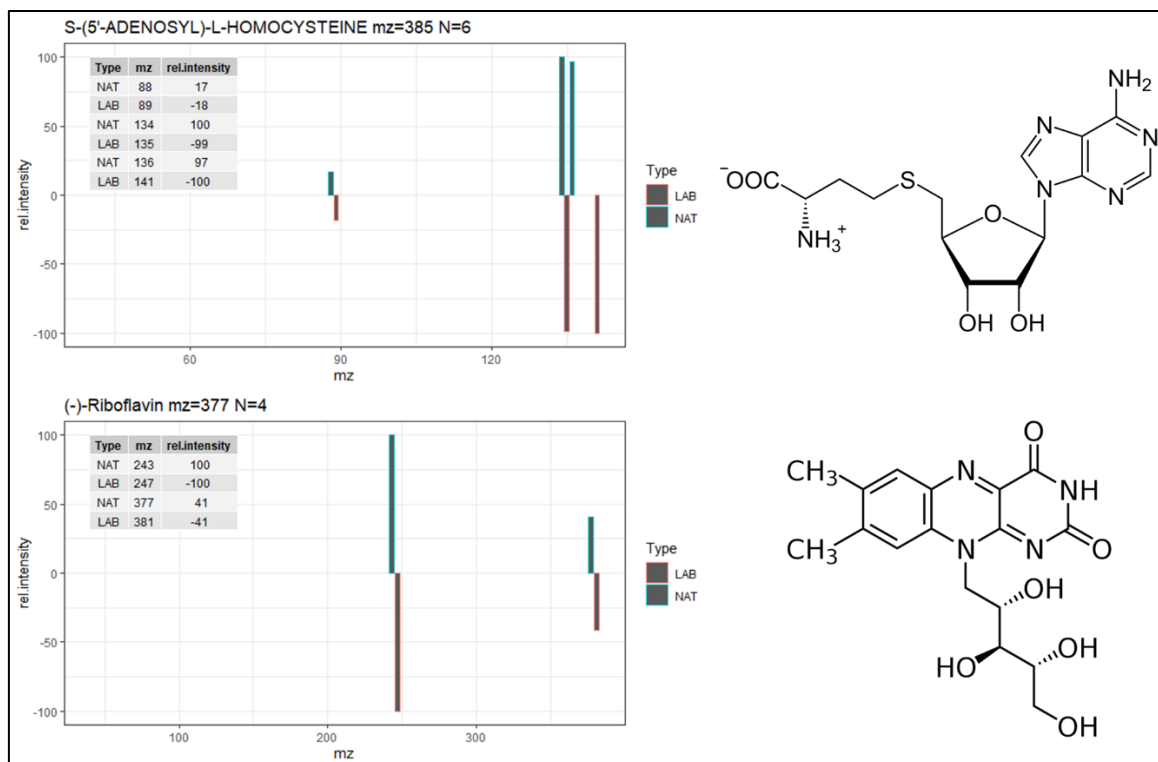


Figura 13. Espectros de fragmentación enfrentados para la S-adenosil-homocisteína y la riboflavina en ionización positiva.

Por otra parte, en lo que respecta al tiempo de retención, se han asignado 15 compuestos con nivel de identificación 1 a pesar de no disponer patrones para ellos. Esto se debe a las conclusiones que se han derivado de la sección de identificación de compuestos naturales y la Tabla 7, ya que los tiempos de retención de los analitos coinciden con los publicados en la base de datos del UC Davis. Cuando no se dispone de patrones comerciales o de información sobre el tiempo de retención sobre determinados compuestos se obtienen identificaciones con nivel de confianza 2. En este caso, la identidad de compuesto no está del todo confirmada, ya que puede tratarse de isómeros (misma masa exacta) y en la identificación aparecen varias posibilidades. Este último caso se ejemplifica en la Figura 14, donde se presenta una comparación de espectros de masas obtenidos para un compuesto con m/z 175, dos átomos de nitrógeno y tiempo de retención 8,19 min. Las dos posibles estructuras asignadas por la librería son teanina y n-alfa-acetilornitina. En primer lugar, se observa que los espectros natural y marcado no coinciden completamente. A pesar de ello, dado que debe ser uno de los dos compuestos asignados, la asignación se hace en base al tiempo de retención reportado para esos compuestos y a la separación empleada. Según la base de datos del UC Davis, la teanina presenta un tiempo de retención de 7,66 min para esta separación. Dado que el compuesto medido eluye a 8,19 min, se concluye que la alfa-acetilornitina es el compuesto verdadero.

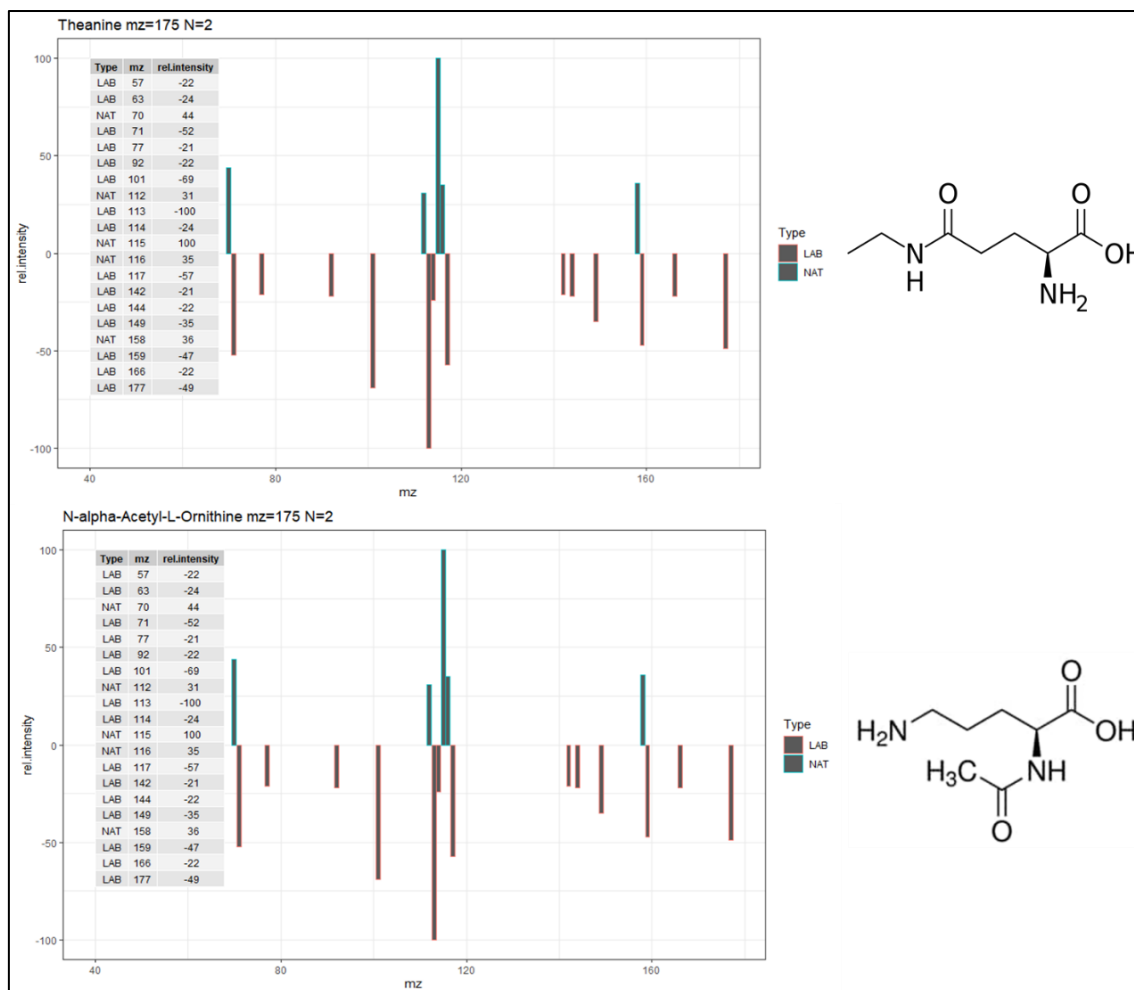


Figura 14. Comparación de espectros natural y marcado del compuesto con m/z 175 y rt= 8,19 min, identificado como teanina o N-alfa-acetilornitina.

La elección de la energía de colisión también es importante en la identificación de compuestos por dos motivos: el primero es que, al contrario que en ionización por impacto electrónico, la fragmentación en ESI es muy variable. Por ello, la fragmentación debe realizarse en condiciones similares a las de la librería de espectros para que estos coincidan. En segundo lugar, en algunos casos la energía de colisión puede no ser lo suficientemente alta y no producirse la fragmentación o, por el contrario, producirse una excesiva fragmentación, perdiéndose información estructural. Estos casos se ejemplifican en las Figuras 15 y 16, respectivamente. En la Figura 15 observamos que debido a la baja fragmentación no se puede discernir entre putrescina y tetrametilenediamina. En estos casos, la práctica más habitual es basar la selección de la identidad en estudios bibliográficos previos, en este caso experimentos de identificación de metabolitos en *Chlamydomonas reinhardtii*³⁷⁻³⁹. Por otro lado, en la Figura 16 se presenta la comparación de espectros de fragmentación natural y marcado asignados al compuesto guanosina. Dado que en la fragmentación se pierde el ion parental para el compuesto marcado, la comparación de espectros puede ser errónea. Esto se debe a que la fragmentación de los compuestos naturales y marcados

se llevó a cabo en diferentes determinaciones y con una diferente matriz, lo cual se puede corregir empleando la estrategia FragExtract de MetExtract (realizando la fragmentación de mezclas natural:marcado, igual que se hizo la identificación con MS1). No obstante, en este caso se considera correcta su identidad por la elevada probabilidad de que sea ese compuesto, por su coincidencia en el tiempo de retención y porque es conocido que los nucleósidos pierden el azúcar con elevada facilidad. Este es el caso también del uracilo (t.r. = 4,89 min). El uracilo se encuentra en la Tabla 7 a pesar de no coincidir su tiempo de retención con el de un patrón. Sin embargo, su m/z molecular y sus espectros de fragmentación coinciden en un alto grado. A través de una búsqueda bibliográfica y de la inspección de los resultados, se concluye que el compuesto con tiempo de retención 4,89 min y que presenta una masa y un espectro de fragmentación idéntico al uracilo es la uridina, que durante su ionización en la fuente pierde el azúcar y se convierte en uracilo. Esto es respaldado por el tiempo de retención de la uridina en la base de datos del UCDavis (4,72 min). Para otros analitos de la Tabla 6 como la prolina o la 5-metilcitosina se da la misma situación, pero los demás casos no se ha podido encontrar una explicación para la diferencia en el tiempo de retención, con lo que, aunque sus masas y espectros de fragmentación coincidan, deben ser considerados identificados con nivel de confianza 2.

