

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Dpto. Química Física y Analítica**

**Programa de Doctorado**

**Química Física y Analítica**

**MEDIDA DE RELACIONES ELEMENTALES  
E ISOTÓPICAS MEDIANTE ICP-QQQ:  
APLICACIONES ANALÍTICAS**

**TESIS DOCTORAL**

**SILVIA DIEZ FERNÁNDEZ**

**Oviedo, 2017**









***A C. R. D.***



*“Ningún mar en calma hizo experto a un marinero”*



**LISTADO DE ABREVIATURAS**

A continuación, se detallan las abreviaturas utilizadas a lo largo del texto. Si el acrónimo utilizado corresponde a un término en inglés, se incluirá primero el significado en dicho idioma y, a continuación, en español.

**Del al.:** del alemán en el original.

**Del gr.:** del griego en el original.

**Del ingl.:** del inglés en el original.

**1-D electroforesis:** Electroforesis en gel de una dimensión.

**2-D electroforesis:** Electroforesis en gel de dos dimensiones.

**ACN:** Acetonitrilo.

**ADI:** *Ambient Desorption/Ionization*. Desorción/ionización ambiental.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ATP:** *Adenosine TriPhosphate*. Adenosín trifosfato.

**AQUA:** Estrategia de cuantificación absoluta de proteínas.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** ARN mensajero.

**capHPLC:** HPLC capilar.

**CC:** *Collision Cell*. Celda de colisión

**CE:** *Capillary Electrophoresis*. Electroforesis capilar.

**CI:** *Chemical Ionization*. Ionización química.

**CID:** *Collision-Induced Dissociation*. Disociación inducida por colisión.

**Cps:** *Counts per second*. Cuentas por segundo

**CR:** *Reaction Cell*. Celda de reacción.

**CRC:** *Collision-Reaction Cell*. Celda de colisión-reacción

**CRI:** *Collision Reaction Interface*. Interfase de colisión-reacción.

**d.i.:** diámetro interno.

**d.e.:** diámetro externo.

**Da:** Dalton (unidad de masa atómica).

**DF:** *Double Focusing*. Doble enfoque.

**DOTA:** *1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic acid*. Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N''' tetraacético.

**DRC:** *Dynamic Reaction Cell*. Celda de reacción dinámica.

**ECAT:** *Element-Coded Affinity Tag*. Marcaje de afinidad con elementos.

**EI:** *Electronic Ionization*. Ionización Electrónica.

**ELISA:** *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*. Ensayo de inmunoabsorción enzimática

**EM:** *Electron Multiplier*. Multiplicador de electrones.

**ESA:** *Electro-Static Analyzer*. Analizador electro-estático.

**ESI:** *Electro-Spray Ionization*. Ionización por electrospray.

**FAAS:** *Flame Atomic Absorption Spectrophotometry*. Espectrofotometría de absorción atómica de llama.

**FAB:** *Fast Atom Bombardment*. Bombardeo rápido de átomos.

**FIA:** *Flow Injection Analysis*. Análisis por inyección en flujo.

**GC:** *Gas Chromatography*. Cromatografía de gases.

**GD:** *Glow Discharge*. Descarga luminiscente.

**GFAAS:** *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry*. Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography*. Cromatografía de líquido de alta resolución.

**HR:** *High Resolution*. Alta resolución.

**ICAT:** *Isotope-Coded Affinity Tag*. Marcaje por afinidad con codificación isotópica.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

**ICP:** *Inductively-Coupled Plasma*. Plasma de acoplamiento inductivo.

**ID:** *Isotope Dilution*. Dilución Isotópica.

**IMAC:** *Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.

**iTRAQ:** *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*. Marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa.

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**KED:** *Kinetic Energy Discrimination*. Discriminación por energía cinética.

**LA:** *Laser Ablation*. Ablación láser.

**LC:** *Liquid Chromatography*. Cromatografía de líquidos.

**LD:** Límite de detección.

**m.a.:** millones de años.

**m/z:** *mass to charge ratio*. Relación masa-carga.

**MALDI:** *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*. Desorción ionizante con láser asistida por matriz.

**MC:** *Multicollector*. Multicolector.

**MOAC:** *Metal Oxide Affinity Chromatography*. Cromatografía de afinidad de óxidos metálicos.

**MS:** *Mass Spectrometry*. Espectrometría de masas.

**MS/MS:** *Tandem Mass Spectrometry*. Espectrometría de masas en tándem.

**MW:** *Molecular Weight*. Peso molecular.

**OES:** *Optical Emission Spectroscopy*. Espectrometría de emisión óptica.

**ORC/ORS:** *Octapole Reaction Cell/Octapole Reaction System*. Celda de reacción de octapolo/Sistema de reacción de octapolo.

**P:** Presión.

**Pa:** Pascal (unidad de presión, Pa=kg/m s<sup>2</sup>)

**PASTA:** *Phosphorus-based absolutely quantified standard peptides*. Péptidos patrones cuantificados de forma absoluta a través del fósforo.

**PFA:** *PerFluoroAlkoxy (polimer)*. Perfluoroalcoxi (polímero).

**PhIAT:** *Phosphoproteins Isotope coded Affinity Tags*. Marcaje de afinidad isotópica diferencial para fosfoproteínas.

**PIP:** *Peptide Intensity Profiling*. Perfiles de identidad de péptidos.

**PTM:** *Post-Translational Modification*. Modificación post-traducciona.

**Q:** *Quadrupole*. Cuadrupolo.

**QconCAT:** Estrategia de multiplexión para cuantificación absoluta de proteínas mediante concatenación de péptidos.

**QQQ:** *Triple Quadrupole*. Triple cuadrupolo.

**R:** Resolución.

**RF:** Radiofrecuencia.

**RP:** *Reversed-Phase*. Fase reversa.

**RSD:** *Relative Standard Deviation*. Desviación estándar relativa.

**SA:** Sensibilidad en abundancia.

**SD:** *Standard Deviation*. Desviación estándar.

**SEC:** *Size Exclusion Chromatography*. Cromatografía de exclusión por tamaños.

**(p)Ser:** *(phosphorylated) Serine*. Serina (fosforilada).

**SF:** *Sector Field*. Sector magnético.

**SI(MS):** *Secondary ions (mass spectrometry)*. (Espectrometría de masas de) iones secundarios

**SIL:** *Stable Isotope Labelling*. Marcaje con isótopos estables.

**SILAC:** *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*. Marcaje de aminoácidos con isótopos estables en cultivos celulares.

**SQ:** *Single Quadrupole*. Analizador de cuadrupolo único.

**Th:** Thompson (unidad de m/z).

**(p)Thr:** *(Phosphorylated) Threonine*. Treonina (fosforilada).

**TI:** *Thermal Ionization*. Ionización térmica.

**(p)Tyr:** *(Phosphorylated) Tyrosine*. Tirosina (fosforilada).

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

**TOF:** *Time-Of-Flight*. Tiempo de vuelo.

**u:** Unidad de masa atómica.



# **ÍNDICE**



## **ÍNDICE**

ÍNDICE.....	20
A. INTRODUCCIÓN.....	1
A.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS. ....	5
A.1.1. Conceptos. ....	5
A.1.2. Contexto histórico: El origen de la espectrometría de masas. ....	6
A.1.3. Estructura básica de un espectrómetro de masas.....	9
A.1.4. La espectrometría de masas elemental: ICP-MS. ....	12
A.1.4.1. Diagrama básico de un ICP-MS. ....	13
A.1.4.1.1. Introducción de muestra y generación del plasma <sup>18-21</sup> ...	13
A.1.4.1.2. Interfase y extracción de iones. ....	14
A.1.4.1.3. Región de análisis.....	15
A.1.4.1.3.1. Resolución y sensibilidad en abundancia.....	17
A.1.4.2. Las interferencias en ICP-MS: interferencias espectrales y no espectrales.....	20
A.1.4.3. Estrategias de eliminación y/o reducción de las interferencias en ICP-MS: interferencias espectrales. ....	22
A.1.4.3.1. Estrategias previas al análisis.....	23
A.1.4.3.2. Estrategias posteriores al análisis. ....	23
A.1.4.3.3. Estrategias metodológicas simultáneas a la medida analítica.....	24
A.1.4.3.3.1. Las celdas de colisión/reacción.....	25
A.1.4.3.3.2. El DF-ICP-MS.....	28
A.1.4.3.3.3. El ICP-QQQ. ....	30
A.1.5. Bibliografía. ....	37
A.2. PROTEÓMICA. ....	43

A.2.1. Contexto histórico.....	43
A.2.2. Cuando la información genética se traduce: la complejidad del proteoma.....	45
A.2.2.1. Las modificaciones post-traduccionales.....	46
A.2.2.1.1. La fosfoproteómica.....	47
A.2.3. El estudio del proteoma.....	48
A.2.3.1. Métodos tradicionales.....	49
A.2.3.2. La espectrometría de masas molecular.....	52
A.2.4. Análisis cuantitativo del proteoma.....	54
A.2.4.1. Cuantificación relativa.....	55
A.2.4.2. Cuantificación absoluta.....	57
A.2.5. El papel del ICP-MS en la proteómica.....	58
A.2.5.1. Sistemas de separación y caracterización acoplados a ICP-MS.....	61
A.2.6. Perspectivas.....	62
A.2.7. Bibliografía.....	63
A.3. PALEOCEANOGRAFÍA.....	69
A.3.1. Contexto histórico, biológico y geológico.....	69
A.3.1.1. Origen, distribución y registro fósil.....	70
A.3.2. La química de los carbonatos: biomineralización y reparto iónico.....	71
A.3.2.1. Las relaciones X/Ca.....	73
A.3.3. El enfoque analítico.....	74
A.3.4. Perspectivas.....	76
A.3.5. Bibliografía.....	78

B. OBJETIVOS/objectives.....	81
B.1. OBJETIVOS.....	83
B.2. OBJECTIVES. ....	85
C. EXPERIMENTAL.....	87
C.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	89
C.1.1. Espectrómetro de masas atómico. ....	89
C.1.2. Espectrómetro de masas molecular.....	92
C.1.3. Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas. ....	92
C.1.4. Otra instrumentación.....	93
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	95
D.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA GENÉRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE (FOSFO)PÉPTIDOS SIN PATRONES ESPECÍFICOS BASADA EN ICP-QQQ.....	97
D.1.1. Introducción.....	97
D.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS SIN PATRONES ESPECÍFICOS MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA POST-COLUMNA.....	101
D.2.1. Introducción.....	101
D.3. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN GLOBAL Y ESPECÍFICO EN FOSFOPROTEÍNAS MEDIANTE RELACIONES P/S.....	105
D.3.1. Introducción.....	105
D.4. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE RELACIONES B/CA A BAJA CONCENTRACIÓN EN CARBONATOS DE ORIGEN BIOGÉNICO. ....	109
D.4.1. Introducción.....	109
E. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS .....	113

E.1. CONCLUSIONES. ....	115
E.2. CONCLUSIONS. ....	117
G. RELACIÓN DE PUBLICACIONES.....	119



# **A. INTRODUCCIÓN**



*"Give a boy a hammer, and he will find that everything he encounters needs pounding"*

*Abraham Kaplan*



## **A.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

### **A.1.1. Conceptos.**

#### *Definición*

La *Espectrometría de Masas (MS)* se define como el estudio de la materia a través de la formación de iones en fase gaseosa que son detectados y están caracterizados por su masa y carga<sup>1</sup>. Una de las grandes ventajas de este conjunto de técnicas es la amplia aplicabilidad de las mismas, ya que proporcionan información tanto cualitativa como cuantitativa de las especies en muestras complejas, además de información sobre la estructura molecular de moléculas complejas. Además, pueden proporcionar información sobre la composición isotópica, así como de la estructura de superficies sólidas<sup>2</sup>.

#### *Unidades de masa atómica y molecular*

Aunque las masas atómicas y moleculares se suelen expresar en términos de *unidades de masa atómica (u)*, es habitual en espectrometría de masas el uso del *dalton (Da)* como término equivalente ( $1 u = 1 Da$ ). Además, el Da permite el uso de prefijos multiplicativos (p.ej. kDa)<sup>3</sup>. Por ello y en función del contexto, a lo largo del presente texto se utilizarán ambas unidades (u y Da) indistintamente.

#### *Unidades de masa/carga*

En 1991, Cooks y Rockwood<sup>4</sup> propusieron el *Thomson (Th)* como unidad para la relación  $m/z$  en el contexto de la espectrometría de masas. Sin embargo, este término ha dado lugar a gran controversia con partidarios y detractores de su uso. La relación masa/carga ( $m/z$ ) es, por definición, adimensional y el Th no ha sido aprobado por la IUPAC.<sup>5</sup> Por tanto, junto a las  $m/z$  de la presente Tesis Doctoral no aparecerá asociada ninguna unidad.

### **A.1.2. Contexto histórico: El origen de la espectrometría de masas.**

*Siglo XIX*<sup>6-11</sup>

Las bases del desarrollo de la *MS* tienen su origen en los estudios desarrollados por diversos científicos durante el siglo XIX sobre la conductividad eléctrica de los gases. El matemático y físico alemán Julius Plücker observó por primera vez, entre los años 1858 y 1859, cómo estas descargas realizadas en gases enrarecidos producían unos rayos que, al impactar con las paredes del tubo de vidrio en el que estaban confinados, daban un resplandor verde fosforescente. Unos años después, en 1876, el físico polaco Eugen Goldstein profundizó aún más en estos estudios, lo que le llevó al descubrimiento de la existencia de otros rayos similares, pero que tenían una trayectoria contraria a la de los observados por su predecesor. Goldstein los denominó, respectivamente, rayos canales y rayos catódicos. (del al. *Kanalstrahlen* y *Kathodenstrahlen*, respectivamente). Una creciente curiosidad en este campo comenzaba a despertar en los científicos de la época.

Jean Baptiste Perrin y el malogrado Heinrich Hertz fueron dos de estos científicos que, de forma independiente, intentaron determinar si los rayos catódicos se veían influenciados por la presencia de campos eléctricos. Sin embargo, las conclusiones de sus estudios se contradecían; mientras que Perrin sugería que los rayos catódicos poseían carga negativa, Hertz no observó ningún efecto del campo magnético sobre ellos.

Joseph John Thomson, intentó arrojar algo de luz a esta cuestión y, junto a su equipo, continuó los estudios de sus predecesores sobre los rayos catódicos. Entre los años 1896 y 1897, fue capaz de determinar su velocidad, así como su relación carga-masa, constatando su naturaleza particulada y denominando a esas partículas *corpúsculos*. El corpúsculo, que era la unidad fundamental de los rayos catódicos, fue posteriormente rebautizado como “electrón” (del gr. *ἔλεκτρον*, ámbar). De esta forma se confirmaron los resultados de Perrin; los rayos catódicos se veían afectados por los campos eléctricos.

Simultáneamente, un alumno de Goldstein, Wilhem Wien, focalizó su trabajo en el estudio de los rayos canales (o rayos anódicos), determinando que tenían carga opuesta y muy superior a los corpúsculos descritos por Thomson. Además, observó que los campos eléctricos y magnéticos afectaban a los rayos canales y construyó un sistema que los separaba en función de su carga-masa.

Este sistema fue mejorado por Thomson, creándose así el primer espectrógrafo de masas de la historia<sup>i</sup>.

Los diversos experimentos realizados con él, llevaron a Thomson a postular que esos rayos canales estaban en realidad formados por átomos a los que le faltaba un electrón, es decir, por iones positivos. Thomson propuso entonces el primer modelo atómico moderno, hoy conocido vulgarmente como el modelo del *pudin de pasas*, donde imaginaba una gran masa de carga positiva donde los electrones estaban incrustados<sup>12</sup>. Obviamente, este modelo tenía inexactitudes ya que ni el protón ni el neutrón habían sido descritos en ese momento. Sin embargo, era el primer modelo atómico que proponía la existencia de partículas subatómicas en el átomo, rechazando así la propia etimología griega de la palabra (del gr. *átomos*); indivisible.

La MS acababa de nacer y, con ella, la época dorada de la física atómica.

### *Primera mitad del siglo XX*<sup>6-11</sup>

Durante los primeros años del nuevo siglo, un doctorando de Thomson, Francis Aston, realizó mejoras subsiguiente del diseño de su maestro y revisó sus estudios sobre la trayectoria de iones de neón. Gracias a las mejoras en la resolución del equipo de enfoque electromagnético, así como en la exactitud en la determinación de la masa, pudo separar señales de neón con diferente relación masa-carga, y definir los indicios observados primeramente por Thomson como isótopos de un mismo elemento, así como determinar sus abundancias naturales (<sup>20</sup>Ne, <sup>22</sup>Ne). En la Figura A.1.1., se puede ver a Aston con unos de sus espectrógrafos.

El concepto de *isótopo* había sido sugerido unos años antes por el radio-químico Frederick Soddy en el contexto de sus estudios sobre el decaimiento radiactivo de algunos elementos. En el transcurso de una conversación con la física escocesa Margaret Todd, ésta propuso el nombre de *isótopos* (del gr. *isos*, igual y *topos*, lugar) tras hablarle Soddy sobre la posibilidad de que átomos con diferente carga-masa pudieran ocupar el mismo lugar en la tabla periódica. Sin embargo, Soddy únicamente

---

<sup>i</sup> La diferencia entre los términos *espectrógrafo de masas* y *espectrómetro de masas* es que, en el primero, la señal se recoge en una placa fotográfica, mientras que, en el segundo, la detección es eléctrica. El término *espectroscopio de masas* hace referencia a ambos, aunque su uso está obsoleto. El término *espectrómetro* tiene carácter general para los equipos que miden la intensidad de bandas espectrales.<sup>5</sup>

## A. INTRODUCCIÓN

---

había pensado en la existencia isótopos para aquellos elementos que fueran radiactivos, hasta que Aston realizó sus experimentos.



**Figura A.1.1.** Francis Aston con su tercer espectrógrafo de masas en 1937. (*Archivo fotográfico de Cavendish Laboratory*).

A partir de 1919 y durante los siguientes 20 años, Aston continuó estudiando la composición isotópica de todos los elementos conocidos hasta lograr identificar no menos de 212 isótopos estables. Esto fue posible en parte gracias a las mejoras sucesivas en el diseño de espectrómetros de masas que fueron llevando a cabo sucesivamente Dempster, Bainbridge, Niers, etc.

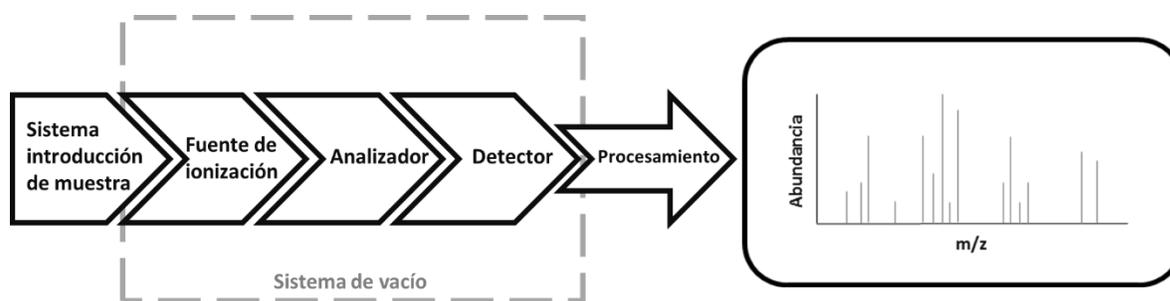
La primera mitad del siglo XX estuvo caracterizada por la sucesión de las dos grandes Guerras Mundiales. Con la llegada de la Segunda y habiéndose incrementado el clima de tensión que había dejado en Europa la Primera, comenzó una gran carrera armamentística hacia la búsqueda de la mayor arma de destrucción que se hubiera creado. En torno a los años 40, ya habían sido descubiertos varios isótopos del uranio y ya se había obtenido evidencia experimental de la fisión nuclear, bases para la creación de la primera bomba atómica. Aunque no sean de interés particular los entresijos, el desarrollo y la culminación de *El Proyecto Manhattan* en el contexto de esta Tesis Doctoral, sí que lo son todos los estudios y publicaciones derivados de él. El proceso de desarrollo de la bomba atómica supuso el mayor impulso para el campo de la MS hasta ese momento, y sentó las bases para su uso como una de las más poderosas herramientas de análisis químico que existen en la actualidad.

A partir de mediados de siglo, los espectrómetros de masas fueron evolucionando hasta llegar a la concepción contemporánea de los mismos. De los equipos actuales y sus características se hablará en los apartados siguientes.

### **A.1.3. Estructura básica de un espectrómetro de masas.**

Como acertadamente comentan Skoog y Leary en su libro, “los fundamentos de las medidas espectrales son sencillos y fácilmente comprensibles, aunque desafortunadamente, esta simplicidad no se extiende a la instrumentación”.<sup>2</sup>

Un espectrómetro de masas es un sistema que permite separar y detectar iones con distinta relación  $m/z$  que provienen de una muestra previamente introducida e ionizada en el sistema. De forma muy simplificada, sus componentes básicos aparecen indicados en la Figura A.1.2.



**Figura A.1.2.** Esquema general de un espectrómetro de masas.

Aunque es evidente que un espectrómetro de masas tiene otros componentes más allá de los indicados en la figura anterior, no es el objetivo de este trabajo ahondar en todas las características y componentes de los espectrómetros de masas. Por este motivo, sólo se comentarán aquellos aspectos que puedan tener más interés en la presente Tesis Doctoral, y siempre enfocándolos hacia MS con fuente de ionización ICP, es decir, ICP-MS, técnica con la que se ha desarrollado el trabajo expuesto en el presente documento.

#### *Sistema de introducción de muestra*

La muestra a analizar puede estar tanto en estado sólido como líquido o gaseoso. En función de dicho estado y del tipo de análisis o información que se pretenda obtener, se escogerá un sistema de introducción en particular, pudiendo ser necesaria una preparación de muestra previa. Sin

## A. INTRODUCCIÓN

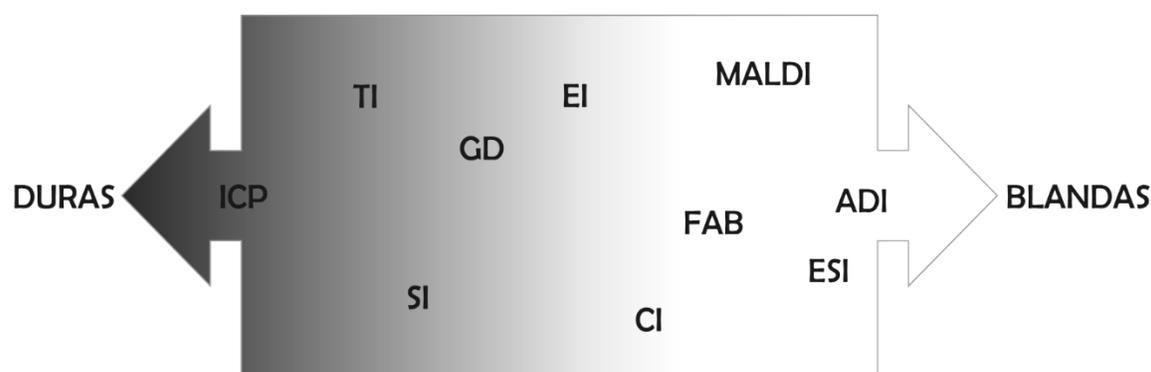
---

embargo, el análisis se lleva a cabo con los iones en fase gas, por lo que es necesaria una transición a ese estado. Esta transición se consigue con la fuente de ionización mediante el propio sistema de introducción de muestra.

En muchos de los casos, la forma en que la muestra se introduce en el espectrómetro de masas va ligada a la técnica de separación previa empleada para aislar los componentes de la muestra como sucede en la cromatografía líquida (LC), la cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar (CE), etc.

### *Fuente de ionización*

Dado que la funcionalidad de un espectrómetro de masas se basa en la separación de iones, la fuente de ionización es una de las partes primordiales del mismo, ya que es la parte encargada de su generación a partir de la muestra a analizar. Hasta el día de hoy se han desarrollado multitud de tipos de fuentes, las cuales pueden clasificarse en función de su capacidad de atomización y/o fragmentación de las moléculas. Esta característica, ligada a la mayor o menor energía de la fuente, permite clasificarlas en fuentes de ionización *duras* y *blandas*. En la Figura A.1.3, se muestra un esquema de las fuentes más conocidas en función de su dureza.



**Figura A.1.3.** Fuentes de ionización ordenadas según su dureza. ICP: plasma de acoplamiento inductivo; TI: ionización térmica; SI: MS de iones secundarios; GD: descargas luminiscentes; EI: ionización electrónica; CI: ionización química; FAB: bombardeo rápido de átomos; MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz; ESI: ionización por electroespray; ADI: desorción/ionización ambiental (Las ADI engloban un numeroso conjunto de fuentes cuya dureza puede variar, pero en general, son consideradas fuentes blandas).

Las fuentes más blandas, como las ADI o ESI, mantienen las moléculas prácticamente intactas, otorgándoles cierta carga y formando iones moleculares. La fuente ESI es una de las más usadas para el análisis de proteínas. A medida que la dureza de la fuente aumenta (es decir, la energía

suministrada) la producción de iones moleculares va disminuyendo, aumentando la producción de fragmentos cada vez más pequeños hasta llegar al nivel de fragmentación máximo que produce la fuente ICP, capaz de ionizar prácticamente cualquier compuesto reduciéndolo a sus iones elementales. La fuente de ionización ICP se describe más extensamente en el apartado A.1.4.

### *Analizador de masas*

El analizador se puede describir como un selector que permite aislar un  $m/z$  concreta del haz de iones formado en la fuente de ionización. Existen multitud de tipos de analizadores cuyo uso suele estar asociado a una aplicación en particular o a la búsqueda de un tipo de información concreta. Las ventajas e inconvenientes de cada uno están condicionadas, por tanto, por los requerimientos particulares de cada caso. Desde la aparición del primer sector magnético,<sup>11</sup> hasta el desarrollo del Orbitrap en el 2000,<sup>13</sup> se han desarrollado distintas fuentes que pueden clasificarse en función de parámetros tales como la resolución espectral, la sensibilidad o el límite superior de  $m/z$ . Al combinar los distintos analizadores con las distintas fuentes de ionización, se abre un gran abanico de posibilidades que cubren un amplio rango de necesidades analíticas en muy diversos campos (geología, bioquímica, biomedicina, medio ambiente, etc.). No todas las combinaciones teóricamente posibles existen instrumentalmente, si no que determinadas fuentes de ionización suelen estar asociadas a unos tipos de analizadores de masa concretos.

En el caso particular del ICP, los analizadores más habituales son el filtro de masa cuadrupolar o cuadrupolo (Q), el *sector magnético* (SF) y el *tiempo-de-vuelo* (TOF). Sobre estos analizadores sus ventajas y desventajas se discutirá en el apartado A.1.4.1.3.

### *Detectores*

Una vez generados y separados en función de su  $m/z$ , los iones llegan al detector. Esta llegada puede ser secuencial, cuasi-simultánea o simultánea en función del analizador de masas y del tipo de detector que lleve asociado. El tipo de detector más habitualmente asociado al ICP es el *multiplicador de electrones* (EM), a excepción del equipo *multicolector* (MC)-ICP-MS, que lleva incorporado varios detectores de *Copas de Faraday*, y que le confiere al MC-ICP-MS su principal característica: la capacidad de realizar una detección simultánea de varios iones.

### **A.1.4. La espectrometría de masas elemental: ICP-MS.**

En los años 80, se presentó por primera vez una fuente de ionización con un plasma<sup>ii</sup> de argón de acoplamiento inducido (ICP) y acoplada a un detector de masa (Q) para el análisis multi-elemental a nivel de trazas<sup>14</sup>.

En la actualidad, las metodologías analíticas basadas en el uso del ICP-MS está muy extendidas, y el ICP-MS se puede considerar hoy como la herramienta analítica más poderosa en la detección multi-elemental en análisis químico, habiendo demostrado ya su versatilidad y enorme impacto en campos tan variados como la proteómica, la geología o la arqueología.<sup>15,16,17</sup> Esto es debido en parte a que permite el acoplamiento sencillo de multitud de técnicas de separación previas al análisis (HPLC, GC, CE, láser, etc.). Además, los espectrómetros de masa con fuente ICP tienen otra serie de características que se resumen a continuación y explican su actual popularidad e importancia:

- Sencillez, rapidez de análisis<sup>iii</sup>, alta sensibilidad, precisión y exactitud<sup>3</sup> en la determinación de los elementos químicos a nivel de trazas y ultratrazas (límite de detección (LD): 0,001-0,1 ng L<sup>-1</sup> para la mayoría de los elementos).
- Capacidad multi-elemental y multi-isotópica.
- Amplio rango elemental ya que, virtualmente, cualquier elemento podría ser medido por ICP-MS, y amplio intervalo lineal (hasta 9 órdenes de magnitud en una sola medida).
- La señal obtenida es virtualmente independiente de la estructura de la especie, siendo directamente proporcional a la masa del elemento. Esta característica es de vital importancia para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, ya que esto supone la posibilidad de emplear el ICP-MS para poder cuantificar biomoléculas de forma absoluta sin necesidad de patrones específicos.

---

<sup>ii</sup> El término plasma (del gr. plásma, material moldeable) fue introducido en el siglo XIX por el fisiólogo J. E. Purkinge para denotar el fluido que quedaba tras eliminar el material corpuscular de la sangre. En 1928 I. Langmuir introdujo este término para referirse al estado de la materia al que se refiere el término en este caso, ya que el gas altamente ionizado compuesto por múltiples componentes que interactúan entre sí, le recordaban al plasma sanguíneo.