Por último, además del tiempo de retención y la energía de fragmentación, la librería de identificación es fundamental. De entre los compuestos presentados en la Tabla 6 es más probable que algunos compuestos se encuentren verdaderamente en los extractos empleados que otros. Una librería específica de metabolitos de plantas contendría compuestos más similares a los presentes en las muestras empleadas en este estudio que una librería de espectros de compuestos químicos no relacionados con procesos biológicos. Por este motivo es importante publicar y poner a disposición pública toda la información obtenida en los experimentos de metabolómica, tal y como indica la Iniciativa de Estándares de Metabolómica, de tal manera que existan librerías más completas^{1,2}.

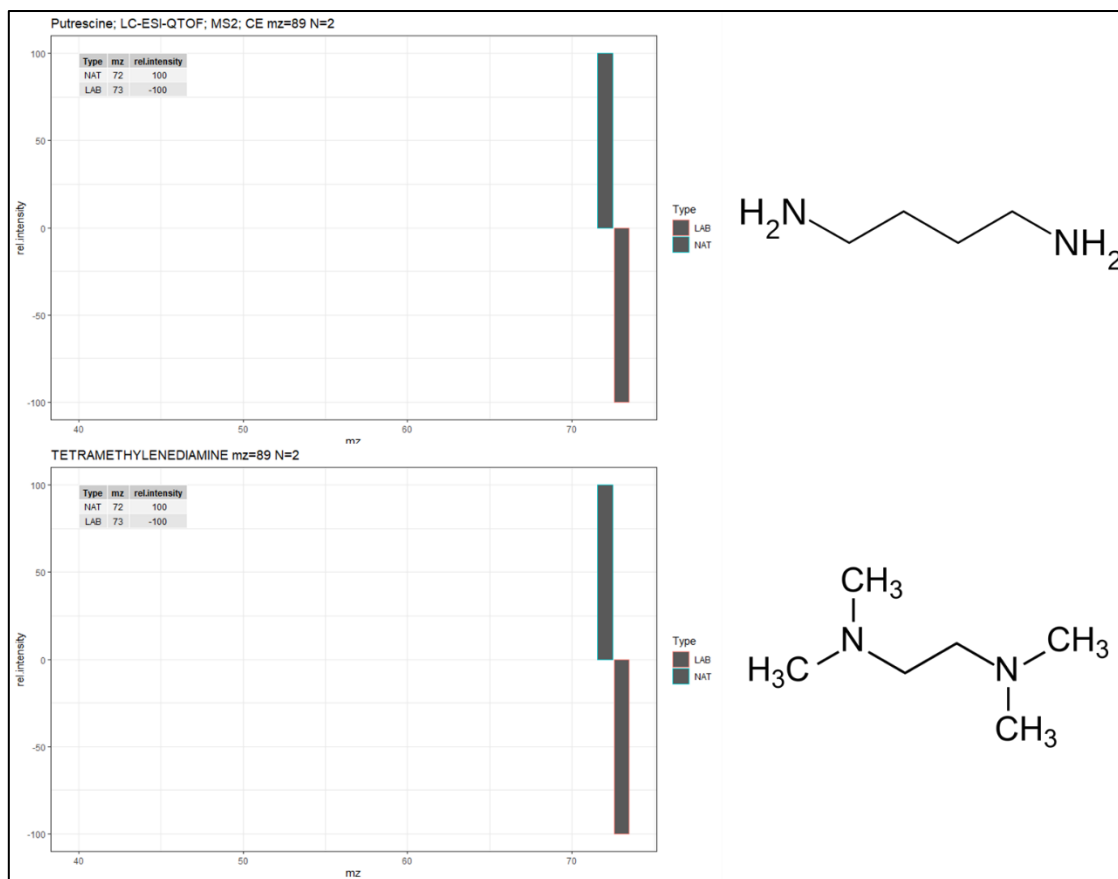


Figura 15. Espectros de fragmentación enfrentado de putrescina y tetrametilenediamina en ionización positiva. Sin fragmentación no hay posibilidad de distinción entre estos isómeros.

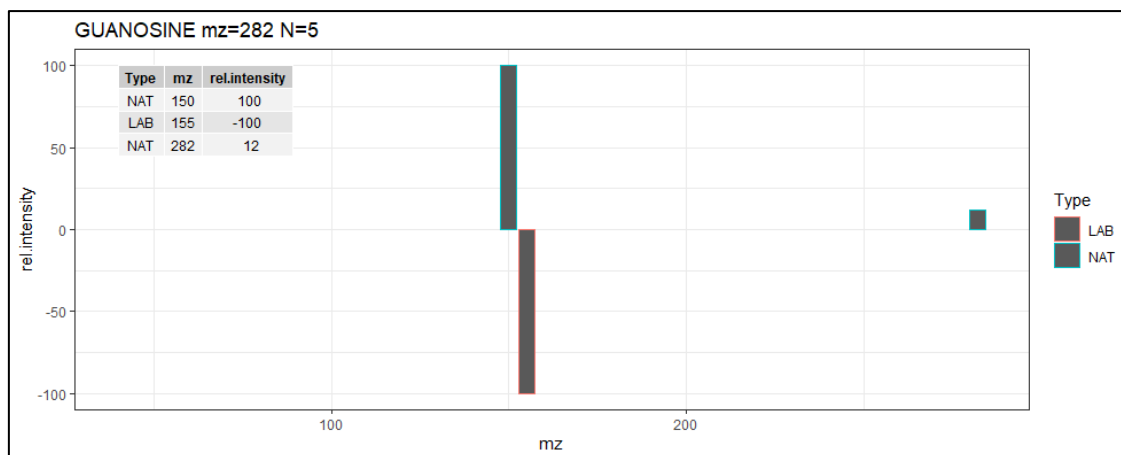


Figura 16. Espectros de fragmentación de guanosina en ionización negativa. El ion marcado no presenta el ion parental debido a una elevada energía de fragmentación.

IV. 5. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la estrategia propuesta es eficaz para identificar metabolitos nitrogenados naturales y marcados empleando como microorganismo modelo la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y una separación HILIC seguido de la detección con un espectrómetro de tipo Orbitrap. Los compuestos identificados pertenecen a los principales grupos de compuestos: aminoácidos, derivados de bases nitrogenadas y ácidos orgánicos, siendo este último grupo el menos numeroso. Estos resultados eran esperables, pues la mayoría de los ácidos orgánicos no presentan átomos de nitrógeno. Así mismo, también se han identificado metabolitos de ciclos secundarios, como vitaminas (riboflavina o niacina), alcaloides (gentianina, ácido quinurénico o vincanidina) y constituyentes de las membranas celulares (colina, acetilcolina y glicerofosocolina).

Se concluye, así mismo, que la metodología presenta algunas limitaciones, pues no se ha identificado la totalidad de los aminoácidos proteinogénicos ni de las nucleobases. A pesar de que, como se ha comentado en la introducción, la identificación de moléculas muy complejas es motivo de concursos⁴⁰ y la Espectrometría de Masas no es capaz de identificar o resolver en su totalidad la estructura de una gran cantidad de moléculas conocidas, los aminoácidos proteinogénicos y las nucleobases son compuestos que presentan una elevada abundancia en las células biológicas.

Por otro lado, es la segunda vez que el programa MetExtract se emplea para llevar a cabo asignaciones de compuestos marcados en ¹⁵N, lo cual es especialmente difícil dado que los metabolitos se encuentran mínimamente marcados⁴¹. El metabolito con mayor número de marcas determinado (6) ha sido la S-adenosil-homocisteína. Así mismo, dado que la identificación es por parejas de compuestos naturales y marcados, es la primera vez que esta estrategia se aplica para caracterizar el metaboloma de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Por último, la obtención de mezclas de metabolitos marcados es un campo de trabajo creciente y esencial para la mejora de los estudios de metabolómica. Así, un panel de metabolitos similar fue obtenido recientemente para la levadura *P. pastoris* para llevar a cabo estudios de metabolómica como el descubrimiento de biomarcadores, la inspección de rutas metabólicas o la investigación de los ciclos energéticos⁴². Se puede concluir que la metodología desarrollada es un primer paso en la producción propia de un material de referencia a emplear en futuros estudios de metabolómica.

IV. 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; van der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; Fostel, J.; Kristal, B.; Kaddurah-Daouk, R.; Mendes, P.; van Ommen, B.; Lindon, J. C.; Sansone, S. A. The Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3* (3). <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>.
- (2) Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W. M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; Hankemeier, T.; Hardy, N.; Harnly, J.; Higashi, R.; Kopka, J.; Lane, A. N.; Lindon, J. C.; Marriott, P.; Nicholls, A. W.; Reily, M. D.; Thaden, J. J.; Viant, M. R. Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3* (3). <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.
- (3) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science and Technology*. 2014. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- (4) Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ikeda, K.; Kanazawa, M.; Vanderghenst, J.; Fiehn, O.; Arita, M. MS-DIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat Methods* **2015**, *12* (6). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.
- (5) Guijas, C.; Montenegro-Burke, J. R.; Domingo-Almenara, X.; Palermo, A.; Warth, B.; Hermann, G.; Koellensperger, G.; Huan, T.; Uritboonthai, W.; Aisporna, A. E.; Wolan, D. W.; Spilker, M. E.; Benton, H. P.; Siuzdak, G. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Anal Chem* **2018**, *90* (5). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04424>.
- (6) Koelmel, J. P.; Li, X.; Stow, S. M.; Sartain, M. J.; Murali, A.; Kemperman, R.; Tsugawa, H.; Takahashi, M.; Vasiliou, V.; Bowden, J. A.; Yost, R. A.; Garrett, T. J.; Kitagawa, N. Lipid Annotator: Towards Accurate Annotation in Non-Targeted Liquid Chromatography High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS) Lipidomics Using a Rapid and User-Friendly Software. *Metabolites* **2020**, *10* (3). <https://doi.org/10.3390/metabo10030101>.
- (7) Tsugawa, H.; Kind, T.; Nakabayashi, R.; Yukihiro, D.; Tanaka, W.; Cajka, T.; Saito, K.; Fiehn, O.; Arita, M. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal Chem* **2016**, *88* (16). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>.
- (8) Smith, C. A.; O'Maille, G.; Want, E. J.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Brandon, T. R.; Custodio, D. E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. In *Therapeutic Drug Monitoring*; 2005; Vol. 27. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>.