<sup>iii</sup> Varía en función del analizador.

A continuación, se comentarán las partes de un ICP desde el sistema de introducción de muestra general, hasta el analizador.

#### **A.1.4.1. Diagrama básico de un ICP-MS.**

##### *A.1.4.1.1. Introducción de muestra y generación del plasma<sup>18-21</sup>*

El sistema de introducción de muestra más habitual en estos equipos está formado por un nebulizador neumático y una cámara de nebulización que puede estar tanto refrigerada como a temperatura ambiente, según el caso. Las muestras acuosas son transportadas hasta el nebulizador mediante una bomba peristáltica. Existen numerosos tipos de nebulizadores cuya geometría es muy diversa. En general, están compuestos por una cámara de nebulización asociada a un inyector a través del cual pasa la muestra, y en el que es introducido también el gas portador o *carrier* mediante un tubo capilar. En el extremo del nebulizador se juntan ambos flujos formándose así un aerosol. En la cámara de nebulización, las gotas del aerosol se seleccionan en función de su tamaño, siendo las más grandes dirigidas al desecho y las pequeñas transportadas al plasma por arrastre del gas portador (normalmente Ar).

La fuente de iones de ICP se basa en la formación de un plasma mediante la interacción de un campo electromagnético producido por radiofrecuencia (RF) con un flujo tangencial de gas (generalmente argón) a unos 15-16 L min<sup>-1</sup> que fluye a través de un tubo de cuarzo llamado antorcha. La antorcha está formada por 3 tubos concéntricos, uno central (también llamado inyector) para el flujo laminar de argón portador que arrastra la muestra, un tubo intermedio para el argón auxiliar, y uno exterior para el gas plasmógeno. Una bobina de cobre refrigerada en su interior es la generadora del campo electromagnético de RF (700-1600 W) y rodea la antorcha dando entre 2 y 4 vueltas.

Un iniciador de la descarga a presión atmosférica (generalmente una bobina de Tesla) provoca una chispa de alto voltaje en la región inferior de la antorcha que lleva a la formación de iones en el gas plasmógeno (Ar<sup>+</sup> y e<sup>-</sup>), creándose así el plasma en el extremo abierto de la misma. Una vez que el plasma se ha iniciado, se mantiene por un proceso denominado *acoplamiento inductivo*, que da nombre a la fuente. Los electrones primarios son acelerados por el campo electromagnético que produce la RF, induciéndose más colisiones con los átomos neutros del gas (Ar<sup>0</sup>) y generándose así más electrones que inducirán, a su vez, más colisiones manteniendo la descarga estable. Este efecto

## A. INTRODUCCIÓN

en cascada mantendrá el plasma mientras se esté aplicando una RF a la bobina. En la Figura A.1.4. aparece un esquema del sistema generador del plasma.

Las altas temperaturas que se alcanzan en el plasma (hasta 10000 K) aseguran la desolvatación, vaporización, atomización e ionización elemental de la muestra introducida. Una vez que los iones (mayoritariamente monoatómicos y monopositivos) se han formado en el plasma, son dirigidos hasta la interfase.

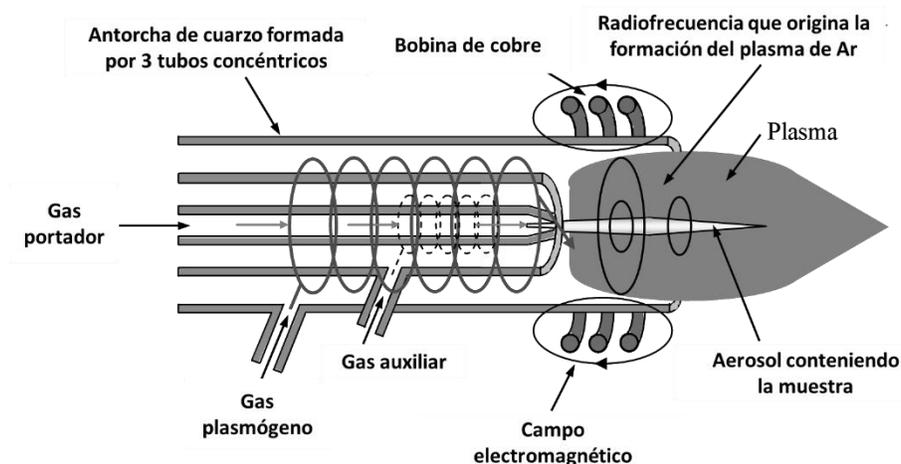


Figura A.1.4. Esquema de la antorcha de un sistema ICP-MS.<sup>22</sup>

### A.1.4.1.2. Interfase y extracción de iones.

El objeto de la interfase es extraer una muestra representativa de la población iónica del plasma que se halla a presión atmosférica y a unos 7000 K, y transferirla a la región de alto vacío del espectrómetro (analizador). Para poder llevar a cabo este proceso de forma eficiente, se requiere un aumento gradual del vacío de forma que la extracción se vea favorecida por un gradiente de presión. Desde la antorcha, donde se forma el plasma a presión atmosférica ( $10^5$  Pa), se pasa a una región intermedia. En esta región intermedia (interfase o región de extracción) se encuentran dos conos de metal. Aquí la presión es aproximadamente  $10^2$  Pa, y es generada por una bomba rotatoria. Los conos se denominan cono de muestreo o *sampler* (el más cercano al plasma), y cono separador o *skimmer* (el más lejano al plasma). Aunque habitualmente están hechos de níquel, pueden aparecer en otros materiales como el platino, muchos más resistente frente a muestras corrosivas. Los conos tienen dos orificios con diferentes diámetros (en torno a 1 mm y 0.5 mm respectivamente)

que permiten el paso de los iones al analizador de masas a través de las lentes, que se sitúan justo a continuación. Aunque existen diferencias de diseño de la zona óptica de las lentes, la función es esencialmente la misma: enfocar electrostáticamente el haz de iones hacia el analizador, evitando la llegada al mismo de fotones, partículas y especies neutras.

### **A.1.4.1.3. Región de análisis.**

El tercer nivel de presión es el de alto vacío, cuyo valor varía en función del tipo de analizador ( $10^{-4}$  –  $10^{-7}$  Pa) y es generado por una (o dos) bombas turbomoleculares. El mantenimiento del alto vacío es esencial para asegurar la transmisión iónica, reducir el ruido espectral y los efectos de dispersión de los iones en el analizador.<sup>21</sup> Como ya se ha comentado, el papel del analizador es la separación de los iones en función de su  $m/z$ .

Los analizadores más habitualmente asociados a las técnicas de ICP-MS son el Q, el sector magnético o su versión en doble enfoque (DF) y el TOF. Con objeto de llevar a cabo una comparación crítica entre ellos, se definirán brevemente algunos de los parámetros que mejor definen sus características.<sup>18,23</sup>

- *Velocidad de barrido (o velocidad de escaneo/análisis)*: velocidad a la cual el analizador mide sobre un rango particular de masas. Se expresa en unidades de masa por tiempo ( $u \cdot ms^{-1}$ ).
- *Transmisión*: es la relación entre el número de iones que llegan al detector respecto a los que entran en el analizador.
- *Exactitud en la determinación de la masa*: indica la exactitud del analizador en la medida de la  $m/z$  de un ion, es decir, la diferencia entre la  $m/z$  teórica y la  $m/z$  medida. Este concepto está muy ligado al de resolución. Un equipo con poca capacidad de resolución no puede dar una alta exactitud. Este parámetro es particularmente importante en la determinación de la composición isotópica de una muestra.
- Existen otros dos parámetros de gran importancia, la *resolución* y la *sensibilidad en abundancia*, que están relacionados con la capacidad de un analizador de separar dos masas contiguas. Sobre estos parámetros se discutirá más detalladamente en el apartado A.1.4.1.3.1.

## A. INTRODUCCIÓN

---

### *Cuadrupolo*

Es el analizador más habitual en los instrumentos de ICP-MS. Esto es así gracias a su robustez, facilidad de uso, amplio rango analítico de masas, alta sensibilidad, alta velocidad de barrido (dependiente del rango de masas analizado) y relativamente bajo coste. Sin embargo, su resolución es limitada ( $R=300$ ), separando únicamente isótopos con una unidad de masa de diferencia. Por otro lado, tiene gran versatilidad ya que puede ser usado como guía de iones y es muy adecuado para la MS elemental en tándem (ICP-MS/MS), <sup>21</sup> aspecto importantísimo en esta Tesis.

### *Sector magnético*

Los analizadores de sector magnético (SF) suelen aparecer en estrategias de doble enfoque (DF), utilizando un sector electrostático previo que selecciona los iones con un rango de velocidades determinado, lo que aumenta la resolución de masa. Ofrecen una resolución y exactitud excelentes ( $\sim 0.01\%$ ) y son capaces de resolver la mayor parte de las especies poliatómicas de los analitos con la misma masa nominal. La resolución de trabajo se puede regular, permitiendo medir a baja ( $R=300$ ), media ( $R=4000$ ) o alta resolución ( $R=10000$ ). Su sensibilidad está directamente ligada a la resolución a la que se esté utilizando; de manera que, a más resolución, menos sensibilidad, ya que disminuye la transmisión iónica. Sin embargo, estos equipos DF tienen un coste muy superior a los basados en un filtro de masas cuadrupolar (Q).

### *Tiempo de vuelo*

Los analizadores TOF no tienen tanta sensibilidad como los Q, ni tanta resolución como los SF y no permiten un buen control de las interferencias. Sin embargo, poseen una alta velocidad de barrido que permite la toma de espectros a gran velocidad de señales con resolución temporal.

En la tabla A.1.1. se resumen las características principales comparadas de los 3 analizadores descritos (los más habituales en la actualidad en ICP-MS).

**Tabla A.1.1.** Comparación de los 3 analizadores principales asociados a la fuente de ionización de ICP.<sup>23,24</sup>

Analizador	Resolución	Sensibilidad	P en el analizador (Pa)	Velocidad de barrido
TOF	Buena R~500-2000	Buena	10 <sup>-7</sup>	~7 500 000 u s <sup>-1</sup> (espectro completo en 0.033 ms)
SF	Muy buena R <sub>max</sub> ~10 000	Pobre-muy buena (dependiente de la resolución)	10 <sup>-7</sup>	~1500 u s <sup>-1</sup> (espectro completo en 150 ms)
Q	R~300	Muy buena	10 <sup>-4</sup>	~2500 u s <sup>-1</sup> (espectro completo en 100 ms)

#### A.1.4.1.3.1. Resolución y sensibilidad en abundancia.

Además de los comentados anteriormente, hay específicamente dos parámetros que establecen la capacidad operativa de un analizador de masas para llevar a cabo un análisis cuantitativo (controlando su capacidad de separar el pico del analito del pico de la interferencia): la *resolución* y la *sensibilidad en abundancia*.<sup>18,19</sup> Mientras que la resolución indica el ancho de un pico individual y su separación en el espectro de otro contiguo, la sensibilidad en abundancia se refiere a la influencia que tiene una *m/z* en concreto sobre la *m/z* contigua.<sup>21</sup>

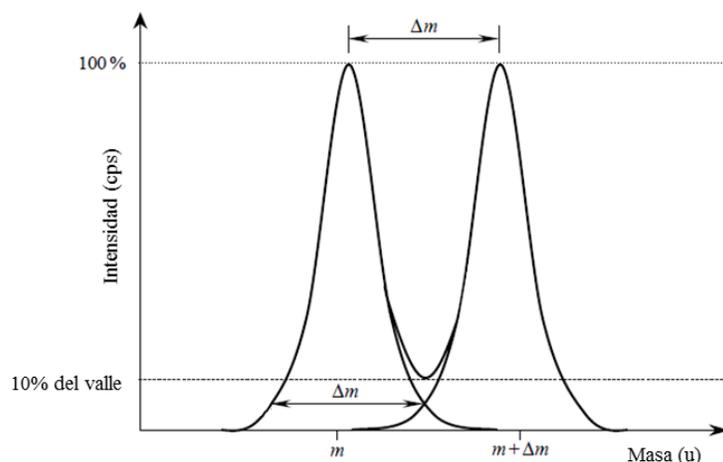
A continuación, se explicarán ambos conceptos con más detalle:

##### *Resolución*

La *resolución (R)* en un espectrómetro de masa determina su capacidad de separar regiones de masa adyacentes en el espectro de masas. Si se consideran dos picos contiguos, se puede decir que ambos “están resueltos” si la magnitud del valle entre ambos picos es menor del 10% de la magnitud media de la altura de los picos.<sup>19</sup> La resolución se calcula según la ecuación siguiente:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

siendo  $\Delta m$  la diferencia de masas entre dos picos adyacentes y  $m$  la masa nominal del pico del analito. La resolución, por tanto, es función de la masa nominal, y debe ser referido a  $m$ .<sup>5</sup> En la Figura A.1.5. aparece explicado el concepto de forma gráfica.



**Figura A.1.5.** Concepto de resolución según la definición del 10% de valle. Considerados dos picos de la misma altura con masas  $m$  y  $m + \Delta m$ , ambos están resueltos si el valle que los une es inferior en su punto más bajo al 10% de la altura de cada pico. (Adaptado de Becker<sup>20</sup>).

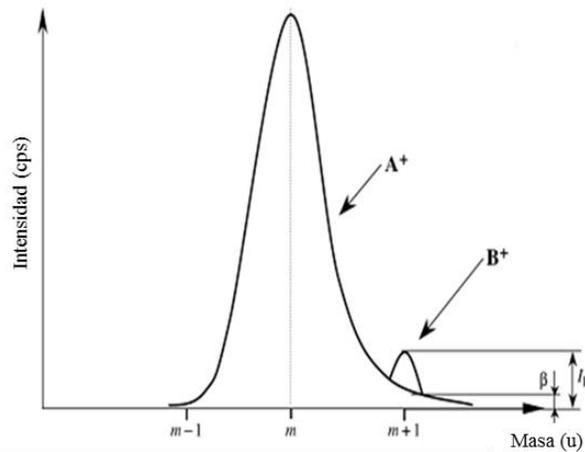
Los equipos comerciales con un analizador de cuadrupolo operan típicamente con un poder de resolución capaz de separar una 0.7-1.0 u ( $R=300$ ). Como ya se ha comentado anteriormente, aunque para la mayoría de las especies en ICP esta resolución es suficiente, para poder resolver interferencias poliatómicas es necesario, al menos,  $R > 3000$ <sup>18</sup> que se pueden conseguir, por ejemplo, con espectrómetros de DF. Como siempre, la elección de un tipo de espectrómetro u otro depende de las necesidades analíticas concretas, y de un compromiso entre las especificaciones y el coste de las mismas.

### *Sensibilidad en abundancia*

La *sensibilidad en abundancia* o *abundance sensitivity (SA)* puede definirse como la medida de la contribución de la cola de un pico perteneciente a un ion mayoritario de masa  $m$ , sobre el pico contiguo ( $m \pm 1$ ) que tiene menor intensidad.<sup>18,20,21</sup> Esto tiene como consecuencia la determinación por exceso del analito de interés. Aunque la situación más habitual es la influencia sobre la masa contigua, este efecto puede darse también a dos masas de distancia. En la Figura A.1.6. aparece una representación del concepto.

Incluso en condiciones de alto vacío, los iones del haz que llegan desde la fuente sufren una dispersión debido al gas residual que queda en el analizador. Además, la dispersión de las partículas

por la pared del analizador o por repulsión electrostática en el haz iónico resultan en un incremento de la dispersión de energía de los iones y, consecuentemente, en un deterioro de la SA<sup>20</sup>.



**Figura A.1.6.** Sensibilidad en abundancia. La medida de la intensidad del ion  $B^+$  ( $I_B$ ) con masa  $m+1$  y minoritario, se ve influenciada por la cola del ion  $A^+$  ( $\beta$ ) mayoritario y de masa  $m$ . Esto provoca una sobreestimación de  $I_B$ . (Adaptada de Becker<sup>20</sup>).

Éste parámetro define la habilidad de medir analitos a bajas concentraciones en presencia de matrices complejas o con altas concentraciones de elementos. Cuanto menor sea el valor de la SA, más exacto será el valor de la medida. El valor numérico de la SA se calcula según la ecuación siguiente:

$$SA = \frac{I_{m\pm 1}}{I_m}$$

siendo  $I_m$  la intensidad para una  $m/z=m$ , e  $I_{m\pm 1}$  la intensidad de la señal a la  $m/z=m+1$  (o, en su caso,  $m/z=m-1$ ). El valor de la SA es dependiente del poder de resolución (R) del espectrómetro de masas, por lo que es especialmente crítico en los analizadores de tipo cuadrupolar. Sin embargo, el valor específico de la SA no sólo depende del tipo de analizador, sino que también puede variar en función del tipo de detector o de las lentes o de otras modificaciones que se hagan sobre el equipo.<sup>25,26</sup> Para los equipos con un analizador de cuadrupolo, su valor (en torno a  $10^{-5}$ ) es significativamente más alto que para el TOF o el DF ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$ ).

### A.1.4.2. Las interferencias en ICP-MS: interferencias espectrales y no espectrales.

El gran poder de ionización de la fuente ICP, así como el hecho de que el plasma esté a presión atmosférica, favorece la ionización de numerosas especies que involucran componentes atmosféricos (p.ej. CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>), cuya m/z puede solapar con la m/z de los isótopos de interés, algo que también puede suceder con la ionización de los propios componentes de la matriz de la muestra, pudiendo verse comprometida la exactitud de los resultados cuantitativos. En consecuencia, para poder llevar a cabo un análisis adecuado, es necesario un exhaustivo control de las interferencias, eliminándolas o minimizándolas. Las interferencias en ICP-MS se pueden clasificar en 2 tipos principales: *espectrales* y *no espectrales*. La importancia de las interferencias en ambos tipos puede ser desde pequeña hasta extremadamente severa.

#### *Interferencias no espectrales*

Las interferencias no espectrales, también llamadas *efectos de matriz*, se pueden definir como variaciones en las señales (incrementos, o disminuciones) que son inducidas por la composición de la propia muestra.<sup>27,28</sup> Un ejemplo sería la presencia de elementos alcalinos como el Na que, al tener un potencial de ionización bajo, se ionizan de manera preferente, y causan supresión de la ionización en elementos con alto potencial de ionización como el Hg.<sup>29</sup> En general, estos efectos son independientes de posibles solapamientos espectrales y no están limitados a un único elemento. Dado que el efecto de matriz puede tener un origen muy diverso y complejo (pudiendo ser dependientes de la fuente o equipo utilizado), a veces son difíciles de identificar y de solucionar. Algunas estrategias tradicionales para combatir los efectos de matriz son el uso de patrones internos,<sup>30</sup> adiciones estándar,<sup>31</sup> preparaciones de muestra específica que minimicen el efecto de la matriz,<sup>32</sup> o diluciones mediante gases añadidos al plasma.<sup>33</sup>

#### *Interferencias espectrales*

La historia del desarrollo de la MS elemental es la historia de la lucha contra las interferencias espectrales. Estas interferencias son las más habituales en ICP-MS y ocurren cuando un ion (monoatómico o poliatómico) tiene la misma masa nominal que el isótopo de interés. Este tipo de interferencias suele llevar a determinaciones por exceso, ya que la señal del interferente se solapa con la señal del analito. Esta situación puede darse por varias vías:

- *Interferencias poliatómicas*: respecto a un conjunto de átomos (o especies moleculares) que tienen la misma masa nominal que el isótopo de interés. Dentro de este grupo se pueden incluir tanto aquellas especies poliatómicas cuya masa nominal es la misma que la del analito ( $^{56}\text{Fe}^+$  y  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  a  $m/z=46$ ), como a las especies poliatómicas ionizadas con múltiples cargas cuyo resultado es una  $m/z$  igual a la del analito. Normalmente estas especies suelen ser dobles cargadas, siendo un ejemplo muy común la  $m/z=40$  de la especie  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^{2+}$  que interfiere al isótopo  $^{40}\text{Ca}^+$ . Estos iones poliatómicos suelen producirse en el plasma, aunque también pueden proceder de la propia muestra si el enlace es suficientemente fuerte para soportar las condiciones del plasma (como es el caso de algunos óxidos). Son la principal y más problemática fuente de interferencias en un ICP.<sup>34</sup>
- *Interferencias isobáricas*: esta situación se produce cuando dos átomos tienen la misma relación  $m/z$ . El interferente puede provenir de la matriz de la muestra o de la propia atmósfera. Dos ejemplos de estas situaciones serían la interferencia de  $^{204}\text{Hg}^+$  sobre  $^{204}\text{Pb}^+$  y la del  $^{40}\text{Ar}^+$  sobre el  $^{40}\text{Ca}^+$ , respectivamente. En la naturaleza se da la circunstancia de que la mayor parte de los elementos con varios isótopos suele tener al menos uno que no está interferido isobáricamente. Además, por debajo de  $m/z=36$  y por encima de la  $m/z=204$ , este tipo de interferencias no se observan. La relevancia de estas interferencias en la medida analítica depende no sólo de la concentración del analito en la muestra, sino también de la abundancia del isótopo interferente ya que, si este último es muy minoritario y el analito está en suficiente concentración, su influencia podría ser despreciable.

Además de las ya comentadas, existe otro tipo denominado *interferencias causadas por los efectos de cola o tailing effects*. Ya que no cumplen de forma estricta la definición de las anteriores, se incluyen en una categoría diferente. Aunque no siempre son descritos como interferencias, su clasificación como tal es circunstancial por el alto interés que tiene en el desarrollo del apartado D.4. de la presente Tesis Doctoral. Las interferencias de cola son causadas por el efecto de la SA descrita en el apartado A.1.4.1.3.1. como una característica de los analizadores de masa. Este caso se da cuando una  $m/z$  contigua a la  $m/z$  del analito tiene una intensidad tal que su cola abarca hasta las  $m/z$  de interés. Su importancia es relativa en función de la intensidad del interferente y la del analito. Cuanto mayor sea la concentración de interferente respecto a la concentración del analito, mayor será el error cometido en la cuantificación. Esta situación es habitual cuando la  $m/z$  del

analito está cerca de la  $m/z$  de isótopos mayoritarios presentes en la atmósfera o en la matriz de la muestra.

### **A.1.4.3. Estrategias de eliminación y/o reducción de las interferencias en ICP-MS: interferencias espectrales.**

Debido a la propia naturaleza de la fuente de ICP, la formación y eliminación de las interferencias no es un asunto trivial. Como se ha dicho, los efectos sobre la determinación de la medida pueden ser de significación variable. Una cuantificación exacta de los analitos solo puede llevarse a cabo si estos no están interferidos o, en caso de que lo estén, si las interferencias pueden ser corregidas o eliminadas. No obstante, hay ocasiones en que la magnitud de los efectos es suficientemente baja como para que puedan ser ignorados e incluir el error asociado a la propia incertidumbre de la medida.

Para aquellos casos en que los efectos de las interferencias son significativos, existen diversas estrategias para minimizarlas, corregirlas o eliminarlas. Las diferentes opciones no son excluyentes, si no que se buscan distintas combinaciones que permitan obtener los mejores resultados. En la Figura A.1.7. se citan las principales estrategias disponibles clasificadas en función del momento de su aplicación respecto a la medida analítica.

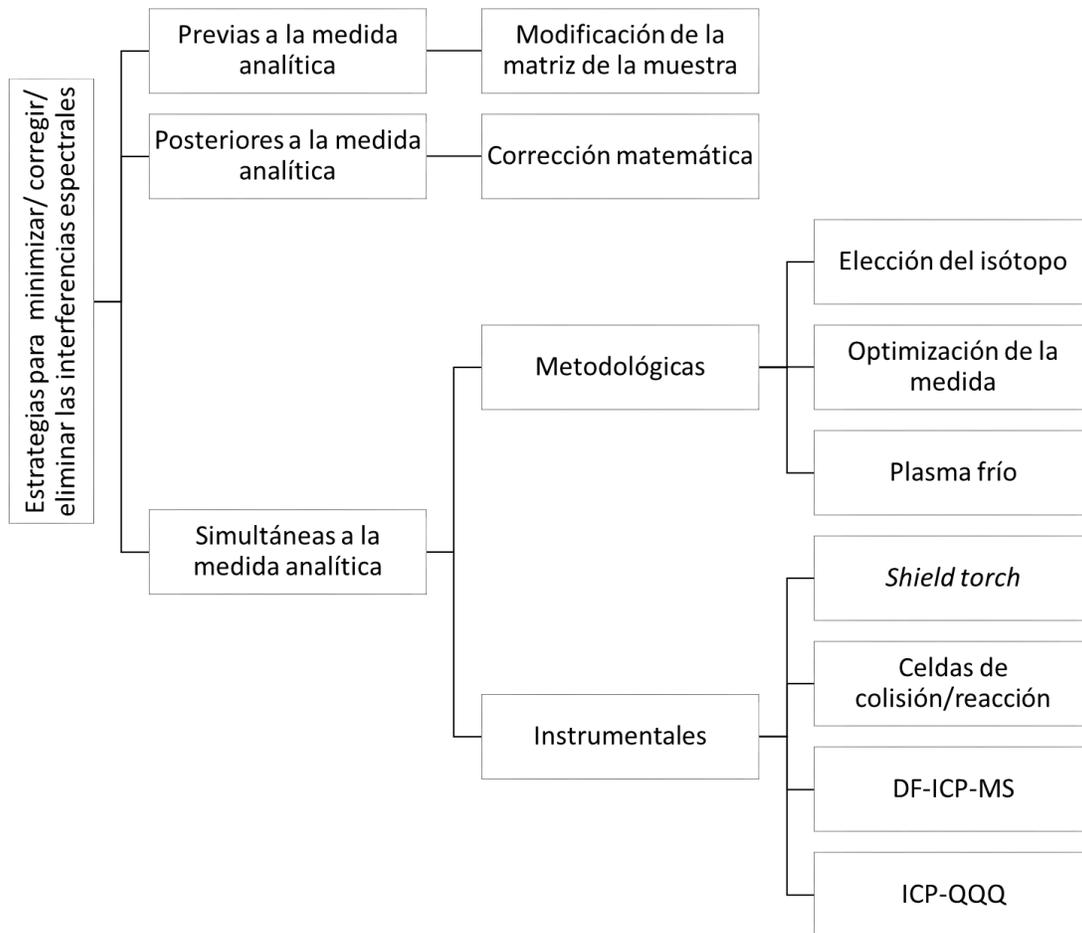


Figura A.1.7. Esquema de las principales estrategias para la eliminación de interferencias espectrales.

#### A.1.4.3.1. Estrategias previas al análisis.

En ocasiones, el interferente sobre nuestro analítico es específico de la matriz en la que se encuentra el analito. En estos casos, si existe alguna propiedad físico-química diferencial, es posible la *modificación de la matriz de la muestra* para eliminar el interferente. Un ejemplo sería el uso de una cromatografía de intercambio catiónico para eliminar el  $^{87}\text{Rb}$  que interfiere sobre el  $^{87}\text{Sr}$  en el análisis isotópico de vino.<sup>35</sup>

#### A.1.4.3.2. Estrategias posteriores al análisis.

En los casos en los que esta separación previa no es posible, a veces se pueden resolver las interferencias matemáticamente. Mediante el uso de correcciones basadas en la medida de relaciones de distintas especies (como en la medida de otros isótopos del mismo elemento libres de

## A. INTRODUCCIÓN

---

interferencias), es posible calcular la contribución teórica del interferente sobre la señal del analito.<sup>36</sup> La mayor ventaja de los *métodos matemáticos* es la velocidad y rapidez en su aplicación. Esta estrategia no puede aplicarse en todos los casos, y la precisión y exactitud que se puede obtener disminuye a medida que aumenta la complejidad de las ecuaciones de corrección aplicadas.<sup>28</sup>

### **A.1.4.3.3. Estrategias metodológicas simultáneas a la medida analítica.**

#### *Estrategias metodológicas*

La primera consideración que ha de hacerse cuando se analiza una muestra, es la *elección del isótopo* del elemento a analizar. Como ya se ha comentado en la descripción de las interferencias isobáricas, si el elemento a analizar es multi-isotópico, es posible que uno de los isótopos no esté interferido, aunque tenga una abundancia relativa menor. Esto es algo que ha de evaluarse en cada caso y siempre que la sensibilidad sea suficiente.

Otra estrategia general clave es la de *optimización del método*. Las condiciones del plasma afectan directamente a la producción de óxidos y dobles cargados de los iones, que pueden actuar como interferentes. En los equipos actuales, esta estrategia se puede llevar de forma prácticamente automática durante el encendido del equipo.

Además, dado que es precisamente la alta energía del plasma la que incrementa la producción de interferencias, puede disminuirse la energía del mismo incrementando el flujo del gas portador y/o aumentando la distancia de la antorcha al cono de muestreo. De esta forma se disminuye la capacidad de ionización de la fuente, que afecta principalmente a las especies poliatómicas que tienen un potencial de ionización superior al del analito. Esta estrategia particular se conoce como *plasma frío (cool/cold plasma)*.<sup>37</sup> Desafortunadamente, el uso del plasma frío suele estar limitado a la determinación de elementos con potenciales de ionización bajos y en muestras con matrices no demasiado complejas (generalmente acuosas) donde no haya efectos importantes de supresión de la ionización.

#### *Estrategias instrumentales*

Además de las diversas estrategias metodológicas empleadas para combatir las interferencias (ya sea antes, después, o durante el desarrollo de la medida analítica), también se han desarrollado

diseños y así como modificaciones en los componentes básicos de los equipos que combaten de forma específica la formación de interferencias. Estas estructuras o diseños modificados, pueden afectar a partes concretas, o la propia configuración del ICP-MS.