- (9) Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45* (7). <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.
- (10) Kind, T.; Liu, K. H.; Lee, D. Y.; Defelice, B.; Meissen, J. K.; Fiehn, O. LipidBlast in Silico Tandem Mass Spectrometry Database for Lipid Identification. *Nat Methods* **2013**, *10* (8). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2551>.
- (11) Leao, T. F.; Clark, C. M.; Bauermeister, A.; Elijah, E. O.; Gentry, E. C.; Husband, M.; Oliveira, M. F.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Quick-Start Infrastructure for Untargeted Metabolomics Analysis in GNPS. *Nature Metabolism*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00429-0>.
- (12) da Silva, R. R.; Dorrestein, P. C.; Quinn, R. A. Illuminating the Dark Matter in Metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516878112>.
- (13) Viant, M. R.; Kurland, I. J.; Jones, M. R.; Dunn, W. B. How Close Are We to Complete Annotation of Metabolomes? *Current Opinion in Chemical Biology*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.001>.
- (14) Schymanski, E.; Neumann, S. The Critical Assessment of Small Molecule Identification (CASMI): Challenges and Solutions. *Metabolites* **2013**, *3* (3). <https://doi.org/10.3390/metabo3030517>.
- (15) Cho, K.; Mahieu, N.; Ivanisevic, J.; Uritboonthai, W.; Chen, Y. J.; Siuzdak, G.; Patti, G. J. IsoMETLIN: A Database for Isotope-Based Metabolomics. *Anal Chem* **2014**, *86* (19). <https://doi.org/10.1021/ac5029177>.
- (16) Hao, L.; Zhu, Y.; Wei, P.; Johnson, J.; Buchberger, A.; Frost, D.; Kao, W. J.; Li, L. Metandem: An Online Software Tool for Mass Spectrometry-Based Isobaric Labeling Metabolomics. *Anal Chim Acta* **2019**, *1088*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.046>.
- (17) Capellades, J.; Navarro, M.; Samino, S.; Garcia-Ramirez, M.; Hernandez, C.; Simo, R.; Vinaixa, M.; Yanes, O. GeoRge: A Computational Tool to Detect the Presence of Stable Isotope Labeling in LC/MS-Based Untargeted Metabolomics. *Anal Chem* **2016**, *88* (1). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03628>.

- (18) Chokkathukalam, A.; Jankevics, A.; Creek, D. J.; Achcar, F.; Barrett, M. P.; Breitling, R. MzMatch-ISO: An R Tool for the Annotation and Relative Quantification of Isotope-Labelled Mass Spectrometry Data. *Bioinformatics* **2013**, *29* (2). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts674>.
- (19) Melamud, E.; Vastag, L.; Rabinowitz, J. D. Metabolomic Analysis and Visualization Engine for LC - MS Data. *Anal Chem* **2010**, *82* (23). <https://doi.org/10.1021/ac1021166>.
- (20) Hoffmann, F.; Jaeger, C.; Bhattacharya, A.; Schmitt, C. A.; Lise, J. Nontargeted Identification of Tracer Incorporation in High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2018**, *90* (12). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00356>.
- (21) Kiefer, P.; Schmitt, U.; Müller, J. E. N.; Hartl, J.; Meyer, F.; Ryffel, F.; Vorholt, J. A. DynaMet: A Fully Automated Pipeline for Dynamic LC-MS Data. *Anal Chem* **2015**, *87* (19). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01660>.
- (22) Huang, X.; Chen, Y. J.; Cho, K.; Nikolskiy, I.; Crawford, P. A.; Patti, G. J. X13CMS: Global Tracking of Isotopic Labels in Untargeted Metabolomics. *Anal Chem* **2014**, *86* (3). <https://doi.org/10.1021/ac403384n>.
- (23) Bueschl, C.; Kluger, B.; Neumann, N. K. N.; Doppler, M.; Maschietto, V.; Thallinger, G. G.; Meng-Reiterer, J.; Krska, R.; Schuhmacher, R. MetExtract II: A Software Suite for Stable Isotope-Assisted Untargeted Metabolomics. *Anal Chem* **2017**, *89* (17). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02518>.
- (24) Mahmood, T.; Yang, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* **2012**, *4* (9). <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- (25) Dange, M. C.; Mishra, V.; Mukherjee, B.; Jaiswal, D.; Merchant, M. S.; Prasanna, C. B.; Wangikar, P. P. Evaluation of Freely Available Software Tools for Untargeted Quantification of ¹³C Isotopic Enrichment in Cellular Metabolome from HR-LC/MS Data. *Metab Eng Commun* **2020**, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00120>.
- (26) Bueschl, C.; Kluger, B.; Berthiller, F.; Lirk, G.; Winkler, S.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Metextract: A New Software Tool for the Automated Comprehensive Extraction of Metabolite-Derived Lc/Ms Signals in Metabolomics Research. *Bioinformatics* **2012**, *28* (5). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts012>.
- (27) Adusumilli, R.; Mallick, P. Data Conversion with ProteoWizard MsConvert. In *Methods in Molecular Biology*; 2017; Vol. 1550. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_23.
- (28) <http://www.reifycs.com/AbfConverter/index.html>.

- (29) Sturm, M.; Kohlbacher, O. TOPPView: An Open-Source Viewer for Mass Spectrometry Data. *J Proteome Res* **2009**, *8* (7). <https://doi.org/10.1021/pr900171m>.
- (30) <Http://Prime.Psc.Riken.Jp/Compms/Msdial/Main.Html#MSP>.
- (31) Blaženović, I.; Kind, T.; Sa, M. R.; Ji, J.; Vaniya, A.; Wancewicz, B.; Roberts, B. S.; Torbašinović, H.; Lee, T.; Mehta, S. S.; Showalter, M. R.; Song, H.; Kwok, J.; Jahn, D.; Kim, J.; Fiehn, O. Structure Annotation of All Mass Spectra in Untargeted Metabolomics. *Anal Chem* **2019**, *91* (3). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04698>.
- (32) Nicolás Carcelén, J.; Marchante-Gayón, J. M.; González, P. R.; Valledor, L.; Cañal, M. J.; Alonso, J. I. G. A Cost-Effective Approach to Produce ¹⁵N-Labelled Amino Acids Employing *Chlamydomonas Reinhardtii* CC503. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0759-9>.
- (33) Milman, B. L. General Principles of Identification by Mass Spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.009>.
- (34) Rossum, G. van. *PEP 8 -- Style Guide for Python Code* | Python.org. python.org.
- (35) Loos, M.; Gerber, C.; Corona, F.; Hollender, J.; Singer, H. Accelerated Isotope Fine Structure Calculation Using Pruned Transition Trees. *Anal Chem* **2015**, *87* (11). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00941>.
- (36) Jill James, S.; Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I. P.; Caudill, M. A. Elevation in S-Adenosylhomocysteine and DNA Hypomethylation: Potential Epigenetic Mechanism for Homocysteine-Related Pathology. In *Journal of Nutrition*; 2002; Vol. 132. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2361s>.
- (37) Bölling, C.; Fiehn, O. Metabolite Profiling of *Chlamydomonas Reinhardtii* under Nutrient Deprivation. *Plant Physiol* **2005**, *139* (4). <https://doi.org/10.1104/pp.105.071589>.
- (38) Jüppner, J.; Mubeen, U.; Leisse, A.; Caldana, C.; Brust, H.; Steup, M.; Herrmann, M.; Steinhauser, D.; Giavalisco, P. Dynamics of Lipids and Metabolites during the Cell Cycle of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Journal* **2017**, *92* (2). <https://doi.org/10.1111/tpj.13642>.
- (39) Lee, D. Y.; Fiehn, O. High Quality Metabolomic Data for *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Methods* **2008**, *4* (1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-7>.
- (40) Nikolic, D.; Jones, M.; Sumner, L.; Dunn, W. CASMI 2014: Challenges, Solutions and Results. *Curr Metabolomics* **2016**, *5* (1). <https://doi.org/10.2174/2213235x04666160617113437>.

- (41) Čeranić, A.; Doppler, M.; Büschl, C.; Parich, A.; Xu, K.; Koutnik, A.; Bürstmayr, H.; Lemmens, M.; Schuhmacher, R. Preparation of Uniformly Labelled ¹³C- And ¹⁵N-Plants Using Customised Growth Chambers. *Plant Methods* **2020**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00590-9>.
- (42) Rampler, E.; Coman, C.; Hermann, G.; Sickmann, A.; Ahrends, R.; Koellensperger, G. LILY-Lipidome Isotope Labeling of Yeast:: In Vivo Synthesis of ¹³C Labeled Reference Lipids for Quantification by Mass Spectrometry. *Analyst* **2017**, *142* (11). <https://doi.org/10.1039/c7an00107j>.

Anexo I. Tabla de los 221 compuestos naturales identificados en el Capítulo 4.

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS.MS. matched
Fiehn	Threonine	C4H9NO3	L-alpha-amino acids	1.25	120.0654	[M+H] ⁺	310	55	True
Fiehn	Hexamethylene-bisacetamide	C10H20N2O2	Carboximidic acids	1.31	201.1598	[M+H] ⁺	561	65	True
Fiehn	Nicotinamide	C6H6N2O	Nicotinamides	1.62	123.0552	[M+H] ⁺	2674	93	True
Fiehn	5'-Methylthioadenosine	C11H15N5O3S	5'-deoxy-5'-thionucleosides	2.03	298.0961	[M+H] ⁺	3451	84	True
Fiehn	Adenine	C5H5N5	6-aminopurines	2.04	136.062	[M+H] ⁺	279	85	True
Fiehn	Proline	C5H9NO2	Proline and derivatives	2.12	116.0707	[M+H] ⁺	37	74	True
Fiehn	Uracil	C4H4N2O2	Pyrimidones	2.38	113.0346	[M+H] ⁺	146	92	True
Fiehn	Nicotinic acid	C6H5NO2	Pyridinecarboxylic acids	3.94	124.0395	[M+H] ⁺	466	86	True
Fiehn	5,6-Dihydro-5-methyluracil	C5H8N2O2	Hydropyrimidines	4.19	129.0661	[M+H] ⁺	18	57	True
Fiehn	4-Pyridoxic acid	C8H9NO4	Pyridinecarboxylic acids	4.31	184.0636	[M+H] ⁺	4	61	True
Fiehn	Adenosine	C10H13N5O4	Purine nucleosides	4.84	268.1037	[M+H] ⁺	4078	91	True
Fiehn	Hypoxanthine	C5H4N4O	Hypoxanthines	4.86	137.046	[M+H] ⁺	1739	88	True
Fiehn	Uridine	C9H12N2O6	Pyrimidine nucleosides	4.88	245.0765	[M+H] ⁺	5	80	True
Fiehn	Urocanic acid	C6H6N2O2	Imidazolyl carboxylic acids and derivatives	3.65	139.0505	[M+H] ⁺	93	63	True
Fiehn	3-Ureidopropionic acid	C4H8N2O3	Ureas	5.54	133.0609	[M+H] ⁺	340	67	True
Fiehn	N2-Methylguanosine	C11H15N5O5	Purine nucleosides	5.71	298.1144	[M+H] ⁺	144	86	True
Fiehn	Cytosine	C4H5N3O	Pyrimidones	5.75	112.0504	[M+H] ⁺	73	93	True
Fiehn	Guanine	C5H5N5O	Purines and purine derivatives	5.75	152.0566	[M+H] ⁺	199	86	True
Fiehn	Choline [M] ⁺	C5H14NO	Cholines	5.18	104.1071	[M] ⁺	692	93	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS. matched
Fiehn	Histamine	C5H9N3	2-arylethylamines	5.66	112.0868	[M+H] ⁺	653	55	True
Fiehn	Vesamicol	C17H25NO	Phenylpiperidines	5.68	260.1964	[M+H] ⁺	1074	57	True
Fiehn	5,6-Dihydrouacil	C4H6N2O2	Pyrimidones	5.72	115.0501	[M+H] ⁺	39	86	True
Fiehn	Vinyl Carbamate	C3H5NO2	Carbamate esters	5.79	88.03934	[M+H] ⁺	379	75	True
Fiehn	N-Methylproline	C6H11NO2	Proline and derivatives	5.79	130.0862	[M+H] ⁺	5319	64	True
Fiehn	Lysine	C6H14N2O2	D-alpha-amino acids	5.79	147.113	[M+H] ⁺	77655	54	True
Fiehn	N-Acetyl-leucine	C8H15NO3	Leucine and derivatives	6.13	174.1124	[M+H] ⁺	985	60	True
Fiehn	Riboflavin	C17H20N4O6	Flavins	6.19	377.1457	[M+H] ⁺	1338	89	True
Fiehn	Phenylalanine	C9H11NO2	Phenylalanine and derivatives	6.27	166.0863	[M+H] ⁺	13	85	True
Fiehn	Kynurenic acid	C10H7NO3	Quinoline carboxylic acids	6.29	190.05	[M+H] ⁺	256	92	True
Fiehn	4-Methyl-5-thiazoleethanol	C6H9NOS	4,5-disubstituted thiazoles	6.72	144.0478	[M+H] ⁺	147	91	True
Fiehn	N2,N2-Dimethylguanosine	C12H17N5O5	Purine nucleosides	6.81	312.1299	[M+H] ⁺	789	83	True
Fiehn	1-Benzylimidazole	C10H10N2	N-substituted imidazoles	6.83	159.0915	[M+H] ⁺	281	64	True
Fiehn	Tryptophan	C11H12N2O2	Indolyl carboxylic acids and derivatives	6.83	205.0975	[M+H] ⁺	16259	95	True
Fiehn	Guanidinoacetic acid	C3H7N3O2	Alpha amino acids and derivatives	6.92	118.0652	[M+H] ⁺	85	59	True
Fiehn	Isoleucine	C6H13NO2	Isoleucine and derivatives	7.10	132.102	[M+H] ⁺	68377	86	True
Fiehn	3-Indoleacetic acid	C10H9NO2	Indole-3-acetic acid derivatives	7.12	176.0656	[M+H] ⁺	965	68	True
Fiehn	3-Methylcytidine	C10H15N3O5	Pyrimidine nucleosides	7.19	258.1081	[M+H] ⁺	182	86	True
Fiehn	Guanosine	C10H13N5O5	Purine nucleosides	7.28	284.0989	[M+H] ⁺	8771	86	True
Fiehn	Ethanolamine	C2H7NO	1,2-aminoalcohols	7.42	62.06018	[M+H] ⁺	23198	61	True
Fiehn	Tyrosine	C9H11NO3	Tyrosine and derivatives	7.67	182.0815	[M+H] ⁺	3799	94	True
Fiehn	2-Phenylacetamide	C8H9NO	Phenylacetamides	7.67	136.0756	[M+H] ⁺	269	82	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS. matched
Fiehn	Gly-Leu	C8H16N2O3	Peptides	7.73	189.1238	[M+H] ⁺	533	80	True
Fiehn	Pyridoxamine	C8H12N2O2	Pyridoxamine 5'-phosphates	7.94	169.0973	[M+H] ⁺	391	93	True
Fiehn	N,N-Dimethylformamide	C3H7NO	Tertiary carboxylic acid amides	8.21	74.06006	[M+H] ⁺	838	79	True
Fiehn	Theanine	C7H14N2O3	Glutamine and derivatives	8.33	175.1082	[M+H] ⁺	431	59	True
Fiehn	N-Methylglutamic acid	C6H11NO4	Glutamic acid and derivatives	8.42	162.0763	[M+H] ⁺	70	71	True
Fiehn	Pyroglutamic acid	C5H7NO3	Alpha amino acids and derivatives	8.54	130.0499	[M+H] ⁺	2182	91	True
Fiehn	Methioninesulfoxide	C5H11NO3S	Alpha amino acids	8.61	166.0535	[M+H] ⁺	116	91	True
Fiehn	Serine	C3H7NO3	Serine and derivatives	8.61	106.0501	[M+H] ⁺	16722	87	True
Fiehn	S-Adenosyl-homocysteine	C14H20N6O5S	5'-deoxy-5'-thionucleosides	8.72	385.1296	[M+H] ⁺	1115	93	True
Fiehn	Glutamic acid	C5H9NO4	Glutamic acid and derivatives	8.73	148.0605	[M+H] ⁺	10826	88	True
Fiehn	Muramic acid	C9H17NO7	Sugar acids and derivatives	8.80	252.1079	[M+H] ⁺	920	65	True
Fiehn	SDMA	C8H18N4O2	Arginine and derivatives	8.82	203.1509	[M+H] ⁺	22865	90	True
Fiehn	Adenosine-3'-monophosphate	C10H14N5O7P	Ribonucleoside 3'-phosphates	9.00	348.0694	[M+H] ⁺	1723	82	True
Fiehn	Targinine	C7H16N4O2	Arginine and derivatives	9.11	189.135	[M+H] ⁺	284	92	True
Fiehn	Carnosine	C9H14N4O3	Hybrid peptides	9.29	227.1136	[M+H] ⁺	1196	73	True
Fiehn	Histidine	C6H9N3O2	Histidine and derivatives	9.49	156.0769	[M+H] ⁺	966	93	True
Fiehn	Ornithine	C5H12N2O2	L-alpha-amino acids	9.55	133.097	[M+H] ⁺	140	84	True
Fiehn	w/o MS2:Tryptoline	C11H12N2	Beta carbolines	1.61	173.1172	[M+H] ⁺	1045	61	False
Fiehn	w/o MS2:Cyclo(Leu-Pro)	C11H18N2O2	Alpha amino acids and derivatives	3.24	211.1438	[M+H] ⁺	283	100	False
Fiehn	w/o MS2:Galactosamine	C6H13NO5	Hexoses	3.67	180.088	[M+H] ⁺	181	99	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS. matched
Fiehn	w/o MS2:3-Methylcrotonylglycine	C7H11NO3	N-acyl-alpha amino acids	4.49	158.0812	[M+H] ⁺	35	100	False
Fiehn	w/o MS2:N-Methylisoleucine	C7H15NO2	Isoleucine and derivatives	4.77	146.1176	[M+H] ⁺	289	100	False
Fiehn	w/o MS2:Flubendazole	C16H12FN3O3	Benzophenones	5.95	314.0917	[M+H] ⁺	219	98	False
Fiehn	w/o MS2:Levetiracetam	C8H14N2O2	Alpha amino acids and derivatives	5.19	171.1129	[M+H] ⁺	32	100	False
Fiehn	w/o MS2:Glutamine	C5H10N2O3	Alpha amino acids	6.35	147.0763	[M+H] ⁺	7	100	False
Fiehn	w/o MS2:Alanine	C3H7NO2	Alanine and derivatives	5.58	90.05508	[M+H] ⁺	22	100	False
Fiehn	w/o MS2:N-Methyltyrosine	C10H13NO3	Tyrosine and derivatives	6.42	196.0942	[M+Na] ⁺	18	97	False
Fiehn	w/o MS2:4-Acetamidobutyric acid	C6H11NO3	Gamma amino acids and derivatives	6.53	146.0811	[M+NH4] ⁺	760	100	False
Fiehn	w/o MS2:N-Methylphenylalanine	C10H13NO2	Phenylalanine and derivatives	6.60	180.1022	[M+H] ⁺	71	100	False
Fiehn	w/o MS2:N-Isovalerylglycine	C7H13NO3	N-acyl-alpha amino acids	6.78	160.0969	[M+H] ⁺	2905	100	False
Fiehn	w/o MS2:3-Guanidinopropionic acid	C4H9N3O2	Guanidines	6.83	132.0808	[M+NH4] ⁺	78	92	False
Fiehn	w/o MS2:Selegiline	C13H17N	Amphetamines and derivatives	7.26	188.1392	[M+H] ⁺	259	92	False
Fiehn	w/o MS2:5-Hydroxymethylcytidine	C10H15N3O6		7.63	274.1052	[M+H] ⁺	1492	98	False
Fiehn	w/o MS2:Meprobamate	C9H18N2O4	Carbamate esters	7.98	219.134	[M+H] ⁺	725	100	False
Fiehn	w/o MS2:Kynurenine	C10H12N2O3	Alkyl-phenylketones	8.04	209.0897	[M+Na] ⁺	573	97	False
Fiehn	w/o MS2:Ala-Ala	C6H12N2O3	Dipeptides	8.28	161.0922	[M+H] ⁺	2710	100	False
Fiehn	w/o MS2:5-Methoxytryptamine	C11H14N2O	Tryptamines and derivatives	8.37	191.1163	[M+H] ⁺	28	99	False
Fiehn	w/o MS2:2,6-Diaminopimelic acid	C7H14N2O4	Alpha amino acids	8.43	191.1029	[M+Na] ⁺	735	100	False
Fiehn	w/o MS2:Pinacidil	C13H19N5	Pyridines and derivatives	8.89	246.1807	[M+H] ⁺	532	64	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
Fiehn	w/o MS2:Toremifene	C26H28ClNO	Stilbenes	9.03	406.1866	[M+H] ⁺	41	80	False
Fiehn	w/o MS2:Putrescine	C4H12N2	Monoalkylamines	9.15	89.10738	[M+NH4] ⁺	2618	100	False
Fiehn	w/o MS2:Olopatadine	C24H23NO3	Dibenzoxepines	9.15	338.1814	[M+H] ⁺	312	82	False
Fiehn	w/o MS2:3-Aminotyrosine	C9H12N2O3		9.40	197.1009	[M+Na] ⁺	196	68	False
Fiehn	w/o MS2:Physostigmine	C15H21N3O2	Pyrrroloindoles	9.62	276.1668	[M+H] ⁺	1908	93	False
Fiehn	w/o MS2:Fenfluramine	C12H16F3N	Amphetamines and derivatives	9.67	232.1406	[M+H] ⁺	843	62	False
Fiehn	w/o MS2:Famciclovir	C14H19N5O4	Purines and purine derivatives	9.69	322.1543	[M+H] ⁺	659	95	False
All_public	Dodemorph	C18H35NO	Morpholines	0.94	282.2787	[M+H] ⁺	243	57	True
All_public	Unknown (carbon number 13); PlasMA ID-552	C13H16O	Unknown	1.24	189.1238	[M+H] ⁺	302	55	True
All_public	Unknown (carbon number 16); PlasMA ID-799	C16H22	Unknown	1.28	215.1756	[M+H] ⁺	192	71	True
All_public	Unknown (carbon number 7); PlasMA ID-161	C7H11NO2	Unknown	1.39	142.0862	[M+H] ⁺	336	60	True
All_public	N-Methylcytisine	C12H16N2O	Cytisine and derivatives	1.57	227.1024	[M+Na] ⁺	502	62	True
All_public	Unknown (carbon number 13); PlasMA ID-406	C13H16	Unknown	1.77	173.1284	[M+H] ⁺	112	54	True
All_public	2-(methyl(2H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amino)ethanol	C8H11N5O	Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines	2.02	194.1041	[M+H] ⁺	30	82	True
All_public	myrcene	C10H16	Acyclic monoterpenoids	1.75	159.1131	[M+Na] ⁺	220	61	True
All_public	(1S,2R,9R,10S,12S)-12-hydroxy-7,15-diazatetracycloheptadecan-6-one	C15H24N2O2	Sparteine, lupanine, and related alkaloids	2.13	287.1749	[M+Na] ⁺	823	69	True
All_public	3-Phenoxybenzylalcohol; LC-ESI-ITFT; MS2; CE	C13H12O2	Diphenylethers	3.07	201.0919	[M+H] ⁺	19	67	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	2-methyl-4-(pyridin-2-yl)but-3-yn-2-ol	C10H11NO	Pyridines and derivatives	4.31	184.0636	[M+Na]+	4	67	True
All_public	(2R)-6-methylpiperidine-2-carboxylic acid	C7H13NO2	L-alpha-amino acids	4.63	166.0727	[M+Na]+	91	76	True
All_public	5,8a-dimethyl-1-methylidene-3a,4,5,5a,6,7,9,9a-octahydroazuleno [6,7-b]furan-2,8-dione	C15H20O3	Ambrosanolides and secoambrosanolides	4.72	266.1756	[M+NH4]+	219	60	True
All_public	Acetylcholine; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C7H16NO2	Acyl cholines	4.77	146.1176	[M]+	289	71	True
All_public	neoandrographolide	C26H40O8	Diterpene glycosides	5.09	498.306	[M+NH4]+	233	60	True
All_public	Unknown (carbon number 11); PlasMA ID-1663	C11H15N5O4S	Unknown	5.95	314.0917	[M+H]+	219	68	True
All_public	N,N-Diethyl-4-hydroxybenzamide; LC-ESI-QTOF; MS2; [M+H]+; CE	C11H15NO2	Benzamides	5.44	194.1176	[M+H]+	160	76	True
All_public	pregn-4-ene-3,20-dione	C21H30O2	Glucocorticoids, mineralocorticoids, progestogens and derivatives	6.19	337.209	[M+Na]+	7	54	True
All_public	Oroxylin A	C16H12O5	6-O-methylated flavonoids	6.22	307.0441	[M+Na]+	27	63	True
All_public	5-Methylcytosine	C5H7N3O	Hydroxypyrimidines	5.83	126.0665	[M+H]+	9	92	True
All_public	(1s,5s)-1,5-dimethyl-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one	C9H16N2O	Piperidinones	6.05	169.1339	[M+H]+	573	75	True
All_public	3-Methyladenine; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C6H7N5	6-aminopurines	6.11	150.0775	[M+H]+	2812	79	True
All_public	14-deoxy-11,12-dihydroandrographolide	C20H28O4	Diterpene lactones	6.42	355.1868	[M+Na]+	365	65	True
All_public	MMV676588	C15H18N2S	Thienopyridines	6.48	259.1283	[M+H]+	45	53	True
All_public	2-Methylindole	C9H9N	Indoles	6.83	132.0808	[M+H]+	78	81	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	Unknown (carbon number 10); PlasMA ID-169	C10H9N	Unknown	6.83	144.0807	[M+H] ⁺	39	82	True
All_public	Desethyl atrazine; LC-ESI-ITFT; MS2; CE	C6H10CIN5	1,3,5-triazine-2,4-diamines	6.83	188.0706	[M+H] ⁺	14628	81	True
All_public	4-methoxy-9H-xanthen-9-one	C14H10O3	Xanthenes	6.83	227.0787	[M+H] ⁺	1125	56	True
All_public	canthin-6-one	C14H8N2O	Indolonaphthyridine alkaloids	6.83	243.0529	[M+Na] ⁺	868	65	True
All_public	Genipin	C11H14O5	Iridoids and derivatives	6.83	249.0607	[M+Na] ⁺	99	68	True
All_public	Indoline	C8H9N	Indolines	6.92	120.0809	[M+H] ⁺	47990	77	True
All_public	INDOLE	C8H7N	Indoles	6.92	118.0652	[M+H] ⁺	85	80	True
All_public	Koumine	C20H22N2O	3-alkylindoles	6.95	307.187	[M+H] ⁺	316	57	True
All_public	Pyrrolidine; CE10; RWRDLPDLKQPQOW-UHFFFAOYSA-N	C4H9N	Pyrrolidines	7.02	72.08089	[M+H] ⁺	244	82	True
All_public	Unknown (carbon number 6); PlasMA ID-45	C6H11NO	Unknown	7.02	114.0913	[M+H] ⁺	3293	68	True
All_public	N-Acetylputrescine; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C6H14N2O	Carboximidic acids	7.02	131.1181	[M+H] ⁺	41675	93	True
All_public	2-Piperidone; CE10;	C5H9NO	Piperidinones	7.06	100.0757	[M+H] ⁺	110	80	True
All_public	Leucylproline; PlasMA ID-901	C11H20N2O3	Dipeptides	7.08	229.1546	[M+H] ⁺	595	81	True
All_public	PIPERIDINE	C5H11N	Piperidines	7.10	86.0965	[M+H] ⁺	51142	79	True
All_public	Vincandine	C19H20N2O2	Strychnos alkaloids	7.11	309.1657	[M+H] ⁺	1354	56	True
All_public	7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one	C17H14O3	7-O-methylisoflavones	7.14	289.0888	[M+Na] ⁺	597	73	True
All_public	Unknown (carbon number 8); PlasMA ID-690	C8H16N2O4	Unknown	7.49	205.1181	[M+H] ⁺	448	54	True
All_public	haplamine	C15H15NO3	Pyrañoquinolines	7.97	258.1083	[M+H] ⁺	328	64	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	N-Acetylgarginine; CE10; SNEIUMQYRCDYCH-LURJTMIESA-N	C8H16N4O3	N-acyl-L-alpha-amino acids	8.02	217.1298	[M+H] ⁺	4575	81	True
All_public	Ethyl caffeate	C11H12O4	Coumaric acids and derivatives	8.04	209.0897	[M+H] ⁺	573	50	True
All_public	NGC00381347-01.15-acetamido-4-oxohexanoic acid	C8H13NO4	Medium-chain keto acids and derivatives	8.21	188.0915	[M+H] ⁺	303	59	True
All_public	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	C4H7NO2	Alpha amino acids	8.21	102.0549	[M+H] ⁺	587	80	True
All_public	Thermopsine	C15H20N2O	Anagyrine-type alkaloids	8.32	245.1606	[M+H] ⁺	698	67	True
All_public	6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one	C8H6O3	Benzofurans	8.53	151.0479	[M+H] ⁺	33	66	True
All_public	sn-Glycero-3-phosphocholine; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C8H21NO6P	Glycerophosphocholines	8.55	258.1093	[M] ⁺	50	81	True
All_public	Unknown (carbon number 12); PlasMA ID-1416	C12H25N5O3	Unknown	8.59	288.203	[M+H] ⁺	9874	69	True
All_public	securinine	C13H15NO2	Indolizidines	8.63	218.1138	[M+H] ⁺	79	60	True
All_public	1-Isothiocyanoato-8-(methylsulfinyl)-octane; LC-ESI-QTOF; MS2; CE (Z)-7-	C10H19NOS2	Sulfoxides	8.73	234.0971	[M+H] ⁺	669	61	True
All_public	((butyl(methyl)ammonio)methyl)-2-(2,5-dimethoxybenzylidene)-3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-6-olate	C23H27NO5	Aurone flavonoids	8.88	398.203	[M+H] ⁺	478	60	True
All_public	MMV687254	C19H19N3O	Isoquinolines and derivatives	8.95	306.159	[M+H] ⁺	1947	63	True
All_public	Unknown (carbon number 13); PlasMA ID-932	C13H15NO3	Unknown	9.26	234.1094	[M+H] ⁺	120	53	True