Por ejemplo, el llamado *shield torch* es una pequeña placa de platino que se coloca alrededor del extremo abierto de la antorcha como si fuera un escudo. Esta placa permite disminuir las descargas secundarias que se producen entre el cono de muestreo y la bobina generadora de radiofrecuencia. De esta forma, se consigue disminuir la formación de algunas especies poliatómicas, principalmente de argón.<sup>38</sup> El desarrollo del *shield torch* fue simultáneo al empleo de la estrategia del plasma frío. A pesar de que su uso está generalizado en los ICP-MS, es más bien una medida paliativa que se complementa con otras estrategias. De hecho, la mayoría de los equipos actuales lo llevan equipado de serie.

#### **A.1.4.3.3.1. Las celdas de colisión/reacción.**

Desde que fueron incorporadas por primera vez en torno a los años 90, las celdas de colisión/reacción (CRC) se han convertido en la estrategia más habitual para la eliminación de interferencias espectrales en los equipos con analizador de masas de tipo Q. Hoy en día casi la totalidad de los ICP-QMS están equipados con una CRC.<sup>39</sup> El sistema consiste fundamentalmente en una guía de iones (cuadrupolo, hexapolo u octapolo) encerrada en una celda que puede estar presurizada con un gas. La celda se suele situar a continuación de las lentes iónicas del equipo antes del analizador de masa. El gas puede interactuar con las interferencias de dos formas:

- *Modo colisión*: Este modo es específico para la eliminación de interferencias poliatómicas y especialmente efectivo para aquellas que provengan de matrices complejas, ya que no es necesario tener un conocimiento previo acerca de la naturaleza y la composición de las mismas. La eliminación de las interferencias se produce por la combinación de 2 mecanismos no reactivos: *disociación inducida por colisión* (CID) y *discriminación de la energía cinética* (KED). El mecanismo CID consiste en la colisión de los átomos del gas no reactivo con el interferente poliatómico, causándole una pérdida de energía. Esta pérdida de energía puede ser tal que exceda la energía del enlace de la molécula, produciendo la disociación de la especie poliatómica. Sin embargo, dado que los gases utilizados más habitualmente son gases ligeros, esta disociación no es la consecuencia más notoria, si no

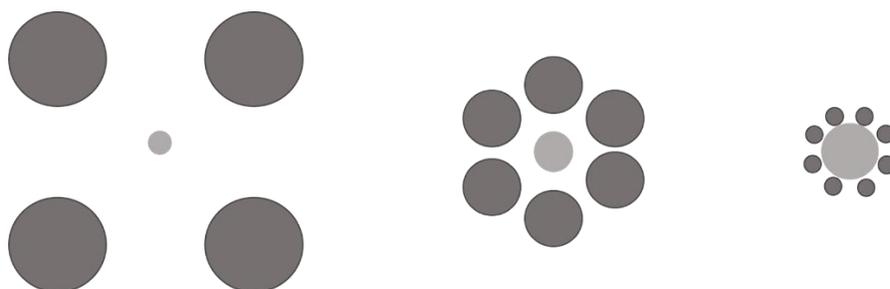
que se limita a una pérdida de energía no disociativa.<sup>40,41</sup> Debido al gran tamaño de las especies poliatómicas (en relación a los átomos ionizados), es estadísticamente más probable que el gas choque con éstas antes que con los isótopos de interés, por lo que la pérdida de energía cinética será mayor para los interferentes. A la salida de la celda se aplica un potencial desacelerador que permite discriminar entre las especies poliatómicas (interferentes) y las atómicas (analitos). Este proceso se conoce como KED. Aunque existen diversas opciones como gas de colisión, el más utilizado y efectivo es el helio.<sup>42</sup> Sin embargo, puede suponer un empeoramiento en el límite de detección para determinados elementos especialmente interferidos como el P, S o el Ca, imposibilitando así un análisis a nivel de ultra-trazas. En estos casos, puede ser más útil el modo de reacción que se explica a continuación.<sup>43</sup>

- *Modo reacción:* en este modo, el gas reacciona con el ion y lo transforma en otra/otras especies por procesos de transferencia de carga, protones y/o átomos. Este método puede ser mucho más efectivo para los análisis que requieran bajos límites de detección. No obstante, es importante tener un conocimiento previo del tipo de matriz y la composición de la muestra para poder aprovechar la gran versatilidad que ofrece el poder seleccionar entre diversos gases el más adecuado, así como para determinar los iones que se vayan a formar tras la reacción. Por otro lado, las reacciones que se producen en la celda pueden tener un carácter más impredecible que el de las colisiones. De hecho, pueden ocurrir reacciones inespecíficas por los componentes de la matriz que a su vez sean interferentes, al no haber un filtro previo a la celda.<sup>43</sup> Aunque los gases más habitualmente utilizados en las celdas de reacción sean el H<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub>, también se han desarrollado aplicaciones para NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, etc.<sup>44,45</sup>

Las celdas pueden ser de reacción o de colisión, pero actualmente la tendencia es la de permitir ambas posibilidades, ya que esto aumenta las capacidades y prestaciones analíticas de los equipos. En función de la marca comercial que desarrolle la celda, las características de la misma varían, aunque su fundamento sea el mismo. De esta forma, aparecen en el mercado diversas variaciones como la *celda de reacción dinámica* (DRC) desarrollada por Perkin-Elmer,<sup>41</sup> o la *celda de reacción de octapolo* (ORC o ORS) desarrollada por Agilent.<sup>46</sup> Aunque la estructura tradicional de la CRC es la que se ha explicado (basada en la presencia de una guía de iones multipolar), existen otras posibilidades como la desarrollada por Bruker, llamada *interfase de colisión-reacción* (CRI). Esta

“celda” se basa en la introducción del gas de colisión/reacción directamente al plasma y al haz de iones antes de que llegue a las lentes iónicas, sin necesidad de tener una celda presurizada.<sup>47</sup>

A menudo, los términos celda de colisión (CC) y celda de reacción (CR) aparecen de forma indistinta en la literatura. Tradicionalmente, estaban determinadas por el tipo de multipolo que se estuviera usando como guía de iones. El número de barras que tenga el multipolo determina el tamaño de la región de estabilidad iónica; a mayor orden de multipolo, mayor región de estabilidad (Figura A.1.8).<sup>48</sup>



**Figura A.1.8.** Esquema de la región de estabilidad iónica (gris claro) respecto a las distintas guías de iones (de izquierda a derecha: cuadrupolo, hexapolo, octapolo). (Adaptada de Agilent<sup>49</sup>).

La principal ventaja de los cuadrupolos es que permiten una alta especificidad en la selección de la  $m/z$  tanto del ion precursor como del ion producto. Por este motivo, los cuadrupolos se usan habitualmente como multipolo para las CR, ya que permiten un mejor control de los precursores que van a entrar en ella, así como de los productos de reacción indeseados, que pueden ser identificados y eliminados antes de pasar al analizador.<sup>49</sup> Sin embargo, la transmisión iónica es menor que en los multipolos de mayor orden, y las pérdidas por dispersión son mayores. Por el contrario, en los hexapolos y, especialmente en los octapolos, la transmisión iónica es mayor y la dispersión menor, lo que le permite transmitir iones en todo el rango de masas elemental. Dado que el modo de colisión es menos específico que el de reacción, estos multipolos son usados como CC y bajo condiciones no termalizadas, donde están favorecidas las colisiones.<sup>41,43</sup>

Las estrategias de eliminación de interferencias no están basadas únicamente en las características de la celda sino también en la propia configuración de los analizadores que las contienen, que permiten optimizar las posibilidades de la misma. Por este motivo, se puede considerar a los equipos

## A. INTRODUCCIÓN

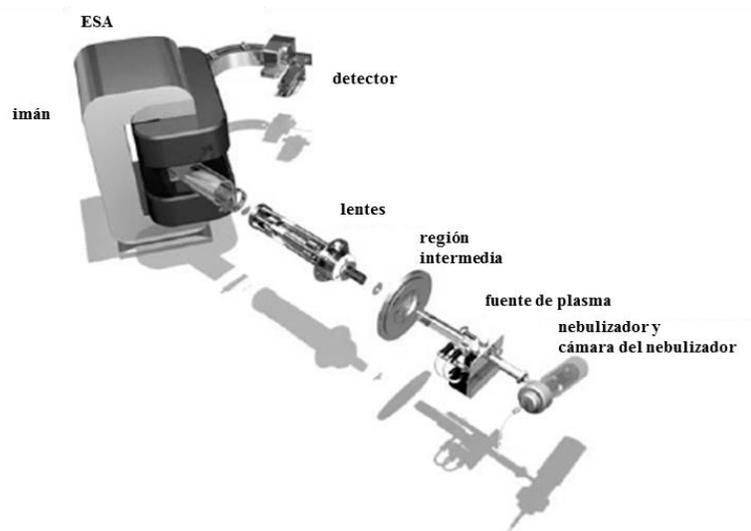
---

ICP-MS completos como sistemas/estrategias para la eliminación de interferencias. A continuación, se comentarán dos de ellos: el DF-ICP-MS, y el ICP-QQQ.

### A.1.4.3.3.2. El DF-ICP-MS.

Una de las formas más eficientes de eliminar las interferencias espectrales es el uso de equipos de alta resolución. Esta alta resolución ( $R \sim 10\,000$ ) se consigue normalmente con la combinación de sectores magnético y electrostático (DF-ICP-MS) y de una combinación de rendijas de entrada y salida adecuadas. Este sistema permite la separación física de interferencias poliatómicas en ICP sin la necesidad de usar condiciones de plasma frío o CRC.

Sin embargo, aunque su poder de resolución sea mucho mayor que el de los equipos basados en un analizador de tipo Q, el trabajar en alta resolución supone un sacrificio de sensibilidad, lo que puede traducirse en un empeoramiento de los límites de detección por la disminución de la transmisión iónica asociada. Además, estos equipos tienen un alto precio, son complejos desde el punto de vista técnico y menos robustos que un ICP-QMS. En la Figura A.1.9. se muestra el esquema de uno de estos equipos de alta resolución.



**Figura A.1.9.** Esquema de un equipo DF-ICP-MS (*Element 2*, Thermo Fisher Scientific). (Adaptada de Jakubowski y colaboradores<sup>50</sup>).

La fuente de iones, la región intermedia (interfase) y el consiguiente sistema de lentes son necesarios de la misma forma que lo son en un sistema de Q. Sin embargo, existen algunas particularidades que se mencionarán a continuación.

El esquema básico de un DF lo constituyen dos sectores, uno magnético (SF) y uno electrostático (ESA), situados entre las dos rejillas de entrada y salida. La posición de ambos sectores es opcional: tradicionalmente, el ESA estaba colocado previamente al SF (geometría Nier-Johnson), pero hoy en día la tendencia es la llamada “geometría inversa”, considerada más ventajosa, ya que las corrientes iónicas que se generan en la fuente son reducidas primero por análisis de masas y sólo los iones de la masa seleccionada están subsecuentemente sujetos al análisis. Esto ayuda a mejorar la SA y disminuye el ruido de fondo.<sup>25</sup>

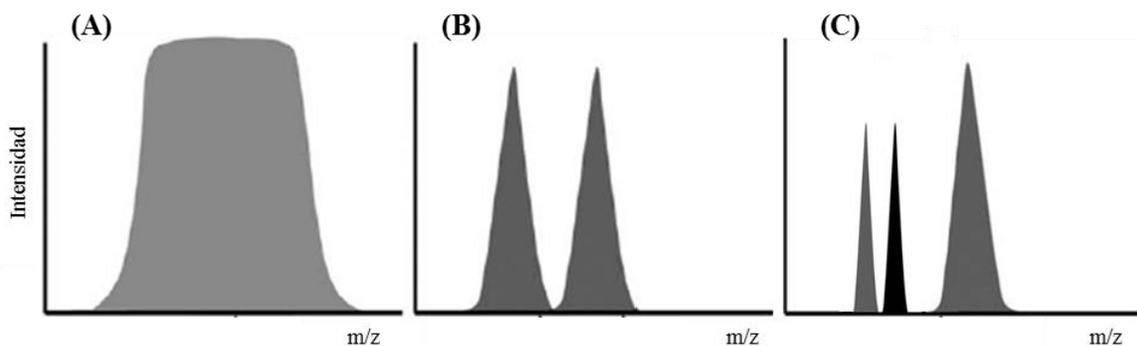
Hoy en día, en la configuración habitual de un DF-ICP-MS, los iones son extraídos del plasma y acelerados en la región óptica antes de entrar en el analizador. El SF, que es dispersivo respecto a la energía iónica y a la masa, enfoca todos los iones desde la rendija de entrada dándoles un radio de curvatura dependiente del campo aplicado, de su masa y de su velocidad. Luego, el ESA, que sólo es dispersivo respecto a la energía del ion, los enfoca de nuevo hacia la rejilla de salida, justo antes del detector.<sup>19</sup>

El primer equipo comercial de DF fue introducido en 1988 por la empresa VG con el nombre de *PLASMATRACE I*, con una configuración de Nier-Johnson inversa. En función de la amplitud de la rejilla, el poder de resolución podía regularse entre 400 y 8000, y tenía dos tipos de detectores diferentes para la medida de componentes mayoritarios (copa de Faraday) o para la detección de trazas o ultra trazas (EM). Sin embargo, el mayor hito en los equipos de DF, fue el desarrollo del *ELEMENT* por Finnigan MAT (hoy parte de Thermo Fisher Scientific) en 1993. Este equipo tenía una configuración inversa, además de otras mejoras respecto al potencial de aceleración aplicado. Su tamaño compacto, el bajo coste respecto a los equipos anteriores, así como sus cualidades técnicas supusieron un gran éxito. De hecho, la mayoría de las aplicaciones de DF-ICP-MS para el análisis de materiales biológicos fueron publicadas usando este equipo.<sup>51</sup> Ofrecía tres opciones de resolución: 300, 4000 y 10 000 (menor apertura de la rejilla, mayor resolución), y un único detector EM que permitía trabajar en modo pulsado o analógico, en función de la concentración de los analitos. A partir de entonces empezaron a introducirse en el mercado diferentes modelos de equipo como el modelo *Element 2* y el *Element 2/XR*.

## A. INTRODUCCIÓN

---

Como ya se ha comentado, el poder de resolución de este equipo permite la corrección de la mayoría de las interferencias espectrales. Respecto a la SA, esta será más favorable trabajando en alta resolución, llegando a valores de  $10^{-7}$ . En la Figura A.1.10. se describe la separación de una interferencia simulada al aumentar el poder de resolución que se esté empleando.



**Figura A.1.10.** La figura muestra un esquema de las medidas en baja (A), media (B) y alta resolución (C). Las medidas donde existe interferencia aparecen en gris (A, B). La detección libre de interferencias del analito aparece en negro (C). (Adaptada de Jakuwoski y colaboradores<sup>50</sup>).

### A.1.4.3.3.3. El ICP-QQQ.

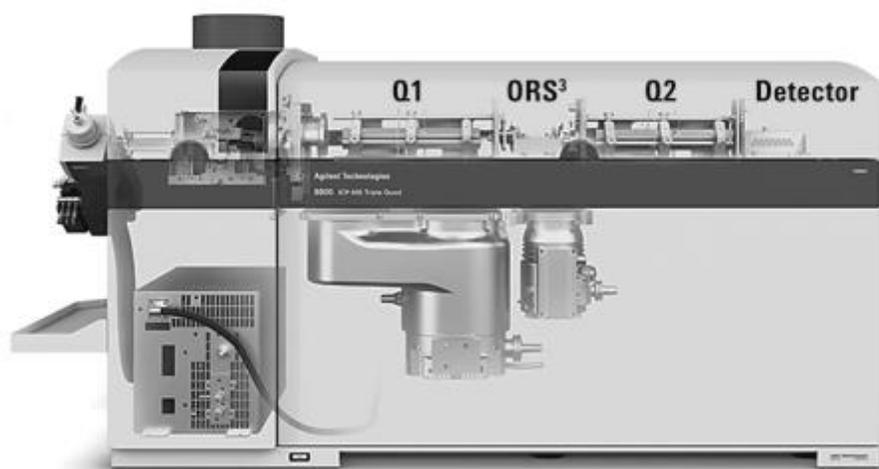
#### *Fundamentos*

Hacia el final de los años 80 del siglo pasado, en pleno desarrollo de las celdas de colisión, Douglas evaluó la posibilidad de usar MS/MS como estrategia para la eliminación de interferencias poliatómicas en ICP-MS.<sup>52</sup> Desafortunadamente, las condiciones de trabajo utilizadas también favorecían la transferencia de carga del analito, empeorando la sensibilidad y con ello la detección. Como consecuencia, el desarrollo de la estrategia ICP-MS/MS quedó relegada en favor de la CRC en equipos de un único cuadrupolo<sup>37</sup> hasta el año 2012.

El ICP-QQQ es el primer triple cuadrupolo desarrollado para los equipos ICP-MS. Fue comercializado por primera vez por Agilent bajo el nombre *8800 Triple Quadrupole ICP-MS* (también denominado ICP-MS/MS). De acuerdo con la IUPAC,<sup>5</sup> el término *triple cuadrupolo* se aplica al espectrómetro de masas en tándem que comprende dos espectrómetros de masa de transmisión cuadrupolar colocados en serie, con un único cuadrupolo (u otro multipolo) entre ellos que no actúa como

selector de masa, sino como celda de colisión. En el ICP-QQQ los dos cuadrupolos se encuentran separados por una ORC<sup>3</sup>(u ORS<sup>3</sup>, *Octapole Reaction System*)<sup>iv</sup> cuya guía de iones es un octapolo.

La principal característica de la configuración de este equipo es que, teniendo el poder de resolución habitual en un ICP-QMS (0.7-1.0 u), permite un control único de las interferencias. Como se había comentado al hablar de las CC y CR, estas tienen una serie de ventajas e inconvenientes asociadas a cada modo de trabajo. Aunque el modo de reacción permite el análisis a nivel de ultra-trazas, los resultados pueden ser erráticos debido a productos indeseados que se formen en la celda y sobre los que no se pueda ejercer un control más exhaustivo. Es precisamente la configuración MS/MS la que permite controlar lo que ocurre en la celda optimizando el funcionamiento del modo reacción. En la Figura A.1.11. aparece un esquema del equipo en el que se puede observar dicha configuración.



**Figura A.1.11.** Configuración de un equipo 8800 ICP-QQQ: Q1-ORS<sup>3</sup>-Q2-Detector.<sup>53</sup>

### *Eliminación de interferencias en el ICP-QQQ*

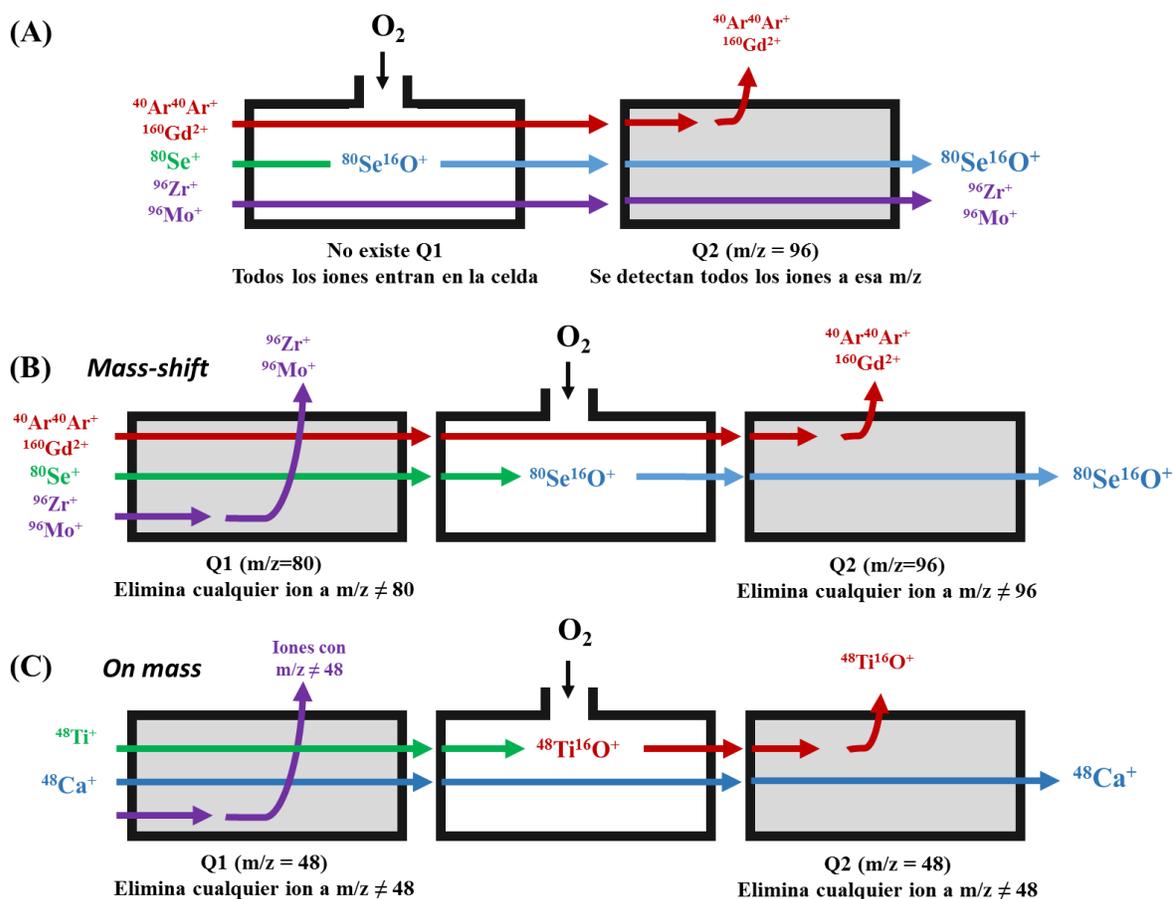
La principal diferencia del ICP-QQQ respecto a un equipo SQ (*Single Quad*, un Q), es la presencia de un primer Q (Q1) que funciona como un filtro de masas real y que únicamente permite el paso a la celda (ORC) de las masas seleccionadas previamente, eliminando todas las demás. Esto mejora el

---

<sup>iv</sup> El superíndice que aparece en el término ORC<sup>3</sup>, indica únicamente la mejora sobre la ORC inicial, es decir; ORC de tercera generación.

## A. INTRODUCCIÓN

modo de colisión tradicional en SQ, pero la mayor ventaja se obtiene al trabajar en modo reacción, ya que se limita la formación de nuevas interferencias en la celda mediante el control de los componentes de la matriz que entran en la misma. En la Figura A.1.12. se compara la eliminación de las interferencias de un equipo SQ con celda de reacción (y  $O_2$  como gas reactivo) con un QQQ.



**Figura A.1.12.** (A) Eliminación de las interferencias en un ICP-QMS típico equipado con una CR. En la celda entra el analito (Se) así como cualquier otro ion. El  $^{80}Se^+$  reacciona con el  $O_2$  para formar  $^{80}Se^{16}O^+$ , que se detectará a  $m/z=96$ , al igual que otras especies con la misma  $m/z$ . (B) y (C) Eliminación de interferencias en un QQQ. (B) En el Q1 se filtra únicamente la  $m/z$  original del analito ( $^{80}Se^+$ ) que entrará en la celda junto con sus interferencias isobáricas. Reaccionará con el  $O_2$ , siendo su  $m/z$  resultante la seleccionada en el Q2 y eliminándose el resto. (C) En Q1 se selecciona la  $m/z$  del analito ( $^{48}Ca^+$ ), que en este caso no reacciona en la celda, pero sí su interferencia isobárica, eliminándose en el Q2 al seleccionar en él la misma  $m/z$  que en el Q1.

En ICP-QMS, todos los componentes de la matriz que se han ionizado en el plasma pasan a la celda de reacción, en la cual se hace reaccionar al analito con el gas de reacción (p.ej.  $O_2$ ). La  $m/z$  de nuestro analito tras la reacción es seleccionada en el analizador (Q), pero al no tener control sobre la entrada en la celda, cualquier elemento presente en la matriz podría reaccionar también de forma

inespecífica dando lugar a nuevas interferencias que pudieran solapar en  $m/z$  con nuestro analito y llegando, por tanto, al detector. Por este motivo, el éxito de las celdas de reacción está condicionado por la capacidad de controlar las reacciones que ocurren en su interior, las cuales están afectadas por la complejidad de la matriz, así como por su composición.

Al existir un analizador Q1, existe un control absoluto sobre lo que entra en la celda. De esta forma, únicamente aquello que tenga la  $m/z$  del analito pasará a ella. Ya en la celda, el analito reacciona con el gas de reacción (p.ej.  $O_2$ ), originándose la  $m/z$  producto que va a ser seleccionada en el Q2. Es decir, existen dos filtros de selección; el Q1 donde se eliminan las interferencias derivadas de la matriz, y el Q2 que permite eliminar productos indeseados procedentes de reacciones inespecíficas de la ORS, permitiendo así un análisis exacto y preciso, consistente e independiente de la matriz y el tipo de muestra.

A primera vista, el beneficio de usar el modo MS/MS para elementos no interferidos podría considerarse incierto. Sin embargo, existe otro caso en el que esta configuración puede ser incluso más ventajosa. Anteriormente ya se había hablado de las interferencias debidas a los efectos de cola, así como su relación con la SA. El valor habitual en los equipos de Q está torno a  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ . En el modo MS/MS, el valor de SA se calcula como el producto de la SA en el Q1 y la SA del Q2, lo que da un valor de entre  $10^{-10}$  y  $10^{-14}$ .<sup>54</sup> Este valor es de los más bajos obtenidos para analizadores de MS, permitiendo la eliminación del solapamiento de elementos mayoritarios sobre los contiguos, lo que permite la determinación de elementos a niveles de traza como, por ejemplo, el  $^{55}\text{Mn}$  en sangre, que está interferido por la cola de  $^{56}\text{Fe}$ .<sup>55</sup>

### *Modos de trabajo*

En función de las necesidades analíticas, y características particulares de la naturaleza del analito, pueden emplearse dos modos de trabajo diferentes: modo *on-mass*, y modo *mass-shift* (términos originales).

- Modo *mass-shift*: El analito con  $m_1/z$  se hace reaccionar en la celda, obteniéndose un ion producto a  $m_2/z$ , separándolo de las interferencias originales. Figura A.1.12. (B).

## A. INTRODUCCIÓN

---

- Modo *on-mass*: en este caso la  $m/z$  original del analito es seleccionada tanto en Q1 como en Q2, siendo desplazadas en la celda sus interferencias mediante reacción con un gas. Figura A.1.12. (C).

El modo de trabajo dependerá de la naturaleza del elemento, así como de sus interferencias. En función de la entalpía de reacción de los elementos respecto del gas de reacción en las condiciones específicas de la celda, estos reaccionarán total o parcialmente (o no reaccionarán en absoluto) con el gas.<sup>56</sup> Dependiendo de si la reacción está más favorecida para el analito o el interferente, se optará por el modo *mass-shift*, o el modo *on-mass* respectivamente.

Además de los dos modos anteriores, el equipo también permite trabajar en *modo SQ*, de forma similar a como lo hace un ICP-QMS, pero utilizando el Q1 simplemente como una guía de iones. Una variación sobre este modo de trabajo es configurar el Q1 para que funcionen como un paso de banda (*bandpass*) que permita pasar un rango de masa concreto (por ejemplo, de  $m/z=32$  a  $m/z=48$ ). Este modo ha sido evaluado y comparado con el modo SQ y MS/MS por Balcaen y colaboradores.<sup>57</sup> Aunque el modo *bandpass* mejora los resultados que se obtienen con un equipo de un único cuadrupolo, sigue existiendo contribución de iones interferentes a la medida, por lo que sólo en modo MS/MS se obtienen realmente resultados de cuantificación exactos.

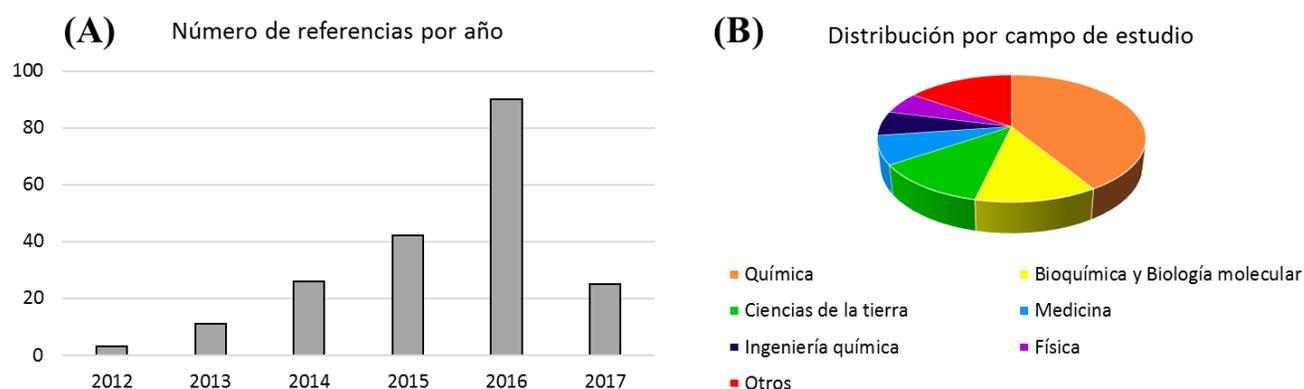
La configuración estándar del equipo permite la entrada de al menos 4 gases diferentes a la celda en función de si se trabaja en modo reacción o colisión: He, H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y O<sub>2</sub>. En la literatura existen numerosas referencias que proponen metodologías con diferentes gases de reacción en función de la matriz y el elemento a analizar. Sin embargo, al disponer de una nueva configuración que incluye un Q1, se pueden evaluar diversas estrategias para poder explorar la reactividad de los iones en estas nuevas condiciones de medida. A continuación, se comentan brevemente tres estrategias de trabajo típicas de los QQQ:

- Modo "*ion product*" (*product ion scan*): normalmente se lleva a cabo para explorar la reactividad de un analito en la celda con un determinado gas y seleccionar la  $m/z$  más adecuada para su detección. El ion de interés se fija en el Q1, el cual pasa a la celda presurizada con un gas. En el Q2 escanea a lo largo de todo el rango de masas.