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	Primaquine; LC-ESI-QTOF; MS2; [M+H] ⁺ ; CE	C15H21N3O	Aminoquinolines and derivatives	9.32	260.1715	[M+H] ⁺	2468	67	True
All_public	L-(+)-Arginine; LC-ESI-ITFT; MS2; m/z	C6H14N4O2	L-alpha-amino acids	9.40	197.1009	[M+Na] ⁺	196	64	True
All_public	1-(3,4-Dimethoxycinnamoyl)piperidine	C16H21NO3	Cinnamic acids and derivatives	9.62	276.1668	[M+H] ⁺	1908	59	True
All_public	Aminopyrine; LC-ESI-ITFT; MS2; CE	C13H17N3O	Phenylpyrazoles	9.67	232.1406	[M+H] ⁺	843	63	True
All_public	MMV045105	C19H19N3O2	Diphenylethers	9.69	322.1543	[M+H] ⁺	659	59	True
All_public	C14H26N2O3S; PlasMA ID-1579	C14H26N2O3S	Formula predicted	9.76	303.1773	[M+H] ⁺	460	58	True
All_public	w/o MS2:2-hydroxy-1-isopentyl-4-methyl-1H-imidazol-5(4H)-one	C9H16N2O2	Hydantoin	0.93	185.1323	[M+Na] ⁺	89	97	False
All_public	w/o MS2:scareol	C20H36O2	Diterpenoids	0.95	326.3053	[M+H] ⁺	146	100	False
All_public	w/o MS2:MLS001146968-01[(+/-)-DROPROPIZINE	C13H20N2O2		1.17	237.1696	[M+H] ⁺	105	75	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 16); PlasMA ID-1903	C16H31N3O5	Unknown	1.27	346.2382	[M+H] ⁺	94	79	False
All_public	w/o MS2:Ectoine	C6H10N2O2		1.25	143.0815	[M+H] ⁺	219	100	False
All_public	-6-[1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-5-oxoheptan-3-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxyphenyl) prop-2-enoate	C34H38O11	Curcuminoids	1.25	623.2487	[M+H] ⁺	36	100	False
All_public	w/o MS2:2-(1-hydroxyethyl)-4-(2-	C9H14O4	Butenolides	1.52	187.0972	[M+Na] ⁺	152	100	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS:MS. matched
All_public	hydroxypropyl)-2H-furan-5-one 4- methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carboxamido)-3-mercaptopropanamido)-4-oxobutanoic (tert-butyl carbonic) anhydride w/o MS2:Carylophylene Oxide	C25H42N6O9S	Oligopeptides	1.53	625.2668	[M+H] ⁺	315	86	False
All_public	w/o MS2:N-(9-oxodecyl)acetamide	C14H22O	Epoxides	1.52	229.1662	[M+H] ⁺	156	61	False
All_public	w/o MS2:Prolylproline; PlasMA ID-782	C12H23NO2	Acetamides	1.85	236.1127	[M+Na] ⁺	20	100	False
All_public	w/o MS2:MLS000859936-011-(1-Naphthyl)piperazine hydrochloride	C10H16N2O3	Dipeptides	1.87	213.1236	[M+H] ⁺	19	99	False
All_public	w/o MS2:isoguvacine	C14H17ClN2		2.01	213.1386	[M+H] ⁺	12	97	False
All_public	w/o MS2:(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-(1-piperidinyl)-2,4-pentadien-1-one	C6H9NO2	Hydropyridines	1.98	128.0705	[M+H] ⁺	60	100	False
All_public	w/o MS2:Thymol	C17H19NO3	Alkaloids and derivatives	2.77	308.1344	[M+Na] ⁺	7	71	False
All_public	w/o MS2:N-(1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl)-2-((4-oxo-3-phenyl-4H-chromen-7-yl)oxy)acetamide	C10H14O	Aromatic monoterpenoids	3.35	189.0693	[M+H] ⁺	287	99	False
All_public	w/o MS2:2-(2,6-dihydroxy-4-methoxycarbonylbenzoyl)-3-hydroxybenzoic acid	C22H23NO5	Isoflavones	4.85	404.1429	[M+H] ⁺	994	96	False
All_public		C16H12O8	Benzophenones	5.49	350.0864	[M+H] ⁺	26	100	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	w/o MS2:Lovastatin acetylated hydroxylated putative derivative C26H40O6 observed in fungal symbiont H	C26H40O7		4.62	482.3114	[M+H] ⁺	310	99	False
All_public	w/o MS2:3-Amino-Beta-Pinene	C10H18CIN	Bicyclic monoterpenoids	4.92	188.128	[M+NH4] ⁺	1516	73	False
All_public	w/o MS2:Gossypetin	C15H10O8	Flavonols	5.75	336.0701	[M+H] ⁺	29	99	False
All_public	w/o MS2:MMV202458	C17H18CINO3		5.75	320.0959	[M+Na] ⁺	5	78	False
All_public	4-hydroxy-3,3,5-trimethyl-4-[(E)-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]cyclohexan-1-one	C19H32O8	Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides	5.84	406.2444	[M+H] ⁺	116	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 7); PlasMA ID-68	C7H9NO	Unknown	5.29	124.0757	[M+H] ⁺	80	100	False
All_public	w/o MS2:alpha-Estradiol	C18H24O2	Estrogens and derivatives	5.33	255.1706	[M+H] ⁺	37	93	False
All_public	w/o MS2:NCGC00380116-01! 2-hexyl-3-hydroxypentanedioic acid	C11H20O5	Medium-chain hydroxy acids and derivatives	5.40	250.1649	[M+H] ⁺	125	100	False
All_public	w/o MS2:MMV676048	C16H18Cl2N2O	Benzylethers	6.41	325.0877	[M+Na] ⁺	84	100	False
All_public	w/o MS2:Glyphosat [M+Na ⁺]	C3H8NO5P	Alpha amino acids and derivatives	6.41	192.0105	[M+H] ⁺	12	81	False
All_public	w/o MS2:MLS002172470-01! SKF-86466 hydrochloride	C11H15Cl2N		6.42	196.0942	[M+Na] ⁺	18	100	False
All_public	w/o MS2:(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[4-(4-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexen-1-	C19H34O7	Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides	5.63	392.2644	[M+H] ⁺	684	100	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	yl)butan-2-yloxy] oxane-3,4,5-triol _(2E)-2-(Hydroxymethyl)-3- [(1R,6R)-3-(hydroxymethyl) -6-isopropyl-2-cyclohexen-1-yl]acrylic acid w/o MS2: NCGC00381440-01! (2S,3S)-3-decyl-2-hydroxy-2-(3-methoxy-3-oxopropyl) butanedioic acid	C14H22O4	Menthane monoterpenoids	6.50	237.1444	[M+H] ⁺	128	94	False
All_public	w/o MS2: NCGC00381440-01! (2S,3S)-3-decyl-2-hydroxy-2-(3-methoxy-3-oxopropyl) butanedioic acid	C18H32O7	Tricarboxylic acids and derivatives	5.86	378.249	[M+H] ⁺	492	100	False
All_public	w/o MS2: Nardosinone	C15H22O3	Sesquiterpenoids	6.00	251.1606	[M+H] ⁺	124	100	False
All_public	w/o MS2: Euphoractine S from S.guyanensis w/o MS2: 2-Methyl-4-amino-6-methoxy-s-triazine; LC-ESI-ITFT; MS2; CE	C20H28O5	Cyclohexenones	6.13	348.202	[M+H] ⁺	138	88	False
All_public	w/o MS2: 3-HYDROXY-4-(SUCCIN-2-YL) -CARYOLANE delta-LACTONE	C5H8N4O	2-methoxy-1,3,5-triazines	6.28	141.0773	[M+H] ⁺	10	100	False
All_public	w/o MS2: 3-HYDROXY-4-(SUCCIN-2-YL) -CARYOLANE delta-LACTONE	C19H28O4	Delta valerolactones	6.47	321.2021	[M+H] ⁺	36	93	False
All_public	w/o MS2: Trigonelline Hydrochloride	C7H8ClNO2	Pyridinecarboxylic acids	6.59	174.0385	[M+H] ⁺	51	70	False
All_public	w/o MS2: Pseudoephedrine	C10H15NO	Phenylpropanes	6.61	166.1075	[M+H] ⁺	107	86	False
All_public	w/o MS2: GUAIAZULENE	C15H18	Guaianes	6.73	216.1711	[M+H] ⁺	594	94	False
All_public	w/o MS2: icos-19-ene-1,2,4-triol	C20H40O3	Long-chain fatty alcohols	6.75	367.2597	[M+NH4] ⁺	402	99	False
All_public	w/o MS2: MMV676444	C19H27N3O3	Benzodioxoles	6.75	346.2086	[M+H] ⁺	428	93	False
All_public	w/o MS2: MLS001075531-01!	C22H25N3O3		6.76	380.1934	[M+H] ⁺	85	94	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	w/o MS2:2-(3-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazole	C11H12ClNO	Chlorobenzenes	6.92	210.0504	[M+H] ⁺	6052	63	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 12); PlasMA ID-1142	C12H21NO5	Unknown	7.07	260.1491	[M+Na] ⁺	30931	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 7); PlasMA ID-165	C7H14N2O	Unknown	7.21	143.1178	[M+H] ⁺	430	100	False
All_public	w/o MS2: (3S,8aS)-3-[(1R)-1-Hydroxyethyl]hexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione	C9H14N2O3	Alpha amino acids and derivatives	7.35	199.1081	[M+H] ⁺	1009	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 14); PlasMA ID-1471	C14H20N4O3	Unknown	7.40	293.1604	[M+H] ⁺	369	100	False
All_public	w/o MS2:Alibendol	C13H17NO4	Salicylamides	7.63	274.1052	[M+H] ⁺	1492	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 14); PlasMA ID-1127	C14H15N3O2	Unknown	7.70	258.1314	[M+H] ⁺	34541	100	False
All_public	w/o MS2:PYRIDOXINE	C8H11NO3	Pyridoxines	8.04	187.108	[M+H] ⁺	1590	100	False
All_public	w/o MS2: NCGC00160331-01: 2-Methyl-naphtho [1,2,3-de]quinolin-8-one	C17H11NO	Anthracenes	8.05	246.0948	[M+H] ⁺	263	96	False
All_public	w/o MS2:MLS002153167-01 ISQ 22,53617318-31-9	C9H11N5O		8.20	206.1025	[M+Na] ⁺	4271	100	False
All_public	w/o MS2:[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] 3,4,5-trimethoxybenzoate	C16H22O10	Hydrolyzable tannins	8.24	392.1479	[M+H] ⁺	761	78	False
All_public	w/o MS2:Cefoselis sulfate	C19H24N8O10S3	Cephalosporins	8.35	262.0685	[M+H] ⁺	80	86	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS/MS matched
All_public	w/o MS2:MLS001140391-01! w/o MS2:Unknown (carbon number 7); Plasma ID-532	C23H20ClN3O2		8.37	406.1319	[M+Na]+	65	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 7); Plasma ID-532	C7H9NO3S	Unknown	8.49	188.0353	[M+H]+	2588	95	False
All_public	w/o MS2:2-hydroxyacetanilide	C8H9NO2	Acetanilides	8.49	190.0311	[M+H]+	141	90	False
All_public	w/o MS2:MMV026550	C20H23N3O	Diphenylmethanes	8.58	322.187	[M+H]+	1690	91	False
All_public	w/o MS2:NGC00380284-01!N-(5-acetamidopentyl)acetamide	C9H18N2O2	Acetamides	8.73	187.1444	[M+NH4]+	491	100	False
All_public	w/o MS2:Unknown (carbon number 13); Plasma ID-424	C13H18	Unknown	8.97	175.1443	[M+H]+	40	93	False
All_public	w/o MS2:MLS000881142-01!Rocornal	C10H15N5		9.03	206.1517	[M+2H]2+	5351	80	False
All_public	w/o MS2:! [(9R,10R)-10-acetyloxy-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydropyrano [2,3-f]chromen-9-yl] 2-methylbutanoate	C21H24O7	Angular pyranocoumarins	9.03	406.1866	[M+H]+	41	100	False
All_public	w/o MS2:4-hydroxy-2-octylquinoline 1-oxide:Series 4 HAQ C8	C17H23NO2	4-hydroxy-2-alkylquinolines	9.05	274.187	[M+H]+	1082	89	False
All_public	w/o MS2:Nakijiquinone B	C26H37NO5		9.06	444.2805	[M+H]+	19	86	False
All_public	w/o MS2:Triglyme	C8H18O4	Dialkyl ethers	9.07	179.1285	[M+2H]2+	434	100	False
All_public	w/o MS2:14-(hydroxymethyl)-5,9-dimethyltricyclo[11.2.1.0??.0??.?] hexadecan-5-ol	C19H32O2	Kaurane diterpenoids	9.14	331.2088	[M+H]+	236	86	False

Librería	Nombre	Fórmula	Ontología	RT (min)	Precursor m/z	Aducto	S.N.	Total score	MS:MS. matched
All_public	w/o MS2:MLS001240193-01! 1-(2,3-Dihydrobenzo[1,4]dioxin-6-yl)-3-(3-phenyl-pyrrolidin-1-yl)propan-1-one	C21H24ClNO3		9.15	338.1814	[M+H] ⁺	312	97	False
All_public	w/o MS2:C11H14O4; PlaSMA ID-583	C11H14O4	Formula predicted	9.37	193.0822	[M+H] ⁺	570	96	False
All_public	w/o MS2:Indole-3-acetyl-L-isoleucine; PlaSMA ID-1429	C16H20N2O3	Amino acids	9.76	289.1613	[M+H] ⁺	612	80	False
MassBank	Metamitron-desamino; LC-ESI-ITFT; MS2; CE	C10H9N3O	1,2,4-triazines	8.21	188.0915	[M+H] ⁺	303	52	True
MassBank	2'-Deoxyadenosine; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C10H13N5O3	Purine 2'-deoxyribonucleosides	8.80	252.1079	[M+H] ⁺	920	55	True
MassBank	w/o MS2:10'-Apozeaxanthinal; FAB-EBEB; MS2; m/z	C27H36O2	Sesterterpenoids	5.63	392.2644	[M+H] ⁺	684	80	False
MassBank	w/o MS2:Chalcone; LC-ESI-QTOF; MS2; CE	C15H12O	Retrochalcones	8.04	209.0897	[M+Na] ⁺	573	81	False