- *Modo “ion precursor” (precursor ion scan)*: se suele utilizar para elucidar el origen de una determinada especie (ion) que aparece tras la reacción en la celda. En este caso es Q2 el que fija la  $m/z$  resultante y el Q1 se utiliza en modo de escaneo del rango de masas.
- *Modo “ganancia neutra” (neutral gain scan)*: este modo consiste en fijar una diferencia de  $m/z$  entre Q1 y Q2, y que todos los iones detectados tengan la misma diferencia de masa con respecto al ion precursor. Es útil, por ejemplo, para comprobar la detección libre de interferencias de varios isótopos de un elemento.

### Perspectivas

La introducción de la configuración *MS/MS (QQQ)* en ICP-MS ha supuesto un hito en la historia de la eliminación de interferencias en la MS elemental. Aunque solo lleva en el mercado 4 años, el número de publicaciones relativas al equipo ha ido incrementándose exponencialmente año tras año tal y como se puede ver en la Figura A.1.13. Respecto al campo de aplicación la mayor parte de los trabajos están englobados todavía dentro de la química, aunque su enorme potencial en análisis químico hace prever un incremento seguro, creciente y de gran impacto en el resto de campos que necesitan del análisis químico elemental.



**Figura A.1.13.** A) Número de referencias sobre el ICP-QQQ. B) Distribución de las referencias por campo de estudio. (Consultado en *Scopus* el 17/03/2017. Términos de búsqueda: ICPQQQ, ICP-QQQ, ICP-MS/MS. Todos los documentos).

La capacidad de eliminación de interferencias espectrales ha supuesto una gran ventaja especialmente para determinados elementos cuya detección se había visto dificultada bien por su propia naturaleza o por la complejidad/composición de la matriz en la que aparece. Por ejemplo,

## A. INTRODUCCIÓN

---

As, Se, S y P son elementos tradicionalmente presentes en biomoléculas y que presentan altos potenciales de ionización, así como numerosas interferencias poliatómicas. Actualmente, estos elementos son objetivo primordial en el desarrollo de aplicaciones. Algunos ejemplos son la determinación de S en matrices orgánicas<sup>57</sup>, especiación de selenoproteínas<sup>58</sup>, o la determinación de As<sup>59</sup> en la industria alimentaria. Gran parte de estas aplicaciones se desarrollan utilizando como gas de reacción el O<sub>2</sub>. Sin embargo y aunque no tengan entrada específica a la celda, también están empezando a desarrollarse nuevas estrategias utilizando CH<sub>3</sub>F o N<sub>2</sub>O como gases de reacción<sup>54</sup>. Dada la ventajosa configuración sería de esperar que en los próximos años el uso de este equipo se generalice convirtiéndose en una novedosa estrategia versátil y eficaz para la eliminación de interferencias.

---

### A.1.5. Bibliografía.

---

- <sup>1</sup> Murray, K.K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; Langley, G. J.; Li, L. y Naito, Y.; Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry*, 85, p. 1515–1609. (2013). DOI: 10.1351/PAC-REC-06-04-06.
- <sup>2</sup> Skoog, D. A. y Leary, J. J.; *Análisis Instrumental* (4ª ed.). Ed. McGraw-Hill. (1994). ISBN: 84-481-0191-X.
- <sup>3</sup> *The International System of Units (SI)* (8<sup>th</sup> ed.). Ed. International Bureau of Weights and Measures. (2006). ISBN: 92-822-2213-6.
- <sup>4</sup> Cooks, R. G. y Rockwood, A. L.; The 'Thomson' - A suggested unit for mass spectroscopists. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5, p. 93. (1991).
- <sup>5</sup> *Compendium of Chemical Terminology. Gold Book*. IUPAC. (2014) <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>.
- <sup>6</sup> Menchaca Rocha, A.; El discreto encanto de las partículas elementales. <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/068/htm/discreto.htm> (consultada el 01/08/2016).
- <sup>7</sup> Nagel, M.; Frederick Soddy: from alchemy to isotopes. *Journal of Chemical Education*, 59, p. 739-740. (1982). DOI: 10.1021/ed059p739.
- <sup>8</sup> Squires, G.; Francis Aston and the mass spectrograph. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 23, p. 3893-3899. (1998). DOI: 10.1039/A804629H.
- <sup>9</sup> Grayson, M. A.; *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*. Chemical Heritage Press. Ed. Philadelphia. (2002). ISBN: 0-941901-31-9.
- <sup>10</sup> García Alonso, J. I. y Rodríguez González, P.; *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Ed. Royal Society of Chemistry Publishing. (2013). ISBN: 978-1-84973-333-5.
- <sup>11</sup> Griffiths, I. W.; J. J. Thomson – The centenary of his discovery of the electron and of his invention of Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11, p. 2-16. (1997). DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19970115)11:1<2::AID-RCM768>3.0.CO;2-V.
- <sup>12</sup> Thomson, J. J.; XXIV. On the structure of the atom: an investigation of the stability and periods of oscillation of a number of corpuscles arranged at equal intervals around the circumference of a circle; with application of the results to the theory of atomic structure. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science [Sixth Series]*, 7. (1904).
- <sup>13</sup> Makarov, A.; Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72, p. 1156–1162. (2000). DOI: 10.1021/ac991131p.
- <sup>14</sup> Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L. y Taylor, C. E; Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 52, p. 2283-2289. (1980). DOI: 10.1021/ac50064a012.
- <sup>15</sup> Sanz-Medel, A.; Montes-Bayón, M. y Fernández Sánchez, M. L.; Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, p. 236-247. (2003). DOI: 10.1007/s00216-003-2082-z.
- <sup>16</sup> Jenner, G. A.; Longerich, H. P.; Jackson, S. E. y Fryer, B. J.; ICP-MS — A powerful tool for high-precision trace-element analysis in Earth sciences: Evidence from analysis of selected U.S.G.S. reference samples. *Chemical Geology*, 83, p. 133-148. (1990). DOI: 10.1016/0009-2541(90)90145-W.
- <sup>17</sup> Huelga-Suárez, G.; Díez-Fernández, S.; Moldovan, M.; Pardiñas, A. F.; López, B. y García Alonso, J. I.; The quest for the soldier's rest: combining anthropological and archaeochemical approaches to study social and occupational diversity in the medieval graveyard of San Andrés de Arroyo (Palencia, Spain). *Anthropological Science. The Anthropological Society of Nippon*, 124, p. 169-184. (2016). DOI: 10.1537/ase.161005.
-

## A. INTRODUCCIÓN

---

- <sup>18</sup> Taylor, H. E.; *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Practices and Techniques*. Ed. Academic Press (2000). ISBN: 978-0126838657.
- <sup>19</sup> Thomas, R.; *Practical Guide to ICP-MS*. Ed. Marcel Dekker, Inc. (2004). ISBN: 0-8247-5319-4.
- <sup>20</sup> Becker, J. S.; *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Ed. John Wiley and Sons, Ltd. (2007). ISBN 978-0-470-01200-0.
- <sup>21</sup> *ICP-MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – A Primer*. Agilent Technologies, Inc. (2005). PN: 5989-3526EN.
- <sup>22</sup> Pereira Navaza, A.; *Cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos mediante la integración de espectrometría de masa elemental y molecular*. Directores: Alfredo Sanz Medel y Jorge Ruiz Encinar. Dpto. Química Física y Analítica. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. (2009). <http://hdl.handle.net/10651/14959>.
- <sup>23</sup> Vanhaecke, F. y Degryse, P. *Isotopic Analysis. Fundamentals and Applications Using ICP-MS*. Ed. Wiley-VCH. (2012). ISBN: 978-3-527-32896-3.
- <sup>24</sup> Gross, J. H.; *Mass Spectrometry: A textbook*. Ed. Springer. (2004). ISBN-10 3-540-40739-1.
- <sup>25</sup> Prohaska, T.; Irrgeher, J.; Zitek, A. y Jakubowski, N. *Sector Field Mass Spectrometry for Elemental and Isotopic Analysis*. Ed. Royal Society of Chemistry. (2014). ISBN: 978-1-84973-392-2.
- <sup>26</sup> Boulyga, S. F. y Becker, J. S.; Improvement of abundance sensitivity in a quadrupole-based ICP-MS instrument with a hexapole collision cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, p. 1202-1206. (2002). DOI: 10.1039/B203086C.
- <sup>27</sup> Hoffman de, E. y Stroobant, V.; *Mass Spectrometry Principles and Applications* (3<sup>rd</sup> ed.) Ed. John Wiley and Sons, Ltd. (2007) ISBN: 978-0-470-03310-4 1.
- <sup>28</sup> Dams, R. F. J.; Goossens, J. y Moens, L.; Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchimica Acta*, 119, p. 277-286. (1995). DOI: 10.1007/BF01244007.
- <sup>29</sup> Olivares, J. A. y Houk, R. S.; Suppression of analyte signal by various concomitant salts in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 58, p. 20-25. (1986). DOI: 0.1021/ac00292a008.
- <sup>30</sup> Thompson, J. J. y Houk, R. S.; A study of internal standardization in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 41, p. 801-806. (1987). DOI: 10.1366/0003702874448265
- <sup>31</sup> ] Saxberg, B. E. H. y Kowalski, B. R.; The generalized standard addition method. *Analytical Chemistry*, 51, p.1031-1038. (1979). DOI: 10.1021/ac50043a059.
- <sup>32</sup> Goossens, J.; de Smaele, T.; Moens, L. y Dams, R.; Accurate determination of lead in wines by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 347, p. 119-125. (1993). DOI: 10.1007/BF00322842.
- <sup>33</sup> Celo, V.; Dabek-Zlotorzynska, E.; Zhao, J.; Okonskaia, I. y Bowman, D.; An improved method for determination of lanthanoids in environmental samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with high matrix introduction system. *Analytica Chimica Acta*, 706, p. 89-96. (2011). DOI: 10.1016/j.aca.2011.08.024.
- <sup>34</sup> Jakubowski, N.; Moens, L. and Vanhaecke, F.; Sector field mass spectrometers in ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 53, p. 1739-1763. (1998). DOI: 10.1016/S0584-8547(98)00222-5.
- <sup>35</sup> Almeida, C. M. y Vasconcelos, M. T. S. D.; ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, p. 607-611. (2001). DOI: 10.1039/B100307K.
- <sup>36</sup> Henshaw, J. M.; Heithmar, E. M. y Hinners, T. A.; Inductively coupled plasma mass spectrometric determination of trace elements in surface waters subject to acidic deposition. *Analytical Chemistry*, 61, p. 335-342. (1989). DOI: 10.1021/ac00179a011.
- <sup>37</sup> Rowan, J. T.; y Houk, R. S.; Attenuation of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry by gas-phase collisions. *Applied Spectroscopy*, 43, p. 976-980. (1989). DOI: 10.1366/0003702894204065.
- <sup>38</sup> Nakazato, T.; Tao, H.; Taniguchi, T. y Isshiki, K.; Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques. *Talanta*, 58, p. 121-132. (2002). DOI: 10.1016/S0039-9140(02)00261-8.

- <sup>39</sup> Koppelaar, D. W.; Eiden, G. C. y Barinaga, C. J.; Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 561-570. (2004). DOI: 10.1039/B403510K.
- <sup>40</sup> Bandura, D. R.; Baranov, V. I. y Tanner S.D.; Reaction chemistry and collisional processes in multiple devices for resolving isobaric interferences in ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370, p. 454-470. DOI: 10.1007/s002160100869.
- <sup>41</sup> Tanner, S. D.; Baranov, V. I. y Bandura, D. R.; Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, p. 1361-1452. DOI: 10.1016/S0584-8547(02)00069-1.
- <sup>42</sup> *Comparing collision/reaction cell modes for the measurement of interfered analytes in complex matrices using the Agilent 7700 Series ICP-MS. Technical Overview*. Agilent Technologies, Inc. (2009). PN: 5990-3236EN.
- <sup>43</sup> Tanner, S. D. y Baranov, V. I.; A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). II. Reduction of interferences produced within the cell. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10 pp. 1083-1094. (1999). DOI: 10.1016/S1044-0305(99)00081-1.
- <sup>44</sup> Feldmann, I., Jakubowski, N. y Stuewer, D.; Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS Part I: Instrumental aspects and operational optimization. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 365, p. 415-421. (1999). DOI: 10.1007/s002160051633.
- <sup>45</sup> Eiden, G. C.; Barinaga, C. J. y Koppelaar, D. W.; Beneficial ion/molecule reactions in elemental mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11: p. 37-42. (1997). DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19970115)11:1<37::AID-RCM815>3.0.CO;2-C.
- <sup>46</sup> Wilbur, S.; Softe, E. y McCurdy, E.; *Performance Characteristics of the Agilent 7500ce - The ORS Advantage for High Matrix Analysis*. Agilent Technologies, Inc. (2004). PN: 5989-1041EN.
- <sup>47</sup> Salazar, R. F.; Guerra, M. B.; Pereira-Filho, E. R. y Nóbrega, J. A.; Performance evaluation of collision-reaction interface and internal standardization in quadrupole ICP-MS measurements. *Talanta*, 30, 241-247. (2011). DOI: 10.1016/j.talanta.2011.09.009.
- <sup>48</sup> Linge, K. L. y Jarvis, K. E.; Quadrupole ICP-MS: Introduction to instrumentation, measurement techniques and analytical capabilities. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33, p. 445-467. (2009). DOI: 10.1111/j.1751-908X.2009.00039.x.
- <sup>49</sup> *Collision/Reaction Cells in ICP-MS. Cell Design Considerations for Optimum Performance in Helium Mode with KED*. Agilent Technologies, Inc. (2010). PN: 5990-5955EN.
- <sup>50</sup> Jakubowski, N.; Prohaska, T.; Rottmann, L. y Vanhaecke, F.; Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry. Part I. Tutorial: Fundamentals and instrumentation. *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry*, 26, p. 693-726. (2011). DOI: 10.1039/c0ja00161a.
- <sup>51</sup> Marchante-Gayón, J. M.; Double-focusing ICP-MS for the analysis of biological materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, p. 335-337. (2004). DOI: 10.1007/s00216-004-2623-0.
- <sup>52</sup> Douglas, D. J.; Some current perspectives on ICP-MS. *Canadian Journal of Spectroscopy*, 34, p. 38-49. (1989).
- <sup>53</sup> Lee, A.; Yang, V.; Hsu, J.; Wu, E.; Shih, R. y Mizobuchi, K.; *Ultrapure measurement of calcium in ultrapure water using the Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS*. Application Note, Agilent Technologies, Inc. (2012). PN: 5991-1693EN.
- <sup>54</sup> Balcaen, L.; Bolea-Fernández, E.; Resano, M. y Vanhaecke, F.; Inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra) trace elements-A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 894, p. 7-19. (2015). DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.053.
- <sup>55</sup> Liba, A.; Manganese analysis in whole blood: Expanding the analytical capabilities of ICP-MS. *Agilent 8800 ICP-QQQ Application Handbook*, p. 74-76. Agilent Technologies, Inc. (2013). PN: 5991-2802EN.
- <sup>56</sup> *Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS: Understanding Oxygen Reaction Mode in ICP-MS/MS, Technical Overview*. Agilent Technologies, Inc. (2012). PN: 5991-1708EN.
- <sup>57</sup> Balcaen, L.; Woods, G.; Resano, M. y Vanhaecke, F.; Accurate determination of S in organic matrices using isotope dilution ICP-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28, p. 33-39. (2013). DOI: 10.1039/C2JA30265A.

## A. INTRODUCCIÓN

---

<sup>58</sup> Christian L. Deitrich, C. L.; Cuello-Nuñez, S.; Kmiolek, D.; Torma, F. A.; del Castillo Busto, M. E.; Fisticaro, P. y Goenaga-Infante, H.; Accurate quantification of selenoprotein P (SEPP1) in plasma using isotopically enriched seleno-peptides and species-specific isotope dilution with HPLC coupled to ICP-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 88, p 6357–6365. (2016). DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00715.

<sup>59</sup> Jackson, B. P.; Liba, A. y Nelson, J.; Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, p. 1179-1183. (2015). DOI: 10.1039/C4JA00310A.

*"Nothing ~~in biology~~ makes sense except in the light of evolution"*

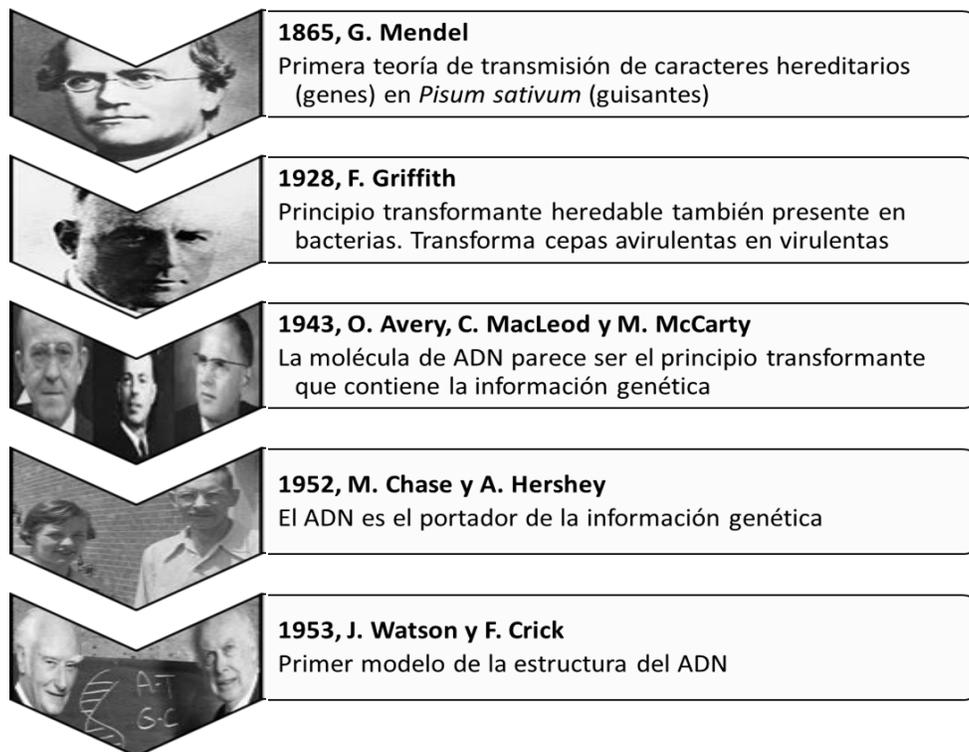
*Theodosius Dobzhansky*



## A.2. PROTEÓMICA.

### A.2.1. Contexto histórico.

Una de las principales preocupaciones científicas durante el siglo pasado fue entender cómo y dónde se almacenaba la información que daba forma a un sistema biológico. El primero en postular la existencia de unas *unidades hereditarias discretas*, hoy denominadas *genes* (de. gr. *génos*, linaje), fue Gregor Mendel en sus conocidos experimentos sobre el color de los guisantes<sup>60</sup> durante el siglo XIX. Aunque en un primer momento los estudios de Mendel quedaron en el olvido, fueron rescatados en 1901, lo que llevó a la búsqueda de la identidad de esas unidades hereditarias. En la figura A.2.1., aparece un eje temporal en el que se mencionan algunos de los descubrimientos clave de la biología molecular relacionados con esta búsqueda.



**Figura A.2.1.** Eje temporal de algunos de los descubrimientos clave en la biología molecular. Griffith<sup>61</sup> postula la existencia de un principio transformante en cepas de bacterias que modifica el fenotipo de otras. Avery y colaboradores<sup>62</sup> asocian ese principio con los ácidos nucleicos. Chase y Hersey<sup>63</sup> confirman irrefutablemente los experimentos de Avery. Watson y Crick<sup>64</sup> presentan el modelo estructural del ADN.

## A. INTRODUCCIÓN

---

El punto de inflexión fue cuando, en 1953, Watson y Crick, publicaron un modelo para la estructura del ADN.<sup>64</sup> Para ello se basaron en las leyes de Chargaff<sup>65</sup> sobre la complementariedad de bases en la molécula de ADN y en los estudios cristalográficos de R. Franklin<sup>66</sup> y M. Wilkins (Figura A.2.2.). La sugerencia de este modelo no era sólo un hito en sí misma, sino que, tal y como ellos mismos indican en su publicación: “no escapa a nuestro conocimiento que el apareamiento específico (de bases) que hemos postulado, sugiera inmediatamente un posible mecanismo de copia para el material genético”<sup>i</sup>. Este *mecanismo de copia*, basado en la creación de una nueva hebra hija utilizando de molde una hebra madre, fue finalmente descrito por M. Meselson y F. Stahl,<sup>67</sup> apenas 3 décadas después de los experimentos de Griffith.<sup>61</sup>



**Figura A.2.2. De izquierda a derecha.** Fotografía 51, análisis por difracción de rayos X de la molécula de ADN (R. Franklin, R. Gosling, King's College London, 1953).<sup>66</sup> Watson y Crick con un modelo de la estructura de ADN (Antony Barrington Brown, 1953).

El descubrimiento de la estructura del ADN llevó en los años siguientes a describir los procesos de transcripción y traducción a proteínas, así como a relacionar errores en estos procesos con diferentes estados patológicos. La culminación del proceso llegó en el año 2001 con la publicación del genoma humano.<sup>68</sup> Desde entonces, los avances en bioquímica, biología molecular y genética nos han permitido desvelar grandes interrogantes acerca de nuestro funcionamiento y naturaleza.

---

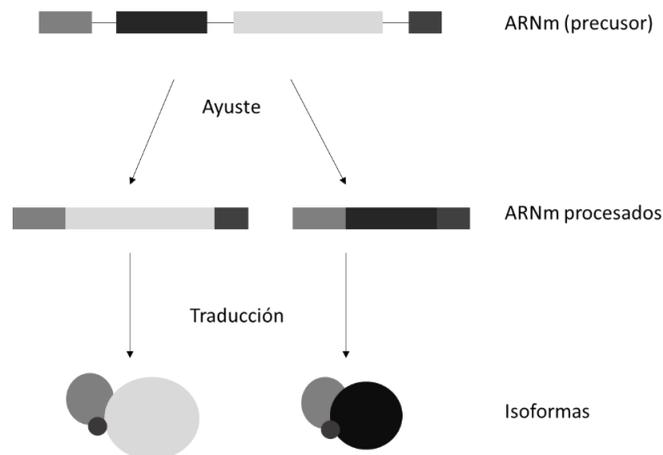
<sup>i</sup> Traducido del *ingl.* It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Además, nos han dado la capacidad de manipularla, llegando incluso a clonar organismos, o a diseñar y crear otros nuevos.<sup>69</sup>

### **A.2.2. Cuando la información genética se traduce: la complejidad del proteoma.**

Las proteínas (del gr. *prōteîos*, preeminente) son macromoléculas de gran complejidad formadas por subunidades denominadas aminoácidos, las cuales están unidas entre sí por enlaces de tipo peptídico. Estas macromoléculas son las encargadas de llevar a cabo la mayor parte de las funciones biológicas entre las cuales se encuentran la regulación de la expresión génica, procesos de catálisis, función inmunológica y control de los procesos celulares en general (diferenciación, división, apoptosis, etc.). El conjunto de proteínas expresadas en un momento concreto y en una célula en particular se denomina *proteoma*<sup>ii</sup>.

Las proteínas son el resultado de la traducción (previa transcripción del ADN en ARN mensajero) del genoma codificante, sin embargo, mientras que el número de genes codificantes en el ser humano se estima en torno a 30 000, procesos tales como el ajuste en el ARN mensajero (también denominado *splicing*) o en las propias proteínas, hacen que el número total de las mismas supere el millón.<sup>68</sup> En la Figura A.2.3 aparece un esquema de este proceso.



**Figura A.2.3.** Proceso de ajuste en el ARNm (ARN mensajero). El ARN es sometido a un proceso de corte diferencial de las unidades que lo constituyen dando lugar a variaciones del mismo, que al traducirse de lugar a diferentes proteínas o a distintas variaciones de la misma (isoformas).

<sup>ii</sup> Este concepto fue introducido por el genetista Marc Wilkins, durante la I Conferencia de Siena en 1994.

## A. INTRODUCCIÓN

---

Más allá de las posibles mutaciones que se den en un organismo, su genoma se considera constante en el tiempo. Sin embargo, no lo es su regulación y expresión, lo que conlleva que el proteoma varíe ostensiblemente respecto a la abundancia y la variedad de las proteínas que lo componen, cambiando en relación al estado fisiológico del individuo o las variaciones en el entorno<sup>70</sup>. Además, las proteínas interactúan entre sí y con otros componentes del entorno, pudiendo promover la modificación de su estructura proteica incluso después de la traducción. Estas modificaciones son una de las principales causas de la variabilidad y dinamismo del proteoma y se denominan modificaciones post-traduccionales (PTMs).<sup>71</sup>

### A.2.2.1. Las modificaciones post-traduccionales.

Las PTMs son modificaciones de naturaleza covalente que modifican la estructura de las proteínas mediante escisión proteolítica o mediante la modificación química de uno o más de sus residuos aminoacídicos. Estas modificaciones permiten a la célula regular su actividad localización e interacción con otras proteínas en respuesta a cambios en las condiciones ambientales externas o internas.<sup>71</sup> La naturaleza de estas modificaciones puede ser muy diversa y se han descrito hasta 200 tipos diferentes<sup>72</sup>. En la tabla A.2.1 se comentan algunas de las más conocidas.<sup>71,73</sup>

**Tabla A.2.1.** Tipo y función de algunas de las PTMs en eucariotas.

---

<b>PTM</b>	<b>Mecanismo/Función</b>
<b>Fosforilación</b>	Adición de un grupo fosfato a residuos de Ser, Thr o Tyr./ Activación y/o desactivación de la actividad enzimática, modulación de las interacciones moleculares, señalización molecular.
<b>Acetilación</b>	Adición de un grupo acetilo./ Estabilidad de la proteína, protección del extremo N-terminal, regulación de la interacción proteína ADN (p.ej., histonas). Regulación cruzada con otras PTMs.
<b>Glicosilación</b>	Adición de un glúcido a un residuo de Asn (N-Glicosilación) o a Thr/Ser (O-Glicosilación). Formación de la matriz celular, reconocimiento/señalización (epítomos).
<b>Sulfatación</b>	Adición de un grupo sulfo a un residuo de Tyr./ Interacciones proteína-proteína, adhesión molecular.
<b>Ubiquitinación</b>	Adición de una (o más) moléculas de la proteína ubiquitina a un residuo de Lys./ Marcaje proteico, señal para proteólisis en el proteosoma.

---

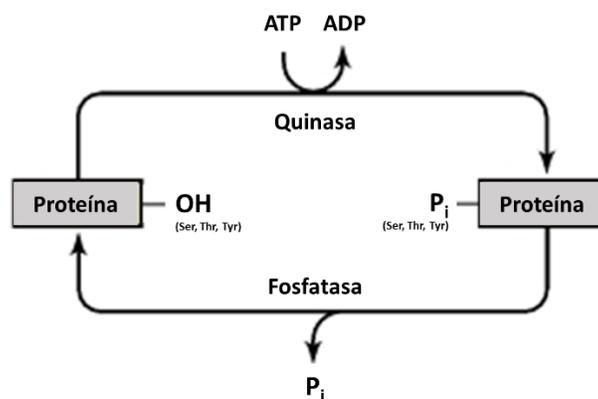
**AMPilación**

Adición de un AMP a partir de ATP a un residuo de Thr, Tyr y Ser(?)/. Mecanismo de regulación metabólica.

Dado que las PTMs no aparecen codificadas de forma aparente en el ADN ni en el ARN<sup>74</sup>, su determinación depende del análisis del proteoma.

**A.2.2.1.1. La fosfoproteómica**

De la selección de PTMs nombradas en el punto anterior, una de las más importantes y de las más estudiadas por sus implicaciones biológicas es la fosforilación. La fosforilación como mecanismo reversible de control de procesos celulares fue descubierta por Edmon Fisher y Edwin Krebs y publicado en 1964.<sup>75</sup> Es el mecanismo molecular más importante en la regulación de la actividad de las proteínas en respuesta a estímulos extracelulares. Virtualmente, cualquier tipo de señal extracelular incluyendo neurotransmisores, hormonas, señales luminosas, factores neurotróficos o citoquinas produce efectos fisiológicos mediante la regulación de la fosforilación de fosfoproteínas específicas en células diana. En el caso particular de las células eucariotas, la fosforilación tiene lugar únicamente en residuos de Ser, Thr y Tyr, cuando un grupo fosfato es donado por una molécula de adenosín trifosfato (ATP) y unido mediante enlace covalente a su grupo hidroxilo a través de la acción de una enzima quinasa. Esta modificación es reversible a través de la acción de una enzima fosfatasa.<sup>76</sup> En la figura A.2.4. aparece un esquema del proceso.



**Figura A.2.4.** Diagrama del proceso de fosforilación/defosforilación en células eucariotas (P<sub>i</sub>= grupo fosfato).

Se estima que aproximadamente un tercio de todas las proteínas en células eucariotas se encuentran fosforiladas en algún momento, aunque no todas las moléculas de la misma especie proteica tienen por qué estar fosforiladas de la misma manera. La distribución del grado de

## A. INTRODUCCIÓN

---

fosforilación no es idéntica en los tres aminoácidos implicados, si no que la relación es Ser: Thr: Tyr 1800:200:1 para el caso de una célula eucariota en vertebrados. Este hecho implica que la regulación a la que está sometida la fosforilación de Tyr es muy estricta. Además, mientras que la modificación de Ser y Thr es llevada a cabo por las mismas quinasas, la fosforilación de la Tyr está llevada a cabo por quinasas específicas, siendo estas aproximadamente un cuarto del total de quinasas disponibles.<sup>77</sup>

### ***A.2.3. El estudio del proteoma.***

Como se ha comentado, si bien la información obtenida a través de estudio del genoma es de vital importancia, los principales actores en todos los procesos celulares son las proteínas.

El análisis de proteínas es una herramienta esencial en laboratorios clínicos, en la industria farmacéutica y en la investigación médica, y supone una contribución fundamental para el entendimiento de la función génica. Sin embargo, el estudio del proteoma está caracterizado por su complejidad y los retos analíticos a los que se enfrenta. Las casi “infinitas” combinaciones posibles de los 20 aminoácidos disponibles confieren a cada proteína diferentes características físico-químicas. Además, existe una interacción continua entre ellas y pueden estar modificadas por PTMs, lo que aumenta las posibilidades de variaciones en su estructura y comportamiento <sup>78</sup>.

Otra de las grandes dificultades en el estudio del proteoma es la gran diferencia de concentraciones, que abarca un rango dinámico de diez órdenes de magnitud, a las que pueden encontrarse las proteínas. <sup>79</sup> En la Figura A.2.5. aparece una gráfica donde se ejemplifica claramente este hecho en el plasma humano, donde la concentración de las diferentes proteínas va desde los mg mL<sup>-1</sup> de la albúmina, hasta los pocos pg mL<sup>-1</sup> de interleucinas y biomarcadores.<sup>78</sup>

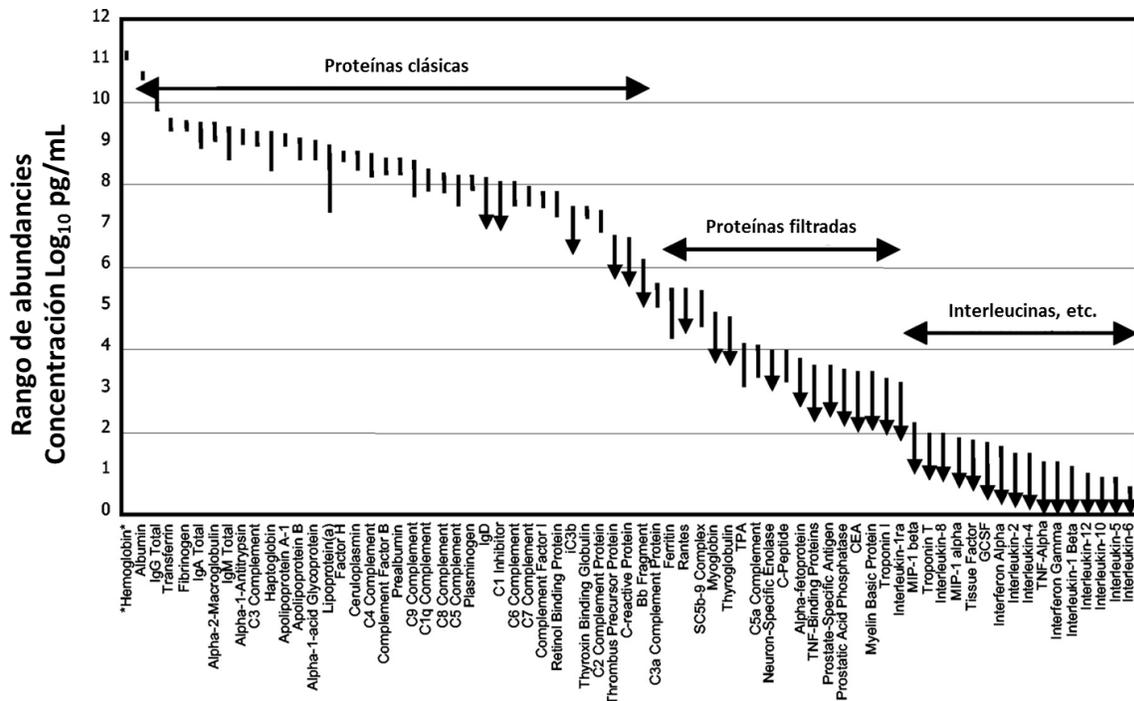


Figura A.2.5. Intervalos de referencia para 70 proteínas presentes en el plasma sanguíneo humano. (Adaptada de Anderson y Anderson<sup>80</sup>).

Los estudios relativos a las proteínas suelen enfocarse desde tres puntos de vista diferentes: la micro-caracterización para la identificación a gran escala de las proteínas existentes y sus PTMs, la determinación/cuantificación y posterior comparación de los niveles de proteínas en un contexto determinado, y el estudio de las interacciones proteína-proteína. En esta Tesis, se hará referencia únicamente a los dos primeros casos; la caracterización y la cuantificación.

### A.2.3.1. Métodos tradicionales.

Fue durante los años 70 del siglo pasado cuando se comenzaron a desarrollar bases de datos de proteínas, empleando para ello técnicas predominantemente bioquímicas. Una de estas técnicas era la electroforesis en gel bidimensional (*2D-electroforesis*),<sup>81,82</sup> basada a su vez en la electroforesis tradicional de una única dimensión. Esta técnica permite la separación de las proteínas en un gel (p.ej., poliacrilamida) basándose en dos propiedades diferentes de las mismas (p.ej., el punto isoeléctrico y la masa), asumiéndose que existe una baja probabilidad de que dos proteínas tengan exactamente el mismo comportamiento para las dos propiedades. Sin embargo, esta metodología pronto se vio limitada por la falta de sensibilidad para las proteínas en bajos niveles de

## A. INTRODUCCIÓN

---

concentración, así como por la ausencia de métodos para la caracterización rápida de las mismas. Así, para poder llevar a cabo una detección más específica y sensible, en 1979 surgió la técnica del *Western Blot*,<sup>83</sup> la cual se ha establecido desde entonces como una de las técnicas de referencia en el análisis de proteínas. Esta técnica consiste en transferir las bandas de proteínas (previamente separadas en un gel de electroforesis 1-D o 2-D) a una membrana, la cual se incuba con anticuerpos específicos. A pesar de sus numerosas ventajas, esta técnica posee la limitación de requerir de un conocimiento previo de la proteína, necesario para poder seleccionar los anticuerpos adecuados que son los que proporcionan realmente la especificidad del análisis (identificación).<sup>84</sup>

Una de las formas de obtener información acerca de las proteínas es a través de su secuenciación (determinación de la secuencia de aminoácidos), que permite identificarlas y, además, puede permitir prever características tales como configuración espacial o tamaño de las mismas. La técnica tradicional de secuenciación de proteínas es la denominada *degradación de Edman*. Esta técnica consiste en la degradación de péptidos mediante la reacción de un compuesto (fenilisotiocianato) con el grupo amino del residuo libre del extremo N-terminal, de tal forma que los aminoácidos se van separando uno a uno y son identificados individualmente como derivados de la feniltiohidantoína.<sup>85</sup> Este método tiene una serie de limitaciones, no pudiéndose llevar a cabo cuando el aminoácido N-terminal está bloqueado con alguna modificación (p.ej., acetilación). Además, a medida que se realizan más ciclos de separación de los aminoácidos, aumentan los errores en la identificación.

Además de los problemas generales que existen en el análisis de proteínas, el caso particular de fosfoproteínas y fosfopéptidos tiene una serie de complicaciones específicas asociadas a la presencia de la modificación.

Normalmente, la estequiometría de la fosforilación para una proteína es baja; es decir, no toda está fosforilada en los mismos residuos, al mismo tiempo y en el mismo grado, lo que también implica una alta heterogeneidad y una dificultad añadida para la detección de los sitios con menor grado de fosforilación. Además, debido a su papel en la regulación de cascada de transducción de señales, su abundancia está estrictamente regulada, por lo que suelen estar en muy baja concentración. Por último, es importante tener en cuenta que el ambiente celular en el que se encuentran las proteínas es rico en fosfatasa, por lo que a la hora de extraer las proteínas es necesario tomar precauciones para evitar pérdidas artificiales de la modificación.<sup>77,86</sup>

Una de las técnicas más empleadas tradicionalmente consiste en el *marcaje de proteínas con  $^{32}\text{P}$*  (*in vivo* o *in vitro*) a través de ATP marcado. Esta técnica suele combinarse con el uso de geles de electroforesis (1D o 2D), y permite comparar dos niveles de expresión de la fosforilación en dos estados celulares diferentes, mediante la detección del  $^{32}\text{P}$  radiactivo en las bandas de proteínas con un software específico. Sin embargo, a pesar de tener una gran sensibilidad, esta técnica tiene una serie de inconvenientes que han limitado su aplicabilidad. Por un lado, la eficiencia de marcaje puede no ser muy alta, ya que la muestra contiene ATP endógeno, lo que implica que sólo se pueda determinar la incorporación de la marca radiactiva, y no el grado total de fosforilación. Además, la técnica no permite determinar los sitios de fosforilación, a no ser que se haga un procesado posterior de las bandas y se secuencien mediante una degradación de Edman<sup>86</sup> o por MS molecular<sup>87</sup>. Por otro lado, la introducción de un isótopo radiactivo en un sistema vivo puede tener consecuencias fisiológicas que afecten al proceso de fosforilación, además de los riesgos que puede acarrear esta técnica al usuario que la esté llevando a cabo.<sup>88</sup>

Estas limitaciones llevaron al desarrollo de métodos alternativos, no radiactivos, basados en el uso de anticuerpos específicos contra aminoácidos fosforilados, como el Western Blot (empleado también en proteínas no fosforiladas). Sin embargo, y al igual que ocurre para el caso de las proteínas no fosforiladas, la disponibilidad y eficacia de este método depende de la disponibilidad y especificidad de los anticuerpos y, por tanto, de un conocimiento previo de la proteína.

Otras técnicas basadas también en el uso de geles, aunque quizás menos empleadas, son la *tinción directa* o el uso de tratamiento *fosfatasas*. La primera consiste en teñir las proteínas fosforiladas directamente sobre el gel utilizando para ello reactivos específicos. No obstante, estas técnicas suelen tener baja especificidad y sensibilidad. La segunda técnica se basa en la variación de la carga neta de las proteínas cuando están fosforiladas. En dos geles diferentes se separan los componentes de alícuotas de la misma muestra, habiéndose tratado previamente con fosfatasas una de ellas. De esta forma se consigue la defosforilación de las proteínas fosforiladas. Por comparación de ambos geles y, observando la variación en el patrón de migración, pueden identificarse de forma sencilla aquellas que estaban inicialmente fosforiladas<sup>84</sup>.

Aunque las técnicas anteriores siguen usándose a día de hoy, la tendencia actual es la sustitución de las metodologías tradicionales por aquellas basadas en la MS molecular. La razón de ello es que

son técnicas mucho más sensibles y permiten detectar, secuenciar, identificar y cuantificar. Además, pueden permitir el análisis directo de mezclas de proteínas, y ofrecen un mejor rendimiento<sup>78</sup>.

### A.2.3.2. La espectrometría de masas molecular.

La MS molecular emplea una fuente de ionización blanda cuyo poder de fragmentación de las moléculas no lleva a la atomización completa de la molécula (como ocurre en el ICP), si no que produce fragmentos moleculares (o no fragmenta la molécula en absoluto) que son posteriormente ionizados. Estas herramientas se comenzaron a desarrollar a partir de los años 80 del siglo XX con la aparición de la fuente ESI y la fuente MALDI para en análisis de biomoléculas (mencionadas en el apartado A.1.3. de la presente introducción), lo que abrió las puertas a un extraordinario desarrollo y avance en el campo de la proteómica y la fosfoproteómica.<sup>89,77</sup>

Brevemente, estas dos fuentes; ESI y MALDI, (las más empleadas en este campo<sup>71</sup>) ionizan las biomoléculas mediante transferencia de cargas por adición o eliminación de protones. Los analizadores asociados más habitualmente son el Q, el TOF, la trampa iónica y el más reciente Orbitrap. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en la MS elemental, el concepto de MS/MS está mucho más establecido, siendo hoy habituales las configuraciones instrumentales en tándem como ESI-QQQ, ESI-Q-TOF, MALDI-Q-TOF o MALDI-TOF-TOF.<sup>90</sup>

Habitualmente, ambas estrategias se suelen combinar con estrategias de separación previas como la electroforesis o la cromatografía, para facilitar y simplificar el análisis de las distintas especies. Además, y debido precisamente a la baja concentración a la que pueden encontrarse las proteínas (y sobre todo las fosforiladas) suelen realizarse pasos previos para pre-concentrar y/o enriquecer las diferentes especies a analizar,<sup>84</sup> tales como cromatografías de afinidad (p.ej. IMAC<sup>91</sup> o MOAC<sup>92</sup>) o inmunoprecipitaciones específicas.<sup>93</sup>

Existen dos estrategias principales con las que enfocar el análisis de las (fosfo)proteínas: la estrategia *top-down*, y la *bottom-up*. La *top-down* (de arriba abajo) consiste el análisis de las (fosfo)proteínas intactas, lo que permite determinar directamente su peso molecular. Sin embargo, el análisis directo de proteínas por MS conlleva implícitas una serie de dificultades. La separación o purificación de las proteínas intactas supone una pérdida de material superior al de los péptidos, ya que eluyen peor de la matriz de separación (fase estacionaria de las columnas de separación, geles, etc.). Además,

pueden ser más difíciles de ionizar y sobre todo de fragmentar. Por estos motivos, la aproximación más habitual es a través del análisis de los componentes peptídicos que se obtienen tras llevar a cabo una digestión enzimática (normalmente con tripsina) en lo que se conoce como estrategia *bottom-up* (*de abajo a arriba*). Además de eluir más fácilmente de las matrices o fases de separación, los péptidos se ionizan mejor, por lo que, en relación al análisis directo de proteínas, se puede obtener un hasta un orden más de sensibilidad.<sup>94</sup> Por otra parte, la determinación del peso molecular de algunos de los péptidos (*huella peptídica*) puede permitir la identificación inequívoca de la proteína analizada gracias a la existencia de las bases de datos bien establecidas hoy, mientras que a través de peso molecular de la molécula completa no siempre es posible.<sup>78,79</sup>

Además, el trabajo con péptidos facilita el proceso de secuenciación posterior por ESI-MS/MS, ya que es más sencillo trabajar con pequeñas cadenas de ~20 aminoácidos que con proteínas completas. Como ya se ha comentado, la fuente ESI es una fuente blanda, que permite la ionización de compuestos moleculares. Estos compuestos son dirigidos al analizador donde, por procesos de CID se producen diferentes fragmentos (a partir del ion original) que forman un *patrón de fragmentación*, que refleja de forma específica la estructura de la molécula original.<sup>95</sup>

Este hecho hace que se pueda obtener información estructural de las proteínas, así como determinar su secuencia y la localización de PTMs como la fosforilación, lo que puede permitir obtener información acerca su función biológica.<sup>96,97</sup>

En principio, la MS molecular es ideal para el análisis de la fosforilación ya que la presencia del grupo fosfato en un aminoácido da lugar a un incremento su peso molecular de 80 Da sobre su peso teórico sin la modificación. Sin embargo, es importante destacar que su análisis tiene una serie de particularidades.

A diferencia de lo que ocurre con la fuente ICP donde se asume que la señal obtenida puede ser independiente de la especie molecular y, además, independiente de la matriz, en MS molecular esto no es así. El grado de ionización depende no sólo de la especie, sino también de la matriz en la que se encuentre. Dado que en MS el modo de trabajo habitual se basa en la formación y detección de las especies ionizadas positivamente, la ionización de fosfopéptidos no está favorecida. Además, su señal puede estar interferida por la presencia de péptidos no fosforilados, que suelen encontrarse en mayor abundancia en la muestra. Por último, la determinación de la huella peptídica no

## A. INTRODUCCIÓN

---

proporciona directamente la secuencia del péptidos, sino su masa, por lo que la identificación de los sitios de fosforilación debe hacerse mediante secuenciación por MS/MS.<sup>77</sup>

A pesar de las dificultades inherentes a la técnica, los avances realizados con la MS molecular, han permitido que, a día de hoy, se hayan localizado más de 40 000 sitios de fosforilación en cerca del 75% del proteoma de una única célula.<sup>98</sup>

### **A.2.4. Análisis cuantitativo del proteoma.**

Como ya se ha mencionado, la presencia de una proteína, así como su abundancia, puede relacionarse directamente con variaciones en el entorno o estados patológicos del individuo. Se ha comprobado que los cambios en el estado fisiológico de un organismo producen, o son producidos, por cambios en el nivel de expresión de sus proteínas, y esta información se obtiene a través del análisis cuantitativo de las proteínas.<sup>70</sup> Por este motivo, el interés en la proteómica cuantitativa con respecto a los estudios tradicionales de carácter más cualitativo, ha crecido en los últimos años, favoreciendo el desarrollo de métodos de diagnóstico y pronóstico, a través de la identificación y cuantificación de biomarcadores<sup>iii</sup> proteicos. Existen dos procedimientos básicos de cuantificación:

- *Cuantificación relativa*: es la más empleada. Consiste en comparar dos estados biológicos diferentes, determinando la variación relativa de las proteínas entre ellos.
- *Cuantificación absoluta*: consiste en la determinación de la cantidad total de la proteína de interés (p.ej., en ng mL<sup>-1</sup>).

Las técnicas tradicionales mencionadas en el apartado anterior tienen el problema de que no permiten llevar a cabo una cuantificación fiable por la alta variabilidad que se asocia al empleo de geles, además de ser muy tediosas. Además, principalmente proporcionan información sobre las proteínas más abundantes, que no son necesariamente el objeto de estudio. En consecuencia, las técnicas basadas en MS han ido ganando terreno estableciéndose, de nuevo, como la herramienta analítica más utilizada para la cuantificación de proteínas.<sup>70,77,89</sup>

---

<sup>iii</sup> *Marcador biológico. Parámetro empleado para la identificación de una situación tóxica en un organismo y que puede emplearse como indicador de un evento o condición en un sistema biológico, o en una muestra, y que da una magnitud de exposición, efecto, o susceptibilidad*<sup>5</sup>.

### A.2.4.1. Cuantificación relativa.

Dada la dependencia con respecto a la matriz y a la especie analizada de la señal obtenida en MS molecular, la intensidad de la misma no es proporcional a la concentración de la proteína o péptido en la muestra. Esto implica que no puedan extraerse directamente datos cuantitativos de la señal obtenida. Por tanto, para poder llevar a cabo la cuantificación absoluta de las especies, es necesario disponer de patrones de cuantificación específicos, lo que es costoso y poco práctico. Por este motivo, la cuantificación relativa ha sido el enfoque mayoritario para el desarrollo de estrategias de cuantificación de proteínas.<sup>70,99,100</sup> A continuación, se comentarán dos tipos de estrategias de cuantificación relativa:

- Basadas en el tratamiento estadístico y bioinformático de los espectros obtenidos, como la *comparación de los perfiles de intensidad* (PIP; *Peptide Intensity Profiling*) o el *recuento espectral* (*spectral counting*).
- Basadas en el marcaje con isótopos estables (SIL; *Stable Isotope Labelling*) ya sea en cultivos *in vivo* o *in vitro*. Se basan en el hecho de que los isótopos de un mismo elemento tienen las mismas propiedades físico-químicas; es decir, los péptidos que contienen isótopos marcados (p.ej. <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O) se ionizan igual, pero poseen una m/z diferente a los no marcados, por lo que pueden diferenciarse en un espectro de masas<sup>iv</sup>. Por tanto, la estrategia es introducir péptidos marcados isotópicamente en la muestra original. De esta forma, se obtendrá un espectro que contenga dos señales desdobladas (una con marca y otra sin la marca) para los péptidos de interés. La cuantificación relativa se obtiene directamente al comparar la intensidad del péptido marcado con el péptido original. Si se da el caso de que el péptido marcado tiene una concentración conocida, la comparación con los péptidos de la muestra proporcionaría, además, su cuantificación absoluta. Las más conocidas son la técnica SILAC (*marcaje de aminoácidos con isótopos estables en células*), el marcaje del medio de cultivo con <sup>15</sup>N, la ICAT (*marcaje por afinidad con codificación isotópica*), o la iTRAQ (*marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa*).

---

<sup>iv</sup> Este hecho se cumple para la mayoría de isótopos empleados para el análisis cuantitativo en proteómica con la excepción del <sup>2</sup>H (deuterio) que, pese a ionizarse igual que el <sup>1</sup>H, confiere características especiales al compuesto que lo contiene, afectando al tiempo de retención del mismo en separaciones cromatográficas.

## A. INTRODUCCIÓN

En la tabla A.2.2. se describen estas técnicas de forma más detallada.

**Tabla A.2.2.** Principales técnicas de cuantificación relativa en MS molecular.

	Descripción	Ventajas/Inconvenientes
Sin marcaje	<p><b>PIP</b></p> <p>Comparación de la intensidad de los picos obtenidos (péptidos) tras el análisis por MS molecular.</p>	<p>Sencillo</p> <p>Rápido</p> <p>No implica coste adicional</p> <p>Alta probabilidad de error</p>
	<p><b>Recuento espectral</b><sup>95,101</sup></p> <p>Relaciona el espectro generado para un péptido con el número de copias presentes en la mezcla. Comparación entre espectros independientes mediante tratamiento estadístico (ANOVA, t-test)</p>	<p>Rápido</p> <p>No implica coste adicional</p> <p>Alta probabilidad de error si el tratamiento estadístico no es adecuado</p>
In vivo (marcaje metabólico)	<p><b>SILAC</b><sup>102</sup></p> <p>Aminoácidos marcados en <sup>13</sup>C o <sup>15</sup>N en un cultivo paralelo al no marcado que se incorporan a las proteínas.</p>	<p>Alta eficacia de marcaje.</p> <p>El MW de las proteínas y péptidos es previsible</p> <p>Coste elevado</p>
	<p><b>Marcaje del medio con <sup>15</sup>N</b><sup>103</sup></p> <p>Medio enriquecido con <sup>15</sup>N en un cultivo paralelo al no marcado. El <sup>15</sup>N se incorpora a las proteínas.</p>	<p>Alta eficacia de marcaje</p> <p>Coste elevado</p> <p>La MW no es predecible</p> <p>Muy alta complejidad de los espectros obtenidos</p>
In vitro (marcaje químico)	<p><b>ICAT</b><sup>104</sup></p> <p>Marcaje isotópico diferencial de las líneas a comparar usando dos versiones de un compuesto de biotina (con <sup>1</sup>H o <sup>2</sup>H) a través de los grupos tiol de la proteína.</p>	<p>Aplicable a cualquier muestra</p> <p>Permite la cuantificación de proteínas poco abundantes</p> <p>Aplicable a fosfoproteínas (PhiAT<sup>105</sup>)</p> <p>Sólo marca Cys</p> <p>Uniones no específicas, bajo rendimiento por la necesidad de columna de avidina</p>
	<p><b>iTRAQ</b><sup>106</sup></p> <p>Marcaje isotópico diferencial de las proteínas mediante diferentes reactivos a través del extremo N-terminal y las Lys.</p>	<p>Comparación de varias proteínas a la vez (<i>multiplexing</i>)</p> <p><b>ESTRATEGIA GENÉRICA</b></p>

En general, las estrategias comentadas en la tabla A.2.2 son aplicables a la cuantificación de fosfoproteínas con modificaciones para algunas de ellas. En el caso de enriquecimiento del medio para el caso específico de fosfoproteínas, ha de tenerse en cuenta la variación de la  $m/z$  que se va a producir cuando existe la PTM, ya que la  $m/z$  depende de la composición de los aminoácidos de los péptidos. También se han publicado estudios basados en la metodología iTRAQ, y en la metodología ICAT, denominándose esta última PhIAT para el análisis de fosfoproteínas.<sup>77</sup>

### A.2.4.2. Cuantificación absoluta.

Aunque en el ámbito de la cuantificación, las técnicas más habituales están basadas en el uso de la MS, en el caso de la cuantificación absoluta, existe una técnica que, por su relevancia y vigencia a día de hoy, es importante tener en cuenta.

La técnica ELISA es un tipo de inmunoensayo enzimático heterogéneo. Usualmente, este ensayo consiste en la detección espectrofotométrica de un producto coloreado que se genera por la acción de un enzima cuando el anticuerpo al que está asociado interacciona con su proteína antígeno. Estos ensayos son robustos, rápidos y directos, y con alta sensibilidad.<sup>107</sup> Sin embargo, y al igual que los casos ya comentados que requieren el uso de anticuerpos, esta técnica está limitada por la disponibilidad de anticuerpos suficientemente específicos.

Dentro de las técnicas de cuantificación absoluta basadas en el uso de MS molecular, una de las más habituales es la técnica *AQUA*, que emplea péptidos sintéticos conocidos y marcados isotópicamente que se mezclan en concentración conocida con los péptidos análogos de la proteína original. Es una estrategia genérica y que puede aplicarse a cualquier proteína ya que, gracias al uso de isótopos enriquecidos, es posible distinguir los dos tipos de péptidos en el espectro de masas. Obviamente, la síntesis de los patrones requiere el conocimiento previo de la secuencia y, más allá del coste, hay que asegurar la certificación del péptido patrón para poder asegurar la exactitud de la concentración de la proteína, una condición laboriosa, difícil y generalmente de alto coste.

Otra técnica algo más compleja es la *QconCAT*, que emplea una proteína sintetizada artificialmente compuesta por varios péptidos marcados isotópicamente; uno de cada proteína que se quiera cuantificar. Esta técnica permite la cuantificación de varias proteínas a la vez, aunque, al igual que

## A. INTRODUCCIÓN

---

en caso anterior, se requiere conocer la estructura de la proteína, y la técnica es compleja y la síntesis complicada.

La cuantificación por *ELISA* para el caso de las fosfoproteínas, es posible, aunque también requiere de anticuerpos específicos para los residuos fosforilados.<sup>108</sup>

Respecto a las técnicas de MS molecular, para poder obtener la cuantificación absoluta por *AQUA*, es necesario realizar la síntesis de los péptidos con la modificación, lo que aumenta la complejidad y el coste. Sin embargo, para el caso de la técnica *QconCAT*, aún no se ha desarrollado una estrategia equivalente, ya que la complejidad de la síntesis de la proteína artificial requeriría de estrategias basadas en el uso de la ingeniería genética.<sup>109</sup>

Uno de los mayores problemas en la cuantificación por MS molecular, es la certificación de los patrones específicos que se van a utilizar para, a su vez, cuantificar las fosfoproteínas o fosfopéptidos. Una de las estrategias propuestas para acometer esta tarea es la *técnica PASTA*, desarrollada para la producción y certificación de los péptidos-patrón. Esta metodología conlleva el uso de la MS elemental, que permite cuantificar de forma absoluta los péptidos que se usarán posteriormente como patrones específicos en el análisis por MS molecular para cuantificar la fosfoproteína.<sup>110</sup>

La inclusión de la MS elemental en el campo de la proteómica permite diversificar hacia diferentes estrategias analíticas que complementen a las ya existentes. De las características específicas del ICP-MS en este campo se hablará en el apartado siguiente.

### ***A.2.5. El papel del ICP-MS en la proteómica.***

A lo largo del bloque A.1. se han descrito extensamente las características y capacidades del ICP-MS. De todas ellas, la supuesta independencia de la señal analítica respecto de la especie y la matriz, hace que esta técnica sea especialmente interesante para llevar a cabo estrategias de cuantificación absoluta de (fosfo)proteínas.<sup>111,112</sup> Esto es debido a que se abre la posibilidad de utilización patrones de cuantificación inespecíficos, por lo que ya no es necesaria la síntesis de patrones específicos para cada proteína o péptido que se quiera cuantificar. Sin embargo, la detección ha de ser a través de elementos detectables por ICP-MS como son los *heteroátomos*; es decir, cualquier elemento (metal,

no metal, semimetal que sea diferente de C, H, O, o N) presente en una proteína de forma natural o adicionado intencionadamente.<sup>112</sup>

A pesar de las prestaciones que ofrece la MS elemental, es necesario tener en cuenta que esta no proporciona ningún tipo de información estructural ni la situación de las modificaciones en la proteína. Por tanto, para poder hacer un estudio completo de la cuantificación absoluta de la fosforilación, así como de su localización, es imprescindible la integración de las MS molecular y elemental, así como del empleo de técnicas acopladas que permitan la separación de las diferentes especies antes de proceder con sus análisis.

Las estrategias analíticas más utilizadas para llevar a cabo la cuantificación absoluta mediante ICP-MS son las siguientes:

- *Métodos de calibración directa* realizando curvas de respuesta y/o a través de adiciones estándar, ambos con patrones inorgánicos que contengan el heteroátomo de interés.<sup>112,113</sup>
- *Estandarización interna usando patrones inorgánicos*, utilizando como patrón interno un compuesto que contenga el heteroátomo<sup>112,113</sup>.
- *Dilución isotópica (ID)* utilizando un patrón (trazador) enriquecido en uno o varios isótopos del heteroátomo estando alteradas, por tanto, las abundancias del trazador respecto a su abundancia natural. Se usa habitualmente en análisis cromatográficos. Si la ID se hace añadiendo el trazador a la muestra directamente antes de la separación se denomina específica (*species-specific*), si se hace post-columna tras la separación se denomina inespecífica (*species-unspecific*).<sup>112</sup>

En todos los casos anteriores es necesario tener un conocimiento previo de la estequiometría del heteroátomo para poder transformar la cantidad absoluta del mismo obtenida experimentalmente en cantidad absoluta de proteína. La cuantificación de proteínas basada en la medida de heteroátomos ha de realizarse siempre basada en un elemento cuya estequiometría en la molécula sea constante ya que, si no, pueden cometerse errores importantes en la cuantificación. Este heteroátomo puede estar presente en la molécula de forma natural o puede estar añadido artificialmente.