Anexo II.

Código desarrollado para el tratamiento de datos del Capítulo 4.

R Notebook

Este código ha sido desarrollado en enero de 2022 por Jesús Nicolás Carcelén durante su tesis doctoral (2017-2022) en la Universidad de Oviedo para el tratamiento de datos de alta resolución-metabolómica con compuestos naturales y sus análogos marcados en 15N, identificados con los software MetExtract II y MSDIAL.

Este código es de acceso libre. Las funciones y la gramática que se emplea para los paquetes y librerías empleadas es la establecida para la versiones que aplican en este momento.

El código ha sido desarrollado con siguiendo Buenas Prácticas de Código.

Sección 1: Instalación y carga de paquetes de trabajo—

```
cat("\014") #limpieza de la consola

rm(list=ls())
#limpieza del espacio de trabajo

getwd()
#obtener dirección (carpeta) de trabajo

#Instalación y carga de paquetes

install.packages("data.table")
#este paquete estructura tablas

install.packages("dplyr")
#este paquete se emplea para transformar datos y manipular tablas

install.packages("string")
#este paquete identifica elementos (texto, signos, etc) #y opera con ellos

install.packages("tibble")
#este paquete permite cambiar columnas de sitio #y añadir las en diferentes posiciones

install.packages("ggplot2")
#este paquete se emplea para generar y transformar gráficas

install.packages("enviPat")
#este paquete se emplea para calcular la masa exacta de las moléculas

install.packages("ggpmisc") #este paquete es complementario a ggplot2 y amplía sus capacidades

library(data.table)
```



```
library(dplyr)
library(stringr)
library(tibble)
library(ggplot2)
library(enviPat)
library(ggpmisc)
data("adducts")
data("isotopes")
```

Sección 2: Preparación de tablas de datos MSDIAL —

Cargar tablas con las que se va a trabajar y funcionalizar como tablas de datos

```
table_nat_pos<-read.delim("C:/Users/sergy/OneDrive/Escritorio/Nat_met_pos_dd1_02.txt", sep="")
table_nat_pos2<-read.delim("C:/Users/sergy/OneDrive/Escritorio/Nat_met_pos_dd1_new_01.txt", sep="")
table_nat_pos<-as.data.table(table_nat_pos)
table_nat_pos2<-as.data.table(table_nat_pos2)
```

Se juntan las dos tablas de compuestos naturales detectados en ionización positiva

```
table_nat_pos<-merge.data.table(table_nat_pos, table_nat_pos2, all = T)
```

Se añade una columna con la polaridad empleada en la detección

```
table_nat_pos<-cbind(Ionization=paste0("Positive"), table_nat_pos)
```

Sección 3: Tratamiento de datos de MSDIAL —

Operaciones sobre las tablas de MSDIAL:

Primer filtro: Se eliminan compuestos no identificados en las tablas de compuestos naturales

Segundo filtro: Se eliminan aquellos compuestos que no tengan espectro de fragmentación

```
table_nat_pos<-table_nat_pos[Title!="Unknown"]
table_nat_pos<-filter(table_nat_pos, MSMS.spectrum>0)
```

Se redondean los valores de mz natural

```
round<-round(table_nat_pos$Precursor.m.z, 0)
table_nat_pos$Precursor.m.z<-round
```

Por orden:

Obtener lista "N" con booleanos: ¿Contienen los elementos de la columna "Formula" "N"?

Añadir columna (lista de booleanos generada) a la tabla

Eliminar de la tabla los elementos de la columna donde N=FALSE

Obtener lista "N°N" con los números a la derecha del símbolo N para cada formula

Transformar los NA de esa lista en 1

Convertir los elementos de la lista en números

Añadir columna (lista del número de N) a la tabla

Obtener una lista con los valores de la suma de "N°N" y los iones precursores

Añadir columna (lista con los valores de mz del compuesto marcado en 15N)

```
N<-str_detect(table_nat_pos$Formula, "N")
table_nat_pos<-add_column(table_nat_pos, N, .before = "Formula")
table_nat_pos<-table_nat_pos[N!="FALSE"]
N°N<-str_extract(table_nat_pos$Formula, "(?<=N)\\d+")
N°N[is.na(N°N)]<-1
N°N<-as.numeric(N°N)
table_nat_pos<-add_column(table_nat_pos, N°N, .after = "Formula")

mz_lab<-table_nat_pos$Precursor.m.z[ ] + table_nat_pos$N°N
table_nat_pos<-add_column(table_nat_pos, mz_lab, .after = "Precursor.m.z") #Estas dos líneas se pueden
simplificar usando mutate()
```

Sección 4: Tratamiento de datos de MetExtract—

Se cargan las tablas de MetExtract

Se seleccionan las columnas de interés

Se redondean las masas nat y lab para el cribado

```
table_MetExtract<-read.delim("C:/Users/sergy/OneDrive/Escritorio/lista metextract positiva.csv", sep=";")
table_MetExtract<-select( table_MetExtract, "mz_nat"=Mass.nat..m.z, "mz_lab"=Mass.lab..m.z, Start..min.,
End..min.)
round<-round(table_MetExtract$mz_nat, 0)
table_MetExtract$mz_nat<-round
round<-round(table_MetExtract$mz_lab, 0)
table_MetExtract$mz_lab<-round
table_MetExtract<-distinct(table_MetExtract, mz_nat, mz_lab, .keep_all = TRUE)
```

Sección 5: Comparación MetExtract con MSDIAL. Fusión de tablas—

Generar una lista con booleanos que indicant si el elemento i de `mz_nat` (MetExtract) se encuentra en `Precursor.m.z` de `table_nat_pos`

Se añade una columna en `table_MetExtract` con la lista de booleanos

Se eliminan de la tabla aquellas filas donde el booleano es Falso

(o sea, ese valor de `mz_nat` de MetExtract no se encuentra en `mz_nat` de `table_nat_pos`)

```
IN<-table_MetExtractmznatPrecursor.m.z
table_MetExtract<-cbind("IN"=IN, table_MetExtract)
table_MetExtract<-as.data.table(table_MetExtract)
table_MetExtract<-table_MetExtract[IN!="FALSE"]
```

comprobante: ¿están los valores de `precursor.m.z` en `mz_nat`? TRUE

comprobante: ¿están los valores de `mz_nat` en `precursor.m.z`? TRUE

```
table_nat_posPrecursor.m.zmz_nat
table_MetExtractmznatPrecursor.m.z
```

Se fusiona `table_nat_pos` y `table_MetExtract`

(Estas tablas se fusionan teniendo en cuenta los valores de `mz_nat` y `mz_lab`. En la tabla solo estarán presentes las filas de `table_nat_pos` que cuyos `mz_nat` y `mz_lab` (pareados) también estén pareados en `table_MetExtract`

```
table_nat_pos<-inner_join(table_nat_pos, table_MetExtract, by=c("Precursor.m.z"="mz_nat", "mz_lab"))
```

Se genera una lista de booleanos que indican si el elemento i de `RT..min` (`table_nat_pos`) es mayor que el `Start..min` y, además, si ese valor es menor que `End..min`

Nota: `Start..min` y `End..min` son los valores de tiempo de retención de MetExtract

```
rt_match<-table_nat_posRT..min.> tablenatposStart..min.& table_nat_posRT..min.< tablenatposEnd..min.
```

Se añade una columna en `table_nat_pos` con la lista de booleanos

Se eliminan de la tabla las filas donde el booleano es Falso

(Ese valor de `RT..min` no se encuentra en el rango de MetExtract por lo tanto ese compuesto identificado en MSDIAL no está dentro de la lista MetExtract y se elimina porque solo los compuestos presentes en la lista MetExtract tienen un espectro de fragmentación para el análogo marcado que es lo que en última estancia va a dar la identificación)

```
table_nat_pos<-cbind(table_nat_pos, "RT.match"=rt_match)
table_nat_pos<-table_nat_pos[RT.match!="FALSE"]
table_nat_pos<-distinct(table_nat_pos)
```

Sección 6: Tratamiento de datos de compuestos marcados—

se cargan los datos LC-HRMS de compuestos marcados fragmentados

se pone en formato tabla

se seleccionan solo los mz que presenten espectro de fragmentación

se reduce la tabla para que contenga solo RT.min, mz_lab y MSMS.spectrum

```
table_lab_pos<-read.delim("C:/Users/sergy/OneDrive/Escritorio/Lab_met_pos_dd1_02.txt", sep="")
```

```
table_lab_pos<-as.data.table(table_lab_pos)
```

```
table_lab_pos<-filter(table_lab_pos, MSMS.spectrum>0)
```

```
table_lab_pos<-select(table_lab_pos, RT.min., "mz_lab"=Precursor.m.z, MSMS.spectrum)
```

Se redondean los valores de mz para su posterior comparación

```
round<-round(table_lab_pos$mz_lab, 0)
```

```
table_lab_pos$mz_lab<-round
```

Sección 7: Comparación de MSDIAL con compuestos marcados—

Se fusiona table_nat_pos y table_lab_pos

(Esta tabla se fusiona teniendo en cuenta los valores de mz_lab en la tabla se duplicarán algunas filas de table_nat_pos, pues el tipo de fusión hace que si una fila con una mz_lab (table_nat) tiene -n- filas con el mismo mz_lab en la tabla_lab, se generen -n- filas nuevas

```
full_join<-inner_join(table_nat_pos, table_lab_pos, by="mz_lab")
```

Se genera una lista de booleanos que indicant si el elemento i de RT.min (proveniente de table_lab_pos) es mayor que el Start..min y, además, si ese valor es menor que End..min

Nota: Start..min y End..min son los valores de tiempo de retención de MetExtract

```
rt_match<-full_joinRT.min.> full_oinStart..min.& full_joinRT.min.< full_oinEnd..min.
```

Se añade la lista de booleanos en una columna de table_nat_pos

Se eliminan de la tabla aquellas filas donde el booleano es Falso

(o sea, ese valor de RT.min (lab) no se encuentra en el rango de MetExtract, por lo tanto, ese compuesto supuestamente marcado no está dentro de la lista MetExtract)

```
full_join$RT.match<-rt_match
```

```
full_join<-full_join[RT.match!="FALSE"]
```

Sección 8: Obtención de aductos y masa teórica exacta—

Se genera una tabla con los pesos moleculares de cada compuesto

se obtiene la masa de los aductos

se añaden esos valores a la tabla general

```
non_H_adduct<-full_join[Adduct!="[M+H]+"]
H_adduct<-anti_join(full_join, non_H_adduct, by="Adduct")
non_Na_adduct<-non_H_adduct[Adduct!="[M+Na]+"]
Na_adduct<-anti_join(non_H_adduct, non_Na_adduct, by="Adduct")
tab<-check_chemform(isotopes, H_adduct$Formula)
H_adductmonoisotopicmassnat < -tabmonoisotopicmass[]+1.007825
H_adductmonoisotopicmasslab < -HadductNoN*0.997035+ tab$monoisotopicmassnat
tab_Na<-check_chemform(isotopes, Na_adduct$Formula)
Na_adductmonoisotopicmassnat < -tabNaamonoisotopicmass[]+22.989769
Na_adductmonoisotopicmasslab < -NaadductNoN*0.997035+ tab_Na$monoisotopicmassnat
non_Na_adduct<-non_Na_adduct[2]
tab_choline<-check_chemform(isotopes, non_Na_adduct$Formula)
non_Na_adductmonoisotopicmassnat < -tabcholinemonoisotopicmass[]
non_Na_adductmonoisotopicmasslab < -nonNaaadductNoN*0.997035+ tab_choline$monoisotopicmassnat
full_join<-full_join(H_adduct, Na_adduct)
full_join<-full_join(full_join, non_Na_adduct)
```

Sección 9: Separación de resultados únicos y duplicados—

Se genera una lista de booleanos que indican si el nombre I de las diferentes filas de la tabla se encuentra duplicado

```
duplicidades<-duplicated(full_joinTitle)|duplicated(full_joinTitle, fromLast = TRUE)
```

Se añade una columna con la lista de booleanos

Se genera una tabla donde se encuentran aquellos elementos que en el booleano son FALSE (no están repetidos)

se genera una tabla donde se encuentran aquellos elementos que en el booleano son TRUE

```
full_join<-cbind(Duplicado=duplicidades, full_join)
full_join_unique<-full_join[Duplicado!=TRUE]
full_join_duplicated<-full_join[Duplicado!=FALSE]
```

Sección 10: Representación de espectros de fragmentación—

Script para representar espectros de masa enfrentados de compuestos naturales y marcados, donde la intensidad de las señales está normalizada respecto a todas las áreas para cada compuesto

```
a<-full_join
```

```
b=58 ### b es el número de la fila a representar
```

```
vnat<-a$MSMS.spectrum.y[b] vnat<-strsplit(vnat, " ") dfnat<-data.frame(vnat) names(dfnat)[1]<-"mz!"  
dfnat<-data.frame(strsplit(dfnat$mz!, ":")) dfnat<-as.data.frame(t(dfnat)) names(dfnat)[1]<-"mz"  
names(dfnat)[2]<-"Intensity" dfnatmz<-as.numeric(dfnatmz)dfnatIntensity <  
-as.numeric(dfnatIntensity) dfnat<-data.table(dfnatmz, dfnatIntensity) names(dfnat)[1]<-"mz"  
names(dfnat)[2]<-"Intensity" dfnat<-mutate(dfnat, rel.intensity = Intensity/max(dfnatIntensity) *  
100)dflab <-filter(dfnat, rel.intensity > 14)dflabrel.intensity<-dflab$rel.intensity dflab<-  
cbind(Type="LAB", dflab)
```

```
vnat<-a$MSMS.spectrum.x[b] vnat<-strsplit(vnat, " ") dfnat<-data.frame(vnat) names(dfnat)[1]<-"mz!"  
dfnat<-data.frame(strsplit(dfnat$mz!, ":")) dfnat<-as.data.frame(t(dfnat)) names(dfnat)[1]<-"mz"  
names(dfnat)[2]<-"Intensity" dfnatmz<-as.numeric(dfnatmz)dfnatIntensity <  
-as.numeric(dfnatIntensity) dfnat<-data.table(dfnatmz, dfnatIntensity) names(dfnat)[1]<-"mz"  
names(dfnat)[2]<-"Intensity" dfnat<-mutate(dfnat, rel.intensity = Intensity/max(dfnatIntensity)*100) dfnat<-  
filter(dfnat, rel.intensity>14) dfnat<-cbind(Type="NAT", dfnat)
```

```
mix<-rbind(dfnat, dflab) round<-round(mixmz, 0)mixmz<-round round<-  
round(mixrel.intensity, 0)mixrel.intensity<-round
```

```
mix<-mix %>%group_by(Type) %>% group_by(mz) %>% slice_max(abs( rel.intensity), n=1, with_ties = FALSE)  
mix<-select(mix, Type, mz, rel.intensity)
```

```
g<-ggplot(mix, aes(mz, rel.intensity, colour=Type))+ labs(title=paste0(a$Title[b], " mz=", a$Precursor.m.z[b], "  
N=", a$N°N[b]))+ geom_col()+ theme_bw()+ annotate(geom="table", x = 40, y = 100, label = list(mix))
```

```
### para observar la gráfica hay que ejecutar la gráfica, en este caso "g"
```

```
g
```

Aquí termina el código.