*Heteroátomos presentes de forma natural*

## A. INTRODUCCIÓN

---

La mayor parte de los metales y semimetales que aparecen de forma natural en las proteínas (metaloproteínas) lo hacen como grupos funcionales cuya presencia o ausencia depende de la regulación de su actividad. Estos enlaces pueden ser lábiles lo que lleva a que, según el tratamiento al que se somete a la muestra, se puedan romper (desnaturalización de la proteína, variaciones drásticas de pH, etc.). Sin embargo, existen otros elementos que están unidos a la molécula de forma covalente como el P, I, Se o fundamentalmente el S, siendo prácticamente del 100% la probabilidad de que al menos uno de ellos esté presente en ella.<sup>114</sup>

Una de las opciones más interesantes, es precisamente la cuantificación a través del S, que está presente en la estructura primaria de la proteína formando parte de los aminoácidos Met y Cys. Estadísticamente, se esperaría que para proteínas o péptidos con más de 22 amino ácidos estuviera presente al menos uno de los dos anteriores.<sup>115,116</sup> Es, por tanto, no solo un buen candidato para cuantificar las proteínas, sino también para usar como patrón interno en la determinación de la estequiometría de las metaloproteínas<sup>112</sup> y las fosfoproteínas.

### *Heteroátomos añadidos artificialmente*

Aunque el marcaje de proteínas/péptidos para su detección por ICP-MS no está tan establecida como en el caso de la MS molecular, en los últimos años se ha ido convirtiendo en una herramienta potencial para la cuantificación de proteínas.<sup>112,113</sup> A pesar que la derivatización requiere de un proceso laborioso y más o menos costoso, el marcaje artificial permite utilizar elementos que no estén interferidos, o que tengan mejores características físicos-químicas para su detección por ICP-MS, lo que ayudar a obtener un cuantificación más precisa y exacta, y a disminuir los límites de detección. Esto es interesante si se tiene en cuenta que los elementos presentes de forma natural tienen, en general, potenciales de ionización altos y sus m/z se encuentran en una región altamente interferida (especialmente Se, S y P). Un ejemplo es la técnica ECAT, que consiste en el marcaje de las Cys presentes en la proteína con un compuesto quelante (DOTA) al que se uniría una tierra rara que sería el elemento a detectar por ICP-MS.<sup>117</sup> Como principal desventaja, las técnicas de marcaje implican que, además de la etapa extra de marcaje, para evitar resultados erróneos sea necesario un control exhaustivo que demuestre la reproducibilidad y eficacia del marcaje, así como su selectividad.

Existen, además, una variación de estrategias consistente en la detección de la proteína de forma indirecta. Estos métodos son especialmente interesantes cuando la proteína está a muy baja

concentración y en una muestra compleja, como en el caso de los biomarcadores. Normalmente estos métodos suelen estar basados en inmunoensayos y utilizan anticuerpos específicos para unirse a la proteína diana que está marcada con heteroátomos.<sup>113,118</sup> Una variación de estos métodos sería el empleo de anticuerpos marcados con nanopartículas metálicas. Estos métodos son laboriosos y requieren conocer la estequiometría del bioconjugado, aunque permiten obtener límites de detección muy bajos que no serían posibles con la detección directa debido al elevado número de átomos presentes en la nanopartícula (amplificación).<sup>119</sup>

Como se ha comentado en el apartado A.2.4.2., más allá de las técnicas de ELISA y AQUA (y sus derivados) no existen muchas opciones para cuantificar de forma absoluta las fosfoproteínas. Sin embargo, las mismas características del ICP-MS que permiten la cuantificación absoluta de proteínas, también permiten la de las fosfoproteínas. En este caso y, al igual que en caso anterior, la cuantificación puede llevarse a cabo a través de calibración externa o a través de patrones internos. Sin embargo, el carácter monoisotópico del P impide el uso de la ID a no ser que se empleen isótopos radiactivos del dicho elemento (<sup>32</sup>P).<sup>120</sup>

Aunque se han publicado metodologías para la cuantificación de la fosforilación mediante reacciones de derivatización,<sup>121</sup> la forma más habitual de llevar a cabo la cuantificación es a través de la medida directa del átomo de P. Es importante tener en cuenta que, a diferencia de la cuantificación de proteínas no fosforiladas, la cuantificación de la fosforilación implica también la determinación de la proteína sin modificar. Esto es lógico dado que la cantidad de P no tiene ninguna implicación biológica si no es en el contexto de la cantidad de molécula en la que se encuentra.

### **A.2.5.1. Sistemas de separación y caracterización acoplados a ICP-MS.**

Como se ha dicho, una de las principales ventajas de la fuente ICP es también su mayor limitación. La atomización completa de la muestra hace que, en el caso de existir varias especies a analizar, sea imprescindible su separación previa para poder analizarlas de forma individual. Además, si las especies se separan antes de ser analizadas no es necesario el uso de marcajes isotópicos.<sup>122</sup>

De todas las técnicas acopladas al ICP en el campo de la (fosfo)proteómica, la más utilizada para el estudio de (fosfo)proteínas es el basado en el acoplamiento al LC gracias a su gran versatilidad. La separación de las muestras se consigue por separación por volumen hidrodinámico (SEC), por los

## A. INTRODUCCIÓN

---

estados de carga (intercambio iónico) o por el carácter hidrofílico o hidrofóbico (RP).<sup>123</sup> De todas ellas la más utilizada en estudios de proteómica es la cromatografía de RP (RP-LC) ya que permite la separación tanto de proteínas como de péptidos en muestras complejas con alta eficacia. La tendencia general es hacia la disminución del flujo de la cromatografía hasta niveles de micro o capilar, tanto para proteínas<sup>115,124</sup>, como para fosfoproteínas.<sup>122,125</sup> De esta manera se disminuye el coste del análisis y la cantidad de muestra necesaria, además de que hace que el ICP sea compatible con el uso de disolventes orgánicos. Estos microflujos son también más compatibles con la fuente ESI.<sup>84</sup>

Para el caso de muestras sólidas separadas en un soporte sólido (electroforesis en gel 1-D o 2-D), el análisis se puede llevar a cabo con un sistema LA (*LA-ICP-MS*) sin necesidad de extraer las proteínas del gel, aunque se suele hacer una transferencia a un soporte sólido más estable química y térmicamente, reduciendo así la contaminación de reactivos y tampones usados durante la separación en el gel.<sup>126</sup> La precisión del haz al ablacionar la muestra, aporta resolución espacial lo que hace que esta técnica se utilice también para el análisis de (fosfo)proteínas directamente sobre tejidos.<sup>127</sup> Sin embargo, uno de los mayores problemas del empleo del láser son los fondos variables de <sup>31</sup>P por problemas de contaminación durante la preparación de muestra, que pueden limitar los límites de detección y pueden requerir etapas extra de limpieza.<sup>128</sup> Además, las aproximaciones cuantitativas por LA son complicadas.

### **A.2.6. Perspectivas.**

La inclusión de la espectrometría de masas elemental en la proteómica enfocada a la determinación de los heteroátomos presentes en las biomoléculas, tanto para la cuantificación absoluta de proteínas como de sus PTMs (especialmente la fosforilación), abre una puerta que ofrece una alternativa para complementar las metodologías basadas en MS molecular. El gran valor del ICP-MS reside es la capacidad de poder cuantificar sin necesidad de patrones específicos, lo que puede ser de gran relevancia especialmente para la certificación de la concentración de los patrones peptídicos empleados para la cuantificación por MS molecular (p.ej., en AQUA). En este aspecto, la introducción de la configuración en MS/MS combinada con la fuente ICP, supone un gran impulso para su inclusión en las plataformas instrumentales de laboratorios de proteómica, dado su gran potencial para la cuantificación de elementos clave en biomoléculas (S, P, Se, etc.).

---

### A.2.7. Bibliografía.

---

<sup>60</sup> Mendel, G.; Versuche über Pflanzen-hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Ver-eines in Brünn*, Abhandlungen, 3-47. (1866).

<sup>61</sup> Griffith, F.; The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 27, p. 113-159. (1928). DOI: 10.1017/S0022172400031879.

<sup>62</sup> Avery, O.T.; MacLeod, C. M y McCarty, M.; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of Experimental Medicine*, 79, p. 137-158. (1943). DOI: 10.1084/jem.79.2.137.

<sup>63</sup> Hershey, A. D. y Chase, M.; Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 36, p. 39-56. (1952). DOI: 10.1085/jgp.36.1.39.

<sup>64</sup> Watson, J. D. y Crick, F.; Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, p.737-738. (1953). DOI: 10.1007/BF02834980.

<sup>65</sup> Chargaff, E.; Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Federation proceedings*, 10, p. 654-659. (1951).

<sup>66</sup> Franklin, R. E. y Gosling, R.; Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171, p. 740-741. (1953). DOI: 10.1038/171740a0

<sup>67</sup> Meselson, M. y Stahl, F.W.; The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44, p. 671-682. (1958). DOI: 10.1073/pnas.44.7.671.

<sup>68</sup> Venter, J. C. et al.; The sequence of the human genome. *Science*, 291, p. 1304-1351. (2001). DOI: 10.1126/science.1058040.

<sup>69</sup> Gibson, D. G. et al.; Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329, p. 52-56. (2010). DOI: 10.1126/science.1190719

<sup>70</sup> Ong, S.-E. y Mann M.; Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology*, 1, p. 252-256. (2005). DOI:10.1038/nchembio736.

<sup>71</sup> Mann, M. y Jensen, O. N.; Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21, p. 255-261. (2003). DOI: 10.1038/nbt0303-255

<sup>72</sup> Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S. y Gatto, G. J.; Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, p. 7342-7372. (2005). DOI: 10.1002/anie.200501023.

<sup>73</sup> Woolery, A. R.; Luong, P.; Broberg, C. A. y Orth, K.; AMPylation: something old is new again. *Frontiers in Microbiology*, 1, 113. (2010). DOI: 10.3389/fmich.2010.00113.

<sup>74</sup> Prabakaran, S.; Lippens, G.; Steen, H. y Gunawardena, J.; Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4, p. 565-583. (2002). DOI: 10.1002/wsbm.1185.

<sup>75</sup> Krebs, E. G. y Fisher, E. H.; Phosphorylase and related enzymes of glycogen metabolism. *Vitamins and hormones*, 22, p. 399-410. (1964). DOI: 10.1016/S0083-6729(08)60345-3.

<sup>76</sup> Siegel, G. J.; Albers, R. W.; Brady, S. y Price, D.; *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (6<sup>th</sup> ed.). Ed. Lippincott Williams and Wilkins. (1998). ISBN: 978-0397518203.

<sup>77</sup> Mann, M.; Ong, S. E.; Grønborg, M.; Steen, H.; Jensen, O. N. y Pandey, A.; Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in Biotechnology*, 20, p. 261-267. (2002). DOI: 10.1016/S0167-7799(02)01944-3.

- <sup>78</sup> Pandey, A. y Mann M.; Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, p. 837-846. (2000). DOI: 10.1038/35015709.
- <sup>79</sup> Muñoz, J. y Heck, A. J. R.; From the human genome to the human proteome. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, p. 10864-10866. (2014). DOI: 10.1002/anie.201406545.
- <sup>80</sup> Anderson, N. L. y Anderson, N. G.; The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics*, 1, p. 845-867. (2002). DOI: 10.1074/mcp.R200007-MCP200.
- <sup>81</sup> O'Farrell, P. H.; High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, p. 4007-4021. (1975).
- <sup>82</sup> Klose, J.; Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humagenetik*, 26, p. 231-243. (1975). DOI: 10.1007/BF00281458.
- <sup>83</sup> Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J.; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76, p.4350-4354. (1979). DOI: 10.2307/70083.
- <sup>84</sup> Delom, F. y Chevet, E.; Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Science*, 4, p. 1-12. (2006). DOI: 10.1186/1477-5956-4-15.
- <sup>85</sup> Edman, P.; Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 4, p. 283-293. (1950).
- <sup>86</sup> Kaufmann, H.; Bailey, J. E. y Fussenegger, M.; Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 1, p. 194-199. (2001). DOI: 10.1002/1615-9861(200102)1:2<194::AID-PROT194>3.0.CO;2-K.
- <sup>87</sup> López Villar, E.; Nombela Cano, C. y Røssel Larsen, M.; Metodologías fosfoproteómicas útiles en estudios clínicos. *Inmunología*, 27, p. 36-44. (2008). DOI: 10.1016/S0213-9626(08)70047-7.
- <sup>88</sup> Yan, J. X.; Packer, N. Y.; Gooley, A. A. y Williams, K. L.; Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *Journal of Chromatography A*, 808, p. 23-41. (1998). DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00115-0.
- <sup>89</sup> McLachlin, D. T. y Chait, B. T.; Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, p. 591-602. (2001). DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00250-7.
- <sup>90</sup> Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J. y Brentnall, T. A.; Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *Journal of Proteome Research*, 8, p. 787-797. (2009). DOI: 10.1021/pr800538n.
- <sup>91</sup> Sulkowski, E.; Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3, p. 1-7. (1985). DOI: 10.1016/0167-7799(85)90068-X.
- <sup>92</sup> Wolschin, F.; Wienkoop, S. y Weckwerth, W.; Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics*, 8, p. 4389-4397. (2005). DOI: 10.1002/pmic.200402049.
- <sup>93</sup> Trinkle-Mulcahy, L.; Boulon, S.; Wah Lam, Y.; Urcia, R.; Boisvert, F-M.; Vandermoere, F.; Morrice, N. A. Swift, S.; Rothbauer, U.; Leonhardt, H. y Lamond, A.; Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The Journal of Cell Biology*, 183, p. 223-239. (2008). DOI: 10.1083/jcb.200805092.
- <sup>94</sup> Jungblut, P. R.; The proteomics quantification dilemma. *Journal of Proteomics*, 107, p. 98-102. (2014). DOI: 10.1016/j.jprot.2014.03.015.
- <sup>95</sup> Agnetti, G.; Lindsay, M. L.; Foster, D. B.; *Manual of Cardiovascular Proteomics*. Ed. Springer International Publishing. (2016). ISBN: 978-3-319-31828-8.
- <sup>96</sup> Larsen, M. R.; Trelle, M. B.; Thingholm, T. E. y Jensen, O. N.; Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry, *BioTechniques*, 40, p. 790-798. (2006). DOI: 10.2144/000112201.

- <sup>97</sup> Aebersold, R. y Mann M.; Mass-spectrometric exploration of the proteome structure and function. *Nature*, 537, p. 347-355. (2016). DOI: 10.1038/nature19949.
- <sup>98</sup> Sharma, K.; D'Souza, R. C. J.; Tyanova, S.; Schaab, C.; Wiśniewski, J. R.; Cox, J. y Mann, M.; Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Reports*, 8, p. 1583-1594. (2014). DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.036.
- <sup>99</sup> Steen, A. y Pandey, A.; Proteomics goes quantitative: measuring protein abundance. *Trends in Biotechnology*, 20, p. 361-364. (2002). DOI: 10.1016/S0167-7799(02)02009-7.
- <sup>100</sup> Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J. y Kuster, B.; Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, p. 1017-1031. (2007). DOI:10.1007/s00216-007-1486-6.
- <sup>101</sup> Dowle, A. A.; Wilson, J. y Thomas, J. R.; Comparing the diagnostic classification accuracy of iTRAQ, peak-area, spectral-counting, and emPAI methods for relative quantification in expression proteomics. *Journal of Proteome Research*, 15, p. 3550-3562. (2016). DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00308.
- <sup>102</sup> Ong, S.E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D.B.; Steen, H.; Pandey, A. y Mann, M.; Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 1, p. 376-386. (2002). DOI: 10.1074/mcp.m200025-mcp200.
- <sup>103</sup> Oda, Y.; Huang, K, Cross, F. R.; Cowburn, D. y Chait, B. T.; Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, p. 6591-6596. (1999). DOI: 10.1073/pnas.96.12.6591.
- <sup>104</sup> Gygi, S.P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H. y Aebersold, R.; Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, 17, p. 994-999. (1999). DOI: 10.1038/13690.
- <sup>105</sup> Goshe, M. B.; Veenstra, T. D.; Panisko E. A.; Conrads, T. P.; Angell, N. H. y Smith R. D.; Phosphoprotein isotope-coded affinity tags: application to the enrichment and identification of low abundance phosphoproteins. *Analytical Chemistry*, 74, p. 607-616. (2002). DOI: 10.1021/ac015528g.
- <sup>106</sup> Wiese, S.; Reidegeld, K. A.; Meyer, H. E. y Warscheid, B.; Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 7, p. 340-350. (2006). DOI: 10.1002/pmic.200600422.
- <sup>107</sup> Olive, D. M.; Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development. *Expert Review of Proteomics*, 1, p. 327-41. (2004). DOI: 10.1586/14789450.1.3.327.
- <sup>108</sup> Vanmechelen, E.; Vanderstichele, H.; Davidsson, P.; Van Kerschaver, E.; Van Der Perre, B.; Sjögren, M.; Andreasen, N. y Blennow, K.; Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neuroscience Letters*, 285, p. 49-52. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01036-3.
- <sup>109</sup> Chen, J.; Turko, I. V.; Trends in QconCATs for targeted proteomics. *Trends in Analytical Chemistry*, 57, p. 1-5. (2014). DOI: 10.1016/j.trac.2013.12.013.
- <sup>110</sup> Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer y Lehman, W. D.; Phosphorus-based absolutely quantified standard peptides for quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 8, p. 4870-4875. (2009). DOI: 10.1021/pr900494m.
- <sup>111</sup> Szpunar, J.; Łobiński, R y Prange, A.; Hyphenated techniques for elemental speciation in biological system. *Applied Spectroscopy*, 57, p. 102A-122A. (2003). DOI: 10.1366/000370203321558128.
- <sup>112</sup> Bettmer, J.; Montes Bayón, M.; Ruiz Encinar, J.; Fernández Sánchez, M. L., Fernández de la Campa, M. R. y Sanz Medel, A.; The emerging role of ICPMS in proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 72, p. 989-1005. (2009). DOI: 10.1016/j.jprot.2009.05.003.
- <sup>113</sup> Wang, M.; Feng, W.; Zhao, Y. y Chai, Z.; ICP-MS-based strategies for protein quantification. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, p.326-348. (2010). DOI: 10.1002/mas.20241.
- <sup>114</sup> Prange, A. y Pröfrock, D.; Chemical labels and natural element tags for the quantitative analysis of bio-molecules. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, p.432-459. (2008). DOI: 10.1039/b717916m.

- <sup>115</sup> Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kellner, R. y Lehman W. D.; Sulfur as the key element for quantitative protein analysis by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 42, p. 3425-3427. (2003). DOI: 0.1002/anie.200250547.
- <sup>116</sup> Suzuki, Y.; Nobusawa, A. y Furuta, N.; Quantification of proteins by measuring the sulfur content of their constituent peptides by means of nano HPLC-ICPMS. *Analytical Sciences*, 30, p. 551-559. (2014). DOI: 10.2116/analsci.30.551.
- <sup>117</sup> Whetstone, P. A.; Butlin, N. G.; Corneillie, T. M. y Mearns, C. F.; Element-Coded Affinity Tags for Peptides and Proteins. *Bioconjugate Chemistry*, 15, p. 3-6. (2004). DOI: 10.1021/bc034150I.
- <sup>118</sup> Bendall et al.; Single-Cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science*, 332, p.687-696. (2011). DOI: 10.1126/science.1198704.
- <sup>119</sup> García-Cortés, M.; Ruiz Encinar, J.; Costa-Fernández, J. M. y Sanz-Medel, A.; Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, p. 128-134. (2016). DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.090.
- <sup>120</sup> Wind, M.; Wesch, H. y Lehman, W.; Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, p. 3006-3010. (2001). DOI: 10.1021/ac010066s.
- <sup>121</sup> Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Ballesteros, A. González, J. M. y Sanz-Medel, A.; Capillary HPLC-ICPMS and tyrosine iodination for the absolute quantification of peptides using generic standards. *Analytical Chemistry*, 81, p. 5390-5399. (2009). DOI: 10.1021/ac9005606.
- <sup>122</sup> Wind, M.; Edler, M.; Jakubowski, N.; Linscheid, M.; Wesch, H. y Lehman, W. D.; Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry with <sup>31</sup>P detection and to electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, p. 29-35. (2001). DOI: 10.1021/ac0009595.
- <sup>123</sup> Montes-Bayón, M.; DeNicola, K. y Caruso, J. A.; Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000, p. 457-476. (2003). DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00527-2.
- <sup>124</sup> Schaumlöffel, D.; Giusti, P.; Preud'Homme, H.; Szpunar, J. y Łobiński, R. Precolumn isotope dilution analysis in nanoHPLC-ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides. *Analytical Chemistry*, 79, p. 2859-2868. (2007). DOI: 10.1021/ac061864r.
- <sup>125</sup> Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Carrascal, M.; Abián, J. y Sanz-Medel, A.; Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Analytical Chemistry*, 80, p. 1777-1787. (2008). DOI: 10.1021/ac7022316.
- <sup>126</sup> Marshall, P.; Heudi, O.; Bains, S.; Freeman, H. N.; Abou-Shakra, F. y Reardon, K.; The determination of proteins phosphorylation on electrophoresis gel blots by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analyst*, 127, p. 459-461. (2002). DOI: 10.1039/B201657P.
- <sup>127</sup> Maes, E.; Tirez, K.; Baggerman, G.; Valkenburg, D.; Schoofs, L.; Ruiz Encinar, J. y Mertens, I.; The use of elemental mass spectrometry in phosphoproteomic applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 35, p.350-360. (2016). 10.1002/mas.21440.
- <sup>128</sup> Becker, J. S.; Zoriy, M.; Becker, S.; Pickhardt, C. y Przybylski, M.; Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 149-152. (2004). DOI: 10.1039/B311274H J.

*“The laws of science do not distinguish between the past and the future”*

*Stephen Hawking*



### A.3. PALEOCEANOGRAFÍA

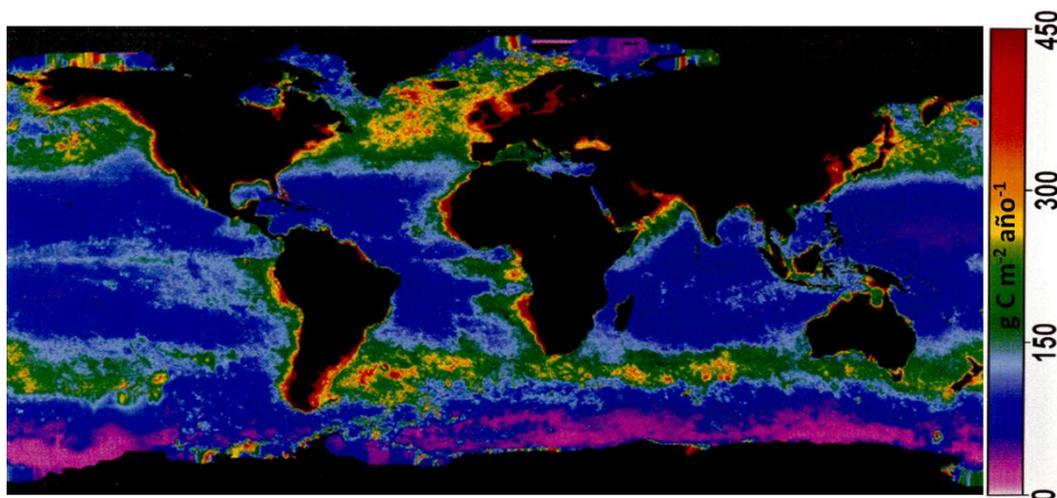
#### A.3.1. Contexto histórico, biológico y geológico.

La zona pelágica (del gr. *pélagos*, mar abierto) se define como la columna de agua que no se encuentra inmediatamente sobre la plataforma continental; es decir, aquella que comprende las zonas medias y superficiales a las que normalmente llega la luz del sol. Los organismos que habitan este entorno son denominados pelágicos y se clasifican en dos grupos: el *necton* y el *plancton*. Por definición, el necton (del gr. *nekton*, los que nadan) hace referencias a los organismos con auto-locomoción que pueden nadar en contra de la corriente tales como peces o medusas.<sup>129</sup> Por el contrario, el plancton (del gr. *plankton*, errantes) está compuesto por aquellos organismos que son transportados de un sitio a otro por el medio en el que viven en suspensión.<sup>130</sup> Este término puede incluir tanto bacterias como protistas<sup>i</sup>, plantas y animales, ya que este concepto no está definido por un grupo taxonómico o filogenético, sino por el nicho ecológico que ocupan los organismos que engloba. En función de si los organismos del plancton son autótrofos o heterótrofos, se les denomina fitoplancton o zooplancton, respectivamente. El fitoplancton juega un papel esencial en la producción primaria oceánica (Figura A.3.1), así como en los distintos ciclos geológicos de los elementos del planeta.<sup>131</sup> Algunos de los organismos más importantes dentro de la subdivisión del fitoplancton son las diatomeas, cianobacterias o los cocolitofóridos.

Desde los primeros estudios sobre el plancton realizados por el naturalista aficionado J. Vaughan Thompson en la costa irlandesa en 1828, la heterogeneidad de estos organismos ha sido estudiada de forma sistemática.<sup>132</sup>

---

<sup>i</sup> El término protista (del gr. *prôtista*, los primerísimos) se ha usado tradicionalmente para englobar al reino de aquellos organismos eucariotas que no se pueden incluir en los tres reinos eucariotas restantes: Animalia (animales), Plantae (vegetal), y Fungi (hongos); p.ej., los protozoos.



**Figura A.3.1.** Estimación de la producción primaria global debida al fitoplancton. (Adaptada de Behrenfeld y Falkowski<sup>133</sup>).

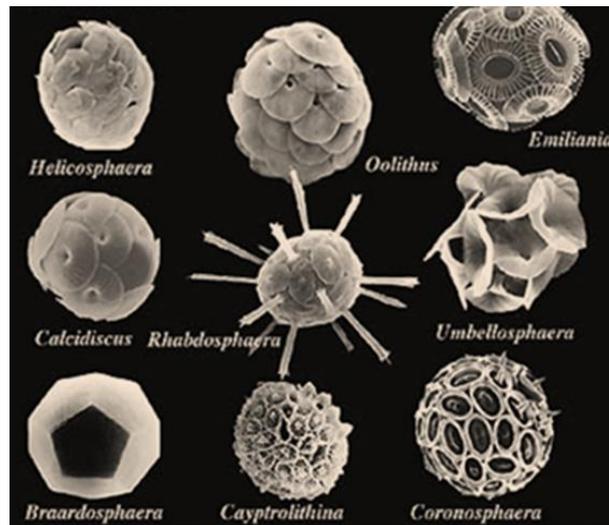
### A.3.1.1. Origen, distribución y registro fósil.

Debido a su distribución oceánica, existe un amplio registro fósil del plancton. De hecho, los fósiles más antiguos conocidos son cianobacterias de hace 3,5 millones de años (m.a.), que son consideradas las responsables originales del alto contenido de O<sub>2</sub> en la atmósfera terrestre.<sup>134</sup> La diversificación biológica del plancton tuvo su máximo esplendor durante el mesozoico, y fue precisamente entonces cuando surgieron coccolitofóridos, diatomeas y foraminíferos. A día de hoy, las distintas especies que componen el plancton están distribuidas de forma global en todos los océanos.

Gran parte del registro fósil actual proviene precisamente de los sedimentos derivados de la continua acumulación del zooplancton y el fitoplancton en el fondo marino. Estos depósitos no se forman por el organismo en sí mismo, sino por la acumulación de unas estructuras de tipo caparazón que caracterizan a muchas de estas especies. El origen, morfología y composición de estas estructuras depende tanto del organismo como de las condiciones ambientales durante la formación y la vida del individuo (Figura A.3.2).

A pesar de que existe gran diversidad en la composición de la estructura básica de los caparzones, la mayor parte de los depósitos marinos son biominerales de origen cálcico provenientes de foraminíferos (animales unicelulares) y coccolitofóridos (algas unicelulares). Aunque ambos son los

principales moduladores de la producción de carbonato cálcico en el océano actual, el 80-90% de los sedimentos de carbonatos provienen de los cocolitofóridos.<sup>135</sup> Debido al temprano origen evolutivo antes mencionado, así como a su distribución global a través del tiempo geológico, estos carbonatos han sido clave en la configuración y consolidación de campos como la estratigrafía, la paleoecología y la paleoceanografía.



**Figura A.3.2.** Morfología de los caparazones de algunos organismos planctónicos (género indicado en la figura)<sup>136</sup>.

### **A.3.2. La química de los carbonatos: biomineralización y reparto iónico.**

Como ya se ha adelantado, la biomineralización es el proceso por el cual los organismos crean minerales. Los primeros estudios que se realizaron en este campo fueron precisamente acerca de aquellos constituidos principalmente por  $\text{Ca}$ ,<sup>137</sup> aunque a día de hoy ya se conocen y se estudian en torno a 60 biominerales diferentes.<sup>138</sup> El concepto de biomineral no hace referencia únicamente al mineral en sí mismo, sino también a los componentes asociados con el propio proceso, el cual puede suceder de dos formas en función del grado de control que ejerza el organismo sobre él. En los procesos *inducidos biológicamente*, se da una precipitación de minerales debida a las interacciones entre la actividad biológica y en ambiente; mientras que, en los procesos *controlados biológicamente*, el organismo controla la formación y morfología del biomineral, que puede ser interno o externo.<sup>139</sup> Una de las principales preocupaciones de la comunidad paleoceanográfica es, precisamente, la de entender cómo se controla este mecanismo, ya que refleja la acción de la

## A. INTRODUCCIÓN

---

selección natural sobre los organismos, lo cual está directamente relacionado con las condiciones ambientales a través del tiempo geológico.

En un océano que lleva millones de años recogiendo los sedimentos procedentes de la erosión terrestre, no sólo aparecen elementos mayoritarios como el Ca. Durante la formación de los carbonatos cálcicos, diferentes cationes divalentes presentes en el medio marino como  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  o  $Cd^{2+}$  pueden ser fácilmente incorporados en la matriz sustituyendo al  $Ca^{2+}$ , y aniones tales como  $BO_3^{2-}$  pueden sustituir al  $CO_3^{2-}$ . La capacidad de sustituir al Ca de los distintos elementos es dependiente tanto de su concentración, como de las condiciones físico-químicas (temperatura, pH) del medio en el momento de la formación de la estructura cálcica. Ya que la concentración de estos iones no ha permanecido constante en el medio a lo largo del tiempo, el análisis de las relaciones  $X^{ii}/Ca$  ha sido usado muy habitualmente en estudios paleoclimáticos y paleoceanográficos para determinar los cambios en la geoquímica del océano a través del tiempo<sup>140-142</sup>.

Para poder llevar a cabo un estudio adecuado de las relaciones  $X/Ca$ , no es necesario únicamente un conocimiento completo de la química oceánica, sino también de la forma de incorporación del elemento (X) en el caparazón. Los estudios de reparto de los iones (*o partición iónica*) entre dos fases, en este caso la estructura cálcica del organismo y el océano, se han enfocado tradicionalmente hacia tres objetivos: la determinación de las relaciones elementales, de la temperatura, y del pH (química del carbono) en el paleo-océano. Para poder llevar a cabo esta tarea, es esencial disponer de modelos de reparto de iones que permitan entender la difusión iónica entre el medio y el organismo que, una vez obtenida la relación  $X/Ca$  experimental, permita deducir las condiciones físico-químicas específicas que llevaron a esa relación. Habitualmente, estos modelos se establecen para las condiciones tales que la masa del precipitado de calcio del reservorio (el océano en este caso) sea infinitamente menor que el propio reservorio, asumiendo que la solución se encuentra en un estado estable. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las partículas cálcicas respecto al volumen oceánico y, siendo la contribución de los procesos biológicos implicados despreciable, se esperaría que los modelos de reparto iónico desarrollados para la determinación empírica del coeficiente de reparto<sup>iii</sup> en sistemas orgánicos<sup>143</sup> fueran análogos a las concepciones

---

<sup>ii</sup> En este contexto, X representa a cualquier elemento que se determine, o pueda determinarse, en relación al Ca presente en la matriz.

<sup>iii</sup> El coeficiente de reparto se define como el cociente entre las concentraciones de una sustancia en dos fases heterogéneas y, en equilibrio entre ellas, en sistemas inorgánicos.

teóricas. Sin embargo, y tal y como suele pasar cuando entran en juego sistemas biológicos, los modelos que están establecidos para el caso inorgánico no funcionan para la calcita biogénica.<sup>144,145</sup> Por ello, el término usado en estos casos es *partición aparente*.

El proceso de partición iónica aparente está controlado por muy diversos factores como la temperatura, la salinidad o la química oceánica, estando todos ellos relacionados entre sí. Esto implica que sea imposible obtener datos fiables a partir del estudio de un único elemento. Por este motivo, estos estudios tienden a enfocarse hacia la detección multi-elemental en un sistema, confinando los diversos factores que influyen en el efecto de partición iónica.<sup>143</sup>

### **A.3.2.1. Las relaciones X/Ca.**

El calcio tiene un tiempo de residencia en el océano de alrededor de 2 millones de años y es muy soluble en el agua, por lo que es considerado un elemento conservativo que mantiene su concentración en el medio oceánico. Además, el tiempo de mezclado en el océano es de aproximadamente 1000 años por lo que, habiendo permanecido un tiempo geológico largo en el mismo, debería estar distribuido de forma equitativa. Por ello, se considera que la concentración de Ca ha permanecido prácticamente constante a través del tiempo, variando menos del 2% debido a la formación de carbonatos biogénicos. Por el contrario, otros elementos que tengan un periodo de residencia bajo, no habrán podido distribuirse antes de desaparecer. Es precisamente en estos elementos (X) en los que se centran los diversos estudios que evalúan los cambios de las condiciones oceánicas (pH, temperatura, etc.), relacionando su variación con respecto al parámetro constante que sería el Ca.<sup>146</sup>

A pesar de que los cocolitofóridos son el principal componente de los sedimentos calcáreos en el fondo marino, la mayor parte de los estudios paleoceanográficos se han centrado en el análisis de los caparazones de los foraminíferos. Este hecho podría deberse en gran parte a que, en los cocolitos, algunos de estos elementos (X) están presentes a muy baja concentración (pocos  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) respecto al Ca (muchos  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), y a que la matriz de carbonato es más compleja en comparación con la de los foraminíferos<sup>147</sup>. El cultivo de los cocolitofóridos es más rico en elementos derivados de componentes celulares como N, S, y P en comparación a los carbonatos obtenidos de los foraminíferos,<sup>148,149</sup> donde la actividad microbiana elimina de forma bastante efectiva la contribución orgánica. El problema principal de esta contribución es que puede dar lugar a

## A. INTRODUCCIÓN

---

interferencias de matriz dependiendo de la metodología utilizada, por lo que se requiere exhaustivos protocolos de limpieza previos al análisis de las muestras. Además, el protocolo de limpieza también es importante para eliminar cualquier elemento que no forme parte de la estructura, ya que solo los que están incorporados químicamente pueden aportar la información acerca de la química y la temperatura del océano.<sup>140</sup>

En la bibliografía aparecen numerosos estudios que se centran en la determinación de relaciones de elementos respecto al calcio. La aplicabilidad de estas determinaciones depende del elemento en cuestión. Así, por ejemplo, la relación Mg/Ca está ampliamente descrita como un indicador de la temperatura oceánica.<sup>142,150</sup> De hecho, está estimado que la relación Mg/Ca de una calcita se incrementaría en torno a un 3% por cada grado centígrado (°C).<sup>143</sup> También la determinación de Sr/Ca es interesante, ya que esta medida es una herramienta potencial en la investigación de la productividad del plancton por su relación con el ciclo del carbono<sup>151</sup>. Por otro lado, la determinación de B/Ca permite obtener información de los cambios en el pH oceánico<sup>148,152</sup> y la de Cd/Ca da información sobre la concentración de nutrientes en el medio marino.<sup>153,154</sup> Otros ejemplos de determinaciones sería Ba/Ca,<sup>155</sup> Li/Ca,<sup>156</sup> Cu/Ca,<sup>157</sup> etc.

Es importante tener en cuenta que, aunque estos estudios se han enfocado tradicionalmente a la elucidación de las condiciones físico-químicas de los océanos primigenios, el análisis de estos elementos traza ligados a los carbonatos biogénicos también son aplicables para la evaluación de la contaminación debida al efecto antropogénico, así como para el desarrollo de modelos predictivos sobre el efecto del cambio climático en el medio marino.<sup>158</sup>

### ***A.3.3. El enfoque analítico.***

Debido a la gran variabilidad de los constituyentes químicos de la matriz cálcica en estos organismos, se han desarrollado metodologías muy diversas con diferente instrumentación para llevar a cabo su medida analítica.

Los primeros análisis que se llevan a cabo en este tipo de materiales fueron llevados a cabo mediante la combinación de diferentes metodologías, generalmente espectrofotometrías atómicas de absorción, debido a la gran diferencia de concentración entre los distintos elementos y al limitado rango lineal de estos métodos. Un ejemplo es la determinación de Cd/Ca en foraminíferas donde el

Cd se medía por GFAAS (espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito) y el Ca por FAAS (espectrofotometría de absorción atómica de llama).<sup>153,159</sup> Con el tiempo, el uso de estas técnicas en los distintos campos de la geología fue decayendo y empezó a cobrar fuerza el uso de la ionización térmica de MS (TIMS), especialmente para la determinación isotópica (ID-TIMS)<sup>160</sup> que permite mejores precisiones en las medidas. Sin embargo, la técnica de TIMS es muy tediosa en cuanto a la preparación de muestra y, aquellos elementos como el Fe o el Mo con carácter refractario, no pueden ser medidos fácilmente con esta técnica.<sup>146</sup> Con la aparición de los equipos multicolectores basados en ICP (MC-ICP-MS), su uso ha ido decayendo sobre todo en los casos en los que no es necesario un LD bajo, ya que la preparación de muestra es más sencilla en ICP y además, tiene la ventaja de que es capaz de ionizar prácticamente cualquier elemento, y la precisión para la medida de relaciones isotópicas es excelente.<sup>146</sup>

A día de hoy, la tendencia para la determinación total de elementos en carbonato biogénico es el uso de equipos basados en la fuente de ICP acoplada, tanto a espectrometría de emisión óptica (OES)<sup>161,162</sup> como a MS.<sup>163</sup> Sin embargo, en el caso concreto del ICP-MS, las diversas interferencias producidas en el plasma son un grave problema si la concentración del analito es muy baja, por lo que el uso de CRC o HR-ICP-MS se hace, en muchos casos, imprescindible para tener una medida más exacta.

Un asunto de gran interés en la medida de las relaciones X/Ca, es la reproducibilidad de las medidas en las muestras. En un estudio publicado por Rosenthal y colaboradores,<sup>164</sup> se llevó a cabo una comparación entre varios laboratorios de unas muestras sintéticas usando técnicas basadas en ICP (OES y MS). Para medidas de Mg/Ca y Sr/Ca, la reproducibilidad dentro del propio laboratorio demostró ser adecuadas estando en torno al 0.5% (RSD). Sin embargo, cuando se comparaban los resultados entre los distintos laboratorios, la precisión de la medida empeoraba hasta diferencias de hasta el 4%. Dado que durante el estudio no se impusieron protocolos de preparación de muestra específicos, achacan gran parte de estas diferencias a la falta de consenso en la aplicación de los protocolos de limpieza de las muestras, que deben ser específicos para cada elemento.

Aunque más utilizada para determinar la distribución elemental en la estructura, otra técnica muy habitual en el análisis de biominerales es la microsonda iónica o SIMS. Se ha aplicado principalmente para estudiar diferentes elementos como B, F, Mg, Sr, Rb, Ba y U, ya que, además de permitir obtener una alta resolución espacial, tiene buena precisión en la medida. Una de las ventajas de

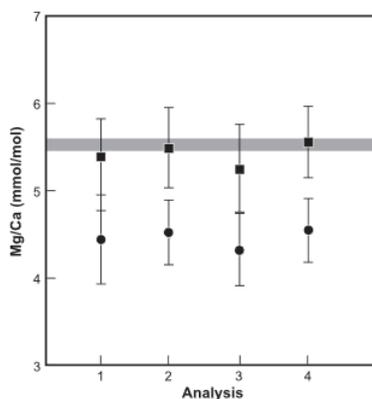
## A. INTRODUCCIÓN

---

esta técnica frente a las anteriores es que permite el análisis de los biomateriales sólidos. Otra de las técnicas para la medida directa de sólidos es la ablación láser acoplada a ICP-MS (LA-ICP-MS). El LA-ICP-MS es cada vez más popular en detrimento del SIMS, ya que es relativamente barata y permite la medida simultánea de una gran variedad de elementos a baja concentración.<sup>157</sup>

Como se ha comentado, la morfología de los caparazones es muy variable en función del grupo de organismos e incluso de la especie. Durante el análisis de la muestra, ya sea durante la ablación, el transporte al analizador o, en caso de LA-ICP-MS, en el plasma, puede ocurrir un proceso de fraccionamiento, donde las relaciones medidas elementos al ser analizados no sean representativos de la matriz de la muestra.<sup>165</sup>

Además, dado que el fraccionamiento es dependiente de la matriz de muestra, muchas veces los materiales de referencia sólidos disponibles no son apropiados. En la Figura A.3.3. aparece un ejemplo de un probable fraccionamiento inducido por la matriz. En él se observan las diferencias significativas y sistemáticas que existen entre el valor certificado para el material NIST 612, y las medidas realizadas por LA-ICP-MS que, se presuponen, son debidas a el efecto comentado.<sup>166</sup>



**Figura A.3.3.** Valores de las relaciones Mg/Ca medidas por LA-ICP-MS (círculos) en el material de referencia NIST 612, frente a sus valores de referencia (cuadrado). La línea sombreada horizontal engloba la media y la desviación estándar ( $SD=1\sigma$ ) de los valores obtenidos para las muestras en solución analizadas por ICP-MS.<sup>166</sup>

### A.3.4. Perspectivas.

A lo largo del presente bloque, se ha descrito brevemente la potencialidad de las medidas de relaciones elementales en los carbonatos biogénicos como herramienta en la determinación de las condiciones del medio marino. Sin embargo, la relación entre la incorporación de algunos elementos

a las estructuras con los parámetros ambientales no está siempre confirmada. Esto se debe, no sólo a la dificultad que entraña desarrollar modelos de partición iónica para organismos vivos, sino también a la influencia de varios factores que pueden afectar de maneras diferentes a la incorporación de un mismo elemento. Por este motivo, muchas veces la tendencia es la determinación de varias relaciones a la vez, que permitan acotar la influencia de cada factor sobre el proceso.<sup>167</sup> Así mismo, los valores tan bajos de concentración en los que se encuentran algunos de estos elementos (como el B o el Mg), exigen el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la detección multi-elemental de elementos a muy baja concentración, libre de interferencias y con tolerancia a la matriz. Por estas razones, algunas de las técnicas más prometedoras y cada vez más habituales en este campo son las basadas en ICP-MS, ya que, como se ha explicado en detalle a lo largo del apartado A.1., entre las capacidades de esta fuente están un amplio rango dinámico de análisis, cuantificación virtualmente independiente de la matriz, y detección multi-elemental cuasi-simultánea.<sup>168</sup>

### A.3.5. Bibliografía.

---

- <sup>129</sup> Lalli, C. y Parsons, T. *Biological Oceanography: An Introduction* (2<sup>nd</sup> ed). Ed. Butterworth-Heinemann. (1987). ISBN: 0 7506 3384 0.
- <sup>130</sup> Mackas, D. L.; Denman, K. L. y Abbott, M. R.; Plankton patchiness: biology in the physical vernacular. *Bulletin of Marine Science*, 37, p. 652-674. (1985).
- <sup>131</sup> Moon-van der Staay, S. Y.; de Wachter, R. y Vaulot, D.; Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409, p. 607-610. (2001). DOI:10.1038/35054541.
- <sup>132</sup> Hardy, A. C. y Gunther, E. R.; The plankton of the South Georgia whaling grounds and adjacent waters 1926-1927. *Discovery Reports*, 11, p. 1- 456. (1935).
- <sup>133</sup> Behrenfeld, M. J. y Falkowski, P. G. Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. *Limnology and Oceanography*, 42, p. 1-20. (1997). DOI: 10.4319/lo.1997.42.1.0001.
- <sup>134</sup> Schopf, J. y Packer, B.; Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science*, 237, p. 70–73. (1987). DOI: 10.1126/science.11539686.
- <sup>135</sup> Honjo, S.; Sedimentation of materials in the Sargasso Sea at 5367 m depth deep station. *Journal of Marine Research*, 36, p. 1469-1492. (1978).
- <sup>136</sup> [http://www2.sunysuffolk.edu/mandias/global\\_warming/impact\\_ocean\\_acidification.html](http://www2.sunysuffolk.edu/mandias/global_warming/impact_ocean_acidification.html) (consultada el 12/12/2016).
- <sup>137</sup> Schmidt, W. J. *Die Bausteine des Tierkörpers in Polarisiertem Lichte*. Ed. F. Cohen. (1924).
- <sup>138</sup> Weiner, S. y Dove, P. M.; An Overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, p. 1-29. DOI: 10.2113/0540001.
- <sup>139</sup> Lowenstam, H. A.; Minerals formed by organisms. *Science*, 211, p. 1126-1131. (1981). DOI: 10.1126/science.7008198.
- <sup>140</sup> Boyle, E. A.; Cadmium, zinc, copper, and barium in foraminifera tests. *Earth and Planetary Science letters*, 53, p. 11-35. (1981). DOI:10.1016/0012-821X(81)90022-4.
- <sup>141</sup> Fisher, G. y Wefer, G.; *Uses of Proxies in Paleooceanography: Examples from the South Atlantic*. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. (1999). ISBN 978-3-642-58646-0.
- <sup>142</sup> Lea, D. W; Mashiotta, T. A. y Spero, H. J.; Controls on magnesium and strontium uptake in planktonic foraminifera determined by live culturing. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, p. 2369–2379. (1999). DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00197-0.
- <sup>143</sup> Prieto, M.; Stoll, H.; *Ion Partitioning in Ambient-Temperature Aqueous Systems*. EMU Notes in Mineralogy, Vol. 10. Ed. The Mineralogical Society of Great Britain and Ireland. (2010). ISBN: 978-0903056-26-7.
- <sup>144</sup> Morse, J. W. y Bender, M. L.; Partition coefficients in calcite: Examination of factors influencing the validity of experimental results and their application to natural systems. *Chemical Geology*, 82, p. 265-277. (1990). DOI:10.1016/0009-2541(90)90085-L.
- <sup>145</sup> Langer, G.; Gussone, N.; Nehrke, G., Riebesell, U.; Eisenhauer, A.; Rost, B.; Trimborn, S. y Thoms, S.; Coccolith strontium to calcium ratios in *Emiliania huxleyi*: The dependence on seawater strontium and calcium concentrations. *Limnology and Oceanography*, 51, p. 310-320. (2006). DOI: 10.4319/lo.2006.51.1.0310.
- <sup>146</sup> James, R. H. y Austin, W. E. N.; Biogeochemical control on paleoceanographic environmental proxies: a review. *Geological Society of London, Especial Publications*, 303, p. 3-32. DOI: 10.1144/SP303.2
- <sup>147</sup> Stoll, H. M.; Langer, G.; Shimizu, N. y Kanamaru, K.; B/Ca in coccoliths and relationship to calcification vesicle pH and dissolved inorganic carbon concentrations. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 80, p. 143–157 (2012). DOI: 10.1016/j.gca.2011.12.003.

- <sup>148</sup> Yu, J.; H. Elderfield, H. y Hönisch, B.; B/Ca in planktonic foraminifera as a proxy for surface seawater pH. *Paleoceanography*, 22, p. 1-17. (2007). DOI: 10.1029/2006PA001347.
- <sup>149</sup> Foster, G.; Seawater pH, pCO<sub>2</sub> and [CO<sub>2</sub><sup>-3</sup>] variations in the Caribbean Sea over the last 130 kyr: A boron isotope and B/Ca study of planktic foraminifera, *Earth and Planetary Science Letters*, 271, p. 254–266. (2008). DOI: 10.1016/j.epsl.2008.04.015.
- <sup>150</sup> Nürnberg, D.; Bijma, J. y Hemleben, C.; Assessing the reliability of magnesium in foraminiferal calcite as a proxy for water mass temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, p. 803-814. (1996). DOI: 10.1016/0016-7037(95)00446-7.
- <sup>151</sup> Stoll, H. M. y Schrag, D. P.; Coccolith Sr/Ca as a new indicator of coccolithophorid calcification and growth rate. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 1. (2000) DOI: 10.1029/1999GC000015.
- <sup>152</sup> Sanyal, A.; Bijma, J.; Spero, H. y Lea, D.W.; Empirical relationship between pH and the boron isotopic composition of *Globigerinoides sacculifer*: Implications for the boron isotope paleo-pH proxy. *Paleoceanography*, 16, p. 515–519. (2001). DOI: 10.1029/2000PA000547.
- <sup>153</sup> Boyle, E. A.; Cadmium: Chemical tracer of deep water paleoceanography. *Paleoceanography*, 3, p. 471-489. (1988). DOI: 10.1029/PA003i004p00471.
- <sup>154</sup> Rickaby, R. E. M. y Elderfield, H.; Planktonic foraminiferal Cd/Ca: Paleonutrients or paleotemperature? *Paleoceanography*, 14, p. 293-303. (1999) DOI: 10.1029/1999PA900007.
- <sup>155</sup> Lea, D.W. y Boyle, E. A.; Determination of carbonate-bound barium in foraminifera and corals by isotope dilution plasma-mass spectrometry. *Chemical Geology*, 103, p. 73-84. (1993). DOI: 10.1016/0009-2541(93)90292-Q.
- <sup>156</sup> Hall, J. M. y Chan, L. H.; Li/Ca in multiple species of benthic and planktonic foraminifera: thermocline, latitudinal, and glacial-interglacial variation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, p. 529-545. DOI: 10.1016/S0016-7037(03)00451-4.
- <sup>157</sup> Hathorne, E. C.; Alard, O.; James, R. H. y Rogers, N. W.; Determination of intratest variability of trace elements in foraminifera by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 4. (2003). DOI: 10.1029/2003GC000539.
- <sup>158</sup> Bargagli, R.; Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 166, p. 129–173. (2000).
- <sup>159</sup> Marchitto, T. M.; Curry, W. B. y Oppo, D. W.; Zinc concentrations in benthic foraminifera reflect seawater chemistry. *Paleoceanography*, 15, p. 299-306. (2000). DOI: 10.1029/1999PA000420.
- <sup>160</sup> Rickaby, R. E. M.; Greaves, M. J. y Elderfield, H.; Cd in planktonic and benthic foraminiferal shells determined by thermal ionisation mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, p. 1229–1236. (2000). DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00317-8.
- <sup>161</sup> de Villiers, S.; Greaves, M. y Elderfield, H.; An intensity ratio calibration method for the accurate determination of Mg/Ca and Sr/Ca of marine carbonates by ICP-AES, *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 3. (2002). DOI: 10.1029/2001GC000169.
- <sup>162</sup> Green, D. R. H.; Cooper, M. J.; German, C. R. y Wilson, P. A.; Optimization of an inductively coupled plasma– optical emission spectrometry method for the rapid determination of high-precision Mg/Ca and Sr/Ca in foraminiferal calcite, *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 4. (2003). DOI:10.1029/2002GC000488.
- <sup>163</sup> Rosenthal, Y.; Field, M. P. y Sherrell, R. M.; Precise determination of element/calcium ratios in calcareous samples using sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 71, 3248–3253. (1999). DOI: 10.1021/zc981410x.
- <sup>164</sup> Rosenthal, Y. et al.; Interlaboratory comparison study of Mg/Ca and Sr/Ca measurements in planktonic foraminifera for paleoceanographic research. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 5. (2004). DOI: 10.1029/2003GC000650.
- <sup>165</sup> Kuhn, H. R. y Günther, D.; Laser ablation-ICP-MS: particle size dependent elemental composition studies on filter-collected and online measured aerosols from glass. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 1158-1164. (2004). DOI: 10.1039/B404729J.

## A. INTRODUCCIÓN

---

<sup>166</sup> Hathorne, E. C.; James, R. H.; Savage, P. y Alard, O.; Physical and chemical characteristics of particles produced by laser ablation of biogenic calcium carbonate. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, p. 240–243. (2008). DOI: 10.1039/B706727E.

<sup>167</sup> Stoll, H. M.; Klaas, C. M.; Probert, I.; Ruiz Encinar, J. y Garcia Alonso, J. I.; Calcification rate and temperature effects on Sr partitioning in coccoliths of multiple species of coccolithophorids in culture. *Global and Planetary Change*, 34, p. 153-171. (2002). DOI: 10.1016/S0921-8181(02)00112-1.

<sup>168</sup> Yu, J.; Day, J.; Greaves, M. y Elderfield, H.; Determination of multiple element/calcium ratios in foraminiferal calcite by quadrupole ICP-MS. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 6. (2005). DOI: 10.1029/2005GC000964.

## **B. OBJETIVOS/OBJECTIVES**



**B.1. OBJETIVOS.**

Como consecuencia de lo expuesto a lo largo de la Introducción, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es:

**“Desarrollo de metodologías analíticas basadas en ICP-QQQ para la determinación de relaciones elementales e isotópicas en matrices complejas.”.**

Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de una metodología analítica genérica basada en ICP-QQQ para la cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos sin patrones específicos a través de heteroátomos presentes de forma natural en ellos.
2. Desarrollo de una metodología para la cuantificación absoluta de proteínas, tanto de patrones comerciales como de muestras reales complejas, mediante capHPLC-ICP-QQQ y dilución isotópica post-columna, a través de la medida del S presente de forma natural sin necesidad de patrones de cuantificación específicos.
3. Desarrollo de una metodología para llevar a cabo la determinación del grado de fosforilación global y específico en fosfoproteínas, mediante el análisis de proteínas intactas y sus derivados peptídicos, respectivamente a través de la medida de relaciones P/S mediante LC-ICP-QQQ y sin necesidad de patrones específicos.
4. Desarrollo de una metodología basada en ICP-QQQ para la determinación libre de interferencias de relaciones elementales B/Ca a baja concentración en carbonatos biogénicos procedentes del plancton marino, para la elucidación de las condiciones paleoclimáticas en el océano.



## **B.2. OBJECTIVES.**

Resulting from what has been stated along the introduction, the global objective of the present PhD Thesis is:

**“Development of analytical methodologies based on the use of ICP-QQQ instrumental platform for the elemental and isotope determination in complex matrixes”.**

This main objective will be address through the following partial objectives:

1. Development of a generic analytical methodology based on ICP-QQQ for absolute peptide and phosphopeptide quantification without the use of specific standards through heteroatoms naturally present in them.
2. Development of an absolute protein quantification methodology, both for commercial standards and complex real samples, with capHPLC-ICP-QQQ and post-column isotope dilution, through the detection of S naturally present, without the use of specific quantification standards.
3. Development of methodology for the global and specific phosphorylation degree determination in phosphoproteins through the analysis of intact proteins and their derived peptides, respectively, through P/S ratio determinations with LC-ICP-QQQ and without the need of specific standards.
4. Development of a methodology based on the ICP-QQQ platform for the interference-free determination of low B/Ca ratios in biogenic carbonate samples generated by marine plankton for the elucidation paleoclimatic conditions in the ocean.



## **C. EXPERIMENTAL**



## **C.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.**

Dado que todos los resultados de la presente Tesis Doctoral aparecen presentados como parte de publicaciones científicas (publicadas o enviadas) con sus correspondientes materiales y procedimientos, en este apartado *C. Experimental* únicamente se aportará la información relativa a la instrumentación analítica utilizada a lo largo del trabajo.

### **C.1.1. Espectrómetro de masas atómico.**

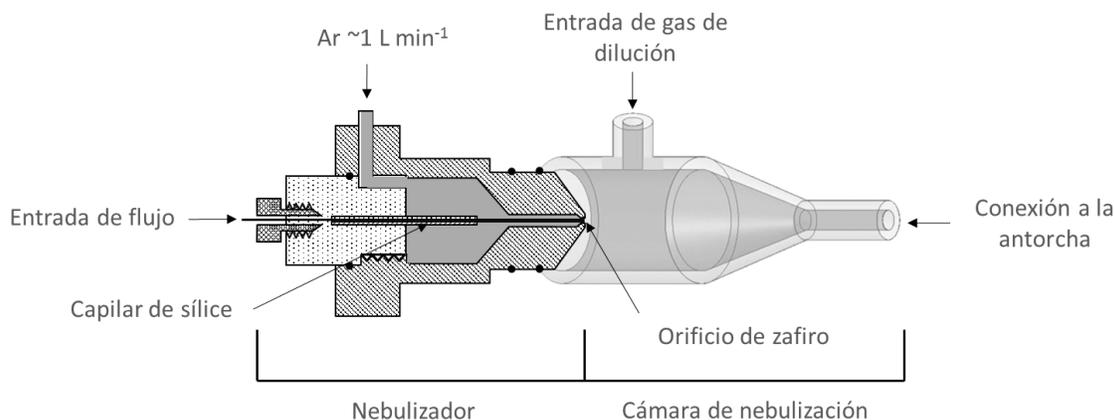
El equipo utilizado a lo largo de toda la tesis doctoral ha sido el equipo 8800 Triple Cuadrupolo (ICP-QQQ) de Agilent Technologies (Tokio, Japón) equipado con una configuración en tándem (MS/MS) de dos cuadrupolos entre los cuales se encuentra una CRC denominada ORS<sup>3</sup> (u ORC<sup>3</sup>). El equipo aparece descrito en detalle en el apartado A.1.4.3.3.3. de la Introducción.

Para el desarrollo de las distintas metodologías se han utilizado varios sistemas de introducción de muestra e interfaces acopladas al ICP-QQQ, las cuales se describirán a continuación.

Para el acoplamiento de la cromatografía capilar al equipo, es necesario un nebulizador que permita la introducción de microflujos en el sistema. Este nebulizador se denomina *nebulizador de consumo total* o capLC (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU). Está constituido por un tubo capilar de sílice de 50  $\mu\text{m}$  de d.i. y 180  $\mu\text{m}$  de d. e., con una longitud de 41 mm. Este pequeño diámetro interno provoca una resistencia al paso del fluido que permite mantener estable el flujo entre 0.5 y 15  $\mu\text{L min}^{-1}$  y su transferencia total a fase gas (variable dependiendo de la composición del fluido). El capilar de sílice atraviesa el nebulizador, saliendo su extremo por un orificio de zafiro de 254  $\mu\text{m}$  de d.i. en el que se forma el aerosol. La posición de trabajo del capilar puede ajustarse para optimizar la formación del espray.

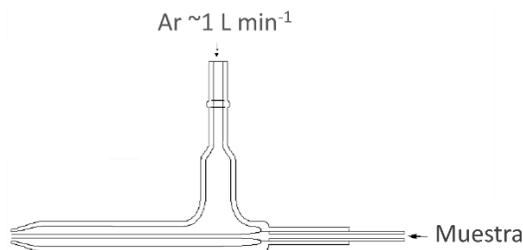
La cámara de nebulización utilizada conecta directamente el nebulizador a la antorcha y consta de una entrada para un gas opcional que favorece la dilución del aerosol. En la Figura C.1. aparece un esquema de ambas partes.

## C. EXPERIMENTAL



**Figura C.1.** Esquema del nebulizador de consumo total y la cámara de nebulización<sup>i</sup>.

En el caso de los análisis a flujos convencionales ( $\sim 300 \mu\text{L min}^{-1}$ ), se utilizaron dos nebulizadores distintos según el caso; un *nebulizador convencional concéntrico* de cuarzo de Meinhard (Golden, CO, USA), y un *nebulizador de flujo cruzado* Cross Flow (X-Flow) de PFA de Saville (Eden Prairie, MN, EEUU). Un esquema de nebulizador concéntrico aparece en la Figura C.2.

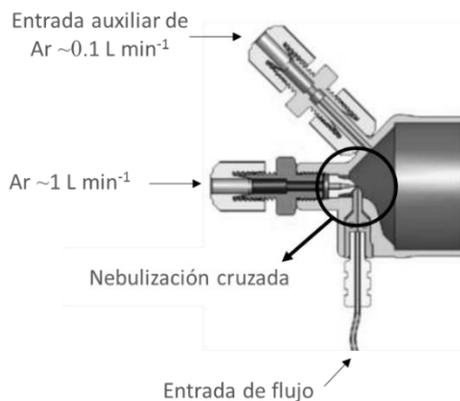


**Figura C.2.** Esquema de un nebulizador concéntrico<sup>ii</sup>.

El *nebulizador X-Flow*, al igual que el nebulizador concéntrico, tiene 2 entradas de gases, una para el gas portador (*carrier gas*), y otra para el gas auxiliar (*make-up gas*). En este caso, la nebulización se produce al cruzarse en un ángulo de  $90^\circ$  el flujo del gas portador y el flujo de la muestra. Una imagen del esquema de este nebulizador aparece en la Figura C.3.

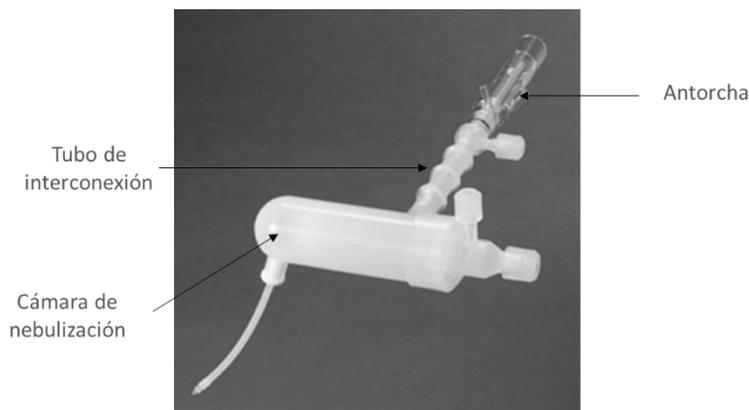
<sup>i</sup> Pereira Navaza, A.; Cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos mediante la integración de espectrometría de masa elemental y molecular. Directores: Alfredo Sanz Medel y Jorge Ruiz Encinar. Dpto. Química Física y Analítica. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. (2009). <http://hdl.handle.net/10651/14959>.

<sup>ii</sup> [http://analyticalprofessional.blogspot.com.es/2013\\_06\\_01\\_archive.html](http://analyticalprofessional.blogspot.com.es/2013_06_01_archive.html) (consultada el 06/02/2016).



**Figura C.3.** Esquema de nebulizador X-Flow<sup>iii</sup>.

Este nebulizador fue utilizado con dos interfaces de introducción de muestra diferentes. Para el caso del análisis de proteínas y nanopartículas, se utilizó con la configuración estándar del equipo y utilizando la bomba peristáltica para la introducción de la muestra. Para el caso del análisis de las relaciones elementales B/Ca en matrices de carbonatos biogénicos, se utilizó junto a un kit de inertes de PFA de Agilent (Waldbronn, Alemania). Este kit está integrado por una cámara de nebulización, un tubo de interconexión, ambos de PFA, y una antorcha de 2.5 mm d.i. con un inyector de zafiro. En estos análisis el nebulizador X-Flow se utilizó en modo auto-aspiración con una sonda de 100  $\mu\text{L min}^{-1}$ . En la Figura C.4. aparece una imagen del kit.



**Figura C.4.** Kit de inertes de PFA<sup>iv</sup>.

<sup>iii</sup> [www.savillex.com](http://www.savillex.com) (consultada el 28/11/2014)

<sup>iv</sup> [www.savillex.com](http://www.savillex.com) (consultada el 28/11/2014).

### ***C.1.2. Espectrómetro de masas molecular.***

En los casos en los que fue necesaria una identificación de péptidos y proteínas se utilizó un equipo IMPACT II ESI UHR-QqTOF-MS, con resolución  $>50\,000$  y  $N_2$  como gas de nebulización de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania). El equipo fue calibrado diariamente con un patrón comercial (ESI tuning MIX, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EE.UU.).

### ***C.1.3. Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas.***

Para las separaciones cromatográficas a nivel capilar se utilizó un sistema de HPLC capilar (capHPLC) 1260 Infinity de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Este sistema consta de una bomba capilar, un desgasificador y un micro auto-muestreador. Dado que el sistema no consta de un módulo termostático, en ocasiones fue necesario utilizar un horno externo Spark Holland (Mistral, Holanda) para regular la temperatura en la columna.

Para las separaciones cromatográficas con flujos convencionales ( $300\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ ) se empleó cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) con una bomba de alta presión de doble pistón Shimadzu LC-10AD (Kioto, Japón). Como válvula de inyección se utilizó una de marca Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EE.UU.), con un bucle de un volumen de inyección de  $20\ \mu\text{L}$ . Las conexiones empleadas fueron de PEEK con d.i. de  $254\ \mu\text{m}$ .

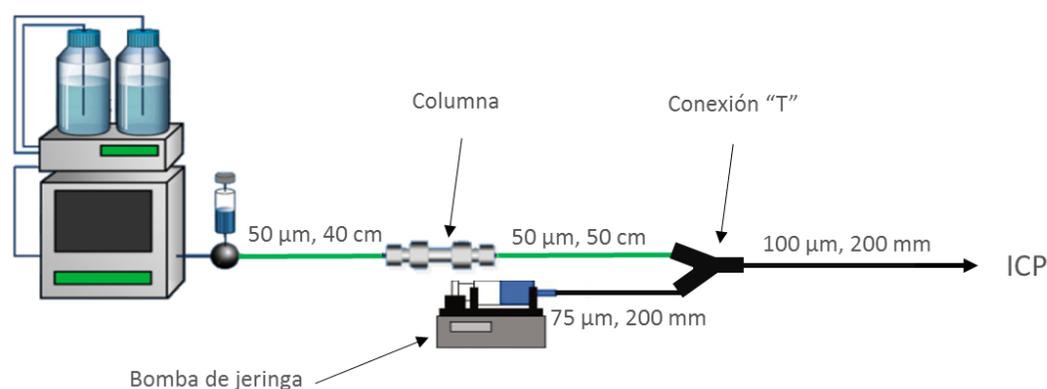
Las columnas cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Columna capilar C18 Agilent Zorbax SD  $150\ \text{mm}$ ,  $0.3\ \text{mm}$  i.d., con un tamaño de partícula de  $5\ \mu\text{m}$  ( $80\ \text{Å}$  de tamaño de poro). Mecanismo de separación de fase reversa.
- Columna capilar C4 BIOShell  $150\ \text{mm}$ ,  $0.3\ \text{mm}$  i.d., con un tamaño de partícula de  $3.4\ \mu\text{m}$  ( $400\ \text{Å}$  de tamaño de poro). Mecanismo de separación de fase reversa.
- Columna de flujo convencional Superdex GE Healthcare TM 200 5/150 GL. Mecanismo de separación de exclusión por tamaños.

#### C.1.4. Otra instrumentación.

La infusión de microflujos para las diluciones post-columna en los análisis de fase reversa con capHPLC acoplado al ICP-QQQ fue llevada a cabo con una bomba de jeringa KD Scientific (Holliston, MA, EEUU). La jeringa utilizada en todos los casos fue una Hamilton de 1 mL modelo 1000 Serie Gastight.

Las conexiones cromatográficas utilizadas en el sistema capilar fueron PEEK de sílice fundido (Agilent, Alemania). Las conexiones de los tubos de PEEK se realizaron con una pieza del mismo material con volumen muerto cero de 1/32" de Agilent, donde se mezclaban el flujo proveniente de la columna y el de la bomba de jeringa. Los diámetros interno y longitudes de cada PEEK, así como un esquema general del sistema aparecen en la Figura C.5.



**Figura C.5.** Sistema experimental utilizado para las separaciones cromatográficas en flujo capilar.

Para los análisis por ESI-QTOF-MS se utilizó la configuración sin la parte correspondiente al flujo post-columna (en negro en la figura C.4.).



## **D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **D.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA GENÉRICA PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE (FOSFO)PÉPTIDOS SIN PATRONES ESPECÍFICOS BASADA EN ICP-QQQ.**

### **D.1.1. Introducción.**

Como ya se ha comentado, el enfoque tradicional para llevar a cabo estudios de proteómica es el *bottom-up*, es decir, a través de los componentes peptídicos de la proteína que se separan previamente al análisis. En el caso de la fuente ICP, es imprescindible una adecuada y completa separación de los diferentes péptidos, ya que, al destruirse las especies en el plasma y detectarse únicamente elementos, no podrían distinguirse el origen de las diferentes señales obtenidas. La cromatografía más habitual para el análisis de péptidos es la cromatografía de *fase reversa* (RP), cuyo mecanismo de separación se basa en la polaridad de las moléculas. La fase estacionaria de las columnas de RP es habitualmente de partículas de sílice (SiO<sub>2</sub>) que llevan asociadas cadenas hidrocarbonadas. Para el caso específico de la separación de péptidos suelen emplearse cadenas de 18 carbonos (C18). Los péptidos establecen interacciones hidrofóbicas con las cadenas de C18 quedando retenidos en la columna, y la elución y consiguiente separación de los mismos se consigue disminuyendo la polaridad del disolvente gradualmente. Esto se consigue aumentando la proporción de la fase orgánica respecto a la fase acuosa, normalmente aumentando el porcentaje de un modificador orgánico (p.ej. metanol o ACN). Por lo tanto, la separación de los péptidos se hace en base a fases móviles con alto contenido en carbono, lo que requiere una serie de consideraciones especiales.

Es un hecho constatado que la presencia de carbono en el plasma es una fuente de interferencias tanto espectrales como no espectrales en ICP-MS.<sup>i</sup> Además, en estudios previos realizados en el

---

<sup>i</sup> Montaser, A.; Inductively coupled plasma mass spectrometry. Ed. Wiley-VCH, New York. (1998). ISBN: 978-0-471-18620-5.

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

grupo de investigación<sup>ii</sup> además de en otros muchos estudios,<sup>iii,iv,v</sup> se ha descrito que la presencia de C afecta a la señal de los diferentes elementos, especialmente en aquellos con altos potenciales de ionización. La magnitud de este efecto depende de varios factores como el elemento, las condiciones experimentales y la fuente específica de C, aunque se ha observado que existe una tendencia al incremento de la señal en elementos como Se, As, P o S.<sup>ii,vi</sup> Este efecto se asocia a procesos de transferencia de carga inducidas por diferentes especies del C ( $C^+$ ,  $CO_2^+$ ,  $C_2^+$ , ...), que aumentan la población iónica de los analitos en el plasma<sup>vi</sup>. Además, se ha descrito que la presencia de disolventes orgánicos mejora la eficiencia en el transporte de la muestra hasta el plasma gracias a los cambios físicos que provoca en ella durante la nebulización.<sup>vii</sup>

Sin embargo, la magnitud de dicho efecto depende de la cantidad de C presente.<sup>ii</sup> Esto supone que, al realizar un gradiente con fase orgánica en una separación cromatográfica, el aporte de C va en aumento a lo largo del análisis, lo que conlleva una variación de la señal de los elementos a lo largo del mismo y, por lo tanto, un cambio en el factor de respuesta a lo largo del gradiente, comprometiendo la posibilidad de cuantificar los péptidos con un patrón genérico. Además, el empleo de disolventes orgánicos lleva a una deposición de C sobre los conos que va disminuyendo la sensibilidad del equipo y puede suponer su obturación y la imposibilidad de seguir con el análisis.

---

<sup>ii</sup> Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Carrascal, M.; Abián, J. y Sanz-Medel, A.; *Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures*. *Analytical Chemistry*, 80, p. 1777-1787. (2008). DOI: 10.1021/ac7022316.

<sup>iii</sup> Yanes, E. G. y Miller-Ihli, N.J.; *Parallel path nebulizer: Critical parameters for use with microseparation techniques combined with inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60, p. 555 – 561. (2005). DOI: 10.1016/j.sab.2005.03.007.

<sup>iv</sup> Leclercq, A.; Nonell, A.; Todolí Torró, J. L.; Bresson, C.; Vio, L.; Vercoüter, T. y Chartier, F.; *Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: a tutorial review. Part I. Theoretical considerations*. *Analytica Chimica Acta*, 23, p. 33-56. DOI: 10.1016/j.aca.2015.03.049.

<sup>v</sup> Larsen, E. H. y Stürup, S.; *Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation*. *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry*, 9, p. 1099-1105. (1994). DOI: 10.1039/JA9940901099.

<sup>vi</sup> Grindlay, G.; Mora, J.; de Loos-Vollebregt, M. y Vanhaecke, F.; *A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, p. 42-49. (2013). DOI: 10.1016/j.sab.2013.05.002.

<sup>vii</sup> Kanaki, K. y Pergantis, S. J.; *Using nanoparticles to determine the transport efficiency of microflow and nanoflow nebulizers in inductively coupled plasma-mass spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, 1041-1046. (2016). DOI: 10.1039/c5ja00474h.

La compensación de dicha variación puede hacerse desde un punto de vista instrumental o a través de factores de corrección. Esta última estrategia es la empleada por Wind et al.,<sup>viii</sup> pioneros en la idea de la cuantificación peptídica y proteica a través de los átomos de S y P con MS elemental. En su artículo, calculan la relación experimental de P/S a lo largo del gradiente orgánico. La variación de la relación a lo largo del mismo, permite obtener un factor de corrección ( $f_{corr}$ ) que se aplica posteriormente a la relación experimental P/S en el análisis cromatográfico de la proteína o péptido. Sin embargo, la corrección no permite la cuantificación adecuada de dichos elementos por separado, si no que únicamente permite corregir la variación de la sensibilidad en la determinación de dicha relación elemental (P/S). Otros estudios llevan a cabo enfoques similares.<sup>ix</sup> La estrategia instrumental empleada en el siguiente trabajo, se basa en la desarrollada previamente por Pereira Navaza et al.,<sup>ii</sup> que consiste en la adición de un flujo constante de ACN post-columna, para compensar los efectos del gradiente cromatográfico. Esta adición simula un flujo isocrático, asegurando así unas condiciones experimentales constantes para la fuente ICP en la zona de elución de los péptidos/proteínas. La optimización del flujo post-columna empleado en el siguiente trabajo se hizo experimentalmente ensayando concentraciones de ACN:H<sub>2</sub>O, en combinación con diferentes flujos cromatográficos y post-columna, hasta obtener una señal para el P y el S constante a lo largo del mismo. Por otra parte, en el mismo estudio, se constató la eficacia de una interfase basada en el uso de un nebulizador capilar de consumo total (descrita en el apartado C.1.) para la cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos con patrones genéricos.

Para evitar la deposición de C en los conos y favorecer la ionización de P y S, se añadió un flujo de Ar:O<sub>2</sub> previamente a la llegada del flujo cromatográfico a la entrada al plasma junto al empleo del nebulizador de consumo total ya que, además de permitir usar un mejor flujo (menos cantidad de C al plasma), mejora la eficiencia del transporte del flujo cromatográfico<sup>vii</sup> al plasma, y permite el empleo de menores volúmenes de muestra.

---

<sup>viii</sup> Wind, M.; Wesch, H. y Lehmann, W. D.; *Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 73, p. 3006-3010. (2001). DOI: 10.1021/ac010066s.

<sup>ix</sup> Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer, D. y Lehmann, W. D.; *Phosphorus-based absolutely quantified standard peptides for quantitative proteomics*. Journal of Proteome Research, 8, p. 4870-4875. (2009). DOI: 10.1021/pr900494m.

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La nueva estrategia de eliminación de interferencias que ofrece el ICP-QQQ (descrita en el apartado A.1.4.3.3.3.), se utiliza para análisis y cuantificación absoluta (fosfo)péptidos a través de los átomos de P y S. La detección libre de interferencias de dichos elementos, permite así obtener los LD absolutos más bajos publicados para el P y S hasta ese momento. Esto es especialmente crítico en el caso del S donde el LD disminuye en más de 100 veces respecto a la bibliografía previa. En el artículo D.1.1. se describe, por tanto, la metodología para la cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos, sin necesidad de patrones específicos mediante RP-capHPLC-ICP-QQQ.

Esta metodología será la base del desarrollo de los apartados D.2 y D.3. Este trabajo fue publicado en el año 2012 en la revista *Analytical Chemistry*.

## **D.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS SIN PATRONES ESPECÍFICOS MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA POST-COLUMNA.**

### **D.2.1. Introducción.**

Aunque la complejidad del análisis del proteoma a través de las proteínas intactas (*top down*) entraña dificultades instrumentales (apartado A.2), durante los últimos años la estrategia *top-down* ha conseguido establecerse finalmente no sólo como una estrategia prometedora, si no como una técnica sólida y bien establecida en el contexto de la MS molecular.<sup>1,2</sup> El porqué del gran interés científico en mejorar las metodologías y las técnicas basadas en este enfoque, lo explican de forma bastante acertada Armirotti et al.<sup>2</sup> (*del ingl.*): “trabajar con los péptidos de una proteína es como trabajar con las piezas de un puzle en vez de hacerlo con el cuadro que el puzle reproduce; los péptidos (piezas del puzle) no pueden representar a la proteína completa (cuadro)”.

La estrategia *top-down*, está enfocada a preservar la información estructural (incluyendo PTMs) de las diferentes isoformas de las proteínas mediante su medida en estado nativo, además de permitir el estudio de las interacciones que ocurren en cascadas de transducción de señales dentro de las células<sup>3</sup>. Sin embargo, dado que la MS molecular requiere de patrones específicos para la cuantificación absoluta tanto de péptidos como de proteínas completas, el análisis de estas últimas es bastante más complicado, especialmente si los patrones de cuantificación no se sintetizan *in vivo*. Por otra parte, aunque no proporciona información estructural, la estrategia *top-down* en MS

---

<sup>1</sup> Fred W. McLafferty, F. W.; Breuker, K.; Jin, M.; Han, X.; Infusini, G.; Jiang, H.; Kong, X. y Begley, T. P.; *Febs Journal*, 274, p. 6256-6268. (2007). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06147.x.

<sup>2</sup> Armirotti, A. y Damonte, G.; *Achievements and perspectives of top-down proteomics*. *Proteomics*, 10, p. 2566-3576. (2010). DOI: 10.102/pmic.201000245.

<sup>3</sup> Siuti, N. y Kelleher, N. L.; *Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry*. *Nature Methods*, 4, p. 817-821. (2007). DOI:10.1038/nmeth1097.

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

elemental sí ofrece información cuantitativa del contenido elemental de las biomoléculas, tal y como se ha demostrado en el apartado anterior D.1.

En este apartado, la metodología descrita está basada en la anterior (D.1.) para poder cuantificar proteínas intactas a través de su contenido en S y utilizando, de nuevo patrones genéricos mediante cromatografía de RP. De nuevo, al emplear un disolvente orgánico como fase móvil en un gradiente cromatográfico, es necesario corregir la variación de la sensibilidad lo largo del mismo. Sin embargo, en este caso se utiliza una estrategia diferente a la del flujo post-columna de ACN. Dado que únicamente va a medirse la señal de S, es posible utilizar en el flujo post-columna un elemento cuya señal se vea afectada por el contenido orgánico exactamente de la misma forma en la se modifica la de nuestro analito (S). Esto es posible gracias a que el S es un elemento multi-isotópico. De esta forma, se sustituye el post-columna de ACN:H<sub>2</sub>O por una disolución acuosa de un trazador enriquecido en <sup>34</sup>S. La corrección de la variación de la sensibilidad es, de esta forma, mucho más precisa. Además, el empleo del trazador permite llevar a cabo una estrategia de cuantificación absoluta combinada, basada en la dilución isotópica y el empleo de patrones genéricos de cuantificación, que permiten corregir otros probables errores como los asociados a la inyección de pequeños volúmenes (1-2 µL).

Por tanto, el trabajo que aparece en este capítulo, describe una metodología basada en el acoplamiento capHPLC-ICP-QQQ para la cuantificación absoluta de proteínas intactas mediante dilución isotópica en línea. Los LD obtenidos para la detección de las proteínas a través del S son, gracias a las características analíticas del ICP-QQQ, los más bajos obtenidos hasta ahora mediante esta técnica de análisis elemental. La combinación del flujo post-columna de <sup>34</sup>S para compensar los cambios de sensibilidad debidos al gradiente orgánico, la recuperación cromatográfica cuantitativa para todas las especies analizadas (96-100%) y el uso de un patrón de S genérico (sencillo y comercial) añadido a la muestra, permiten obtener una respuesta independiente para cada compuesto analizado, lo que lleva a la cuantificación independiente y absoluta de cada proteína incluso cuando no existen patrones específicos.

Una vez desarrollada, optimizada y validada la metodología con patrones de proteínas certificados, se evaluó su potencial aplicabilidad a muestras reales. Es evidente que, en la detección cromatográfica, la combinación de la MS elemental y la MS molecular puede ser muy útil para simplificar estudios cuantitativos de mezclas de proteínas relativamente complejas. Como ejemplo,

en este apartado se integran la cuantificación absoluta de las toxinas procedentes de venenos de serpientes (venómica) mediante ICP-MS sin la necesidad de recurrir a los patrones específicos, aprovechando la información analítica que se obtiene de las tecnologías “-omics”. Además, este enfoque multidisciplinar podría suponer nuevos puntos de vista y nuevos avances en el campo de la venómica, toxico-venómica, o en la venómica ecología y evolutiva.

Este trabajo se ha desarrollado en colaboración con el Dr. Juan José Calvete Chornet, jefe del Laboratorio de Proteómica Estructural en el Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), dando lugar a un artículo publicado en la revista *Analytical Chemistry* en el año 2016 (Artículo D.2.1.).



### **D.3. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN GLOBAL Y ESPECÍFICO EN FOSFOPROTEÍNAS MEDIANTE RELACIONES P/S.**

#### **D.3.1. Introducción.**

En el caso particular de la fosforilación, la importancia de llevar a cabo su cuantificación radica en que la función biológica de la proteína modificada está modulada no sólo por el grado total de fosforilación, sino también por la presencia, ausencia o grado de modificación que tiene cada sitio de fosforilación de forma específica. En función de lo anterior, una misma proteína puede regular y ser regulada de forma diferente a otras proteínas en diferentes cascadas de señalización. Por este motivo, es importante diferenciar entre el concepto de *cuantificación de fosfoproteínas* (o cuantificación de la fosforilación) y el de *cuantificación del grado de fosforilación*.

Aunque se forma genérica se puede hablar de cuantificación de la fosforilación, este concepto se emplea normalmente para indicar el número de átomos de P por molécula de proteína, es decir, el número de sitios de fosforilación “activos”. Sin embargo, cuantificación del grado de fosforilación implica determinar el número de átomos de P presentes respecto a sitios de fosforilación posibles, es decir, requiere conocimiento previo de la proteína o, al menos, la identificación de las diferentes formas de la proteína. A pesar de la importancia biológica del grado de fosforilación ya comentada a lo largo de la introducción, normalmente los métodos analíticos disponibles se centran en la detección de la isoforma fosforilada<sup>1,2</sup> en parte por las dificultades que entraña asegurar la presencia de un sitio de fosforilación cuando este no posee la modificación en el momento del análisis.

La determinación del grado de fosforilación se puede afrontar tanto desde un punto de vista global, a través del análisis de la proteína intacta, como desde un punto de vista específico a través del

---

<sup>1</sup> Wind, M.; Wesch, H. y Lehmann, W. D.; *Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 73, p. 3006-3010. (2001). DOI: 10.1021/ac010066s.

<sup>2</sup> Boehm, M. E.; Seidler, J.; Hahn, B. y Lehmann, W. D.; *Site-specific degree of phosphorylation in protein measured by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. *Proteomics*, 12, p. 2167-2178. (2012). DOI: 10.1002/pmic.201100261.

## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

análisis de los correspondientes péptidos trípticos. Independientemente de si se emplea MS molecular o elemental, el segundo enfoque se suele realizar a través del análisis de los péptidos producidos tras una digestión proteolítica (generalmente con tripsina), y mediante el acoplamiento a técnicas de separación tales como la LC de RP. Sin embargo, en el apartado D.1. del presente documento se demostró que el nebulizador de consumo total era perfectamente válido para el análisis de proteínas intactas mediante ICP-QQQ.

Con la metodología presentada a continuación, se ofrece la posibilidad de obtener tanto la cuantificación de la fosforilación como la del grado de fosforilación global de la proteína. Además, se evalúa la posibilidad de obtener el grado de fosforilación específico para cada sitio de fosforilación de forma individual. Esta metodología se basa en la desarrollada en el apartado D.1; la separación de las diferentes especies mediante un acoplamiento de RP-capHPLC-ICP-QQQ, utilizando para su cuantificación patrones genéricos. Al igual que en la metodología del apartado D.2., la metodología se complementa con análisis por MS molecular en los casos en los que es necesaria la identificación de las especies.

En primer lugar, para el análisis de las fosfoproteínas intactas y al contrario que en el caso anterior (D.2.), no es necesario evaluar la recuperación cromatográfica de la columna. Al encontrarse ambos elementos (S y P) en la misma molécula su relación será constante, y se mantendrá incluso si solo eluye de la columna un porcentaje determinado de la fosfoproteína. De la misma forma, es posible llevar a cabo una cuantificación por calibrado externo empleando mezclas de patrones de P y S, siempre que se asegure que no existen diferencias de respuesta en el ICP entre los patrones de cuantificación. En el caso del análisis de P y S proteico, al estar en la misma molécula, ambos estarán sujetos a la misma respuesta analítica.

Por otra parte, el efecto de la variación de la sensibilidad debida al modificador orgánico ya no puede corregirse por dilución isotópica (apartado D.2.) dado que el P es un elemento monoisotópico, por lo que se recupera la estrategia general descrita en el apartado D.1.2.; la corrección experimental mediante un flujo post-columna de ACN.

En el artículo correspondiente (D.3.1.) enviado a la revista *Journal of Chromatography A*, se describe la metodología desarrollada y aplicada a una proteína modelo ( $\beta$ -caseína), calculándose su grado de fosforilación global y el grado de fosforilación específico. Los resultados obtenidos están en perfecta concordancia con los valores certificados por el proveedor, así como los publicados en la bibliografía.

Además, esta metodología se ha aplicado a una muestra real. Esta muestra real consiste en una proteína en origen no fosforilada a la que, mediante un proceso de alteración de su traducción, se le sustituye un residuo aminoacídico no fosforilado, por otro ya fosforilado (la fosforilación no procede del proceso post-traducciona habitual).<sup>3</sup> Por tanto, el objeto del análisis de la muestra real es doble: validar la metodología desarrollada y determinar la eficiencia del proceso de modificación. Esta proteína sintética ha sido sintetizada por el Prof. Jesse Reinhart del grupo de Fisiología Molecular y Celular de la Universidad de Yale (EEUU).

---

<sup>3</sup> Pirman, N. L.; Barber, K. W.; Aerni, H. R.; Ma, N. J.; Haimovich, A. D.; Rogulina, S.; Isaacs, F. J. y Rinehart, J.; *A flexible codon in genomically recoded Escherichia coli permits programmable protein phosphorylation*. Nature Communications 6:8130. (2015). DOI: 0.1038/ncomms9130.

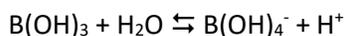


## **D.4. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE RELACIONES B/Ca A BAJA CONCENTRACIÓN EN CARBONATOS DE ORIGEN BIOGÉNICO.**

### **D.4.1. Introducción.**

Los cocolitofóridos son algas unicelulares con una distribución marina global de las que existen aproximadamente unas 200 especies.<sup>1</sup> La mayor parte de las especies de cocolitofóridos poseen un exoesqueleto cálcico compuesto por placas de calcita llamadas cocolitos de tamaños comprendidos entre 3-15 mm, y cuya morfología depende de la especie. Este grupo es uno de los principales dentro del fitoplancton y uno de lo más estudiados debido a su implicación en la biología oceánica, así como en el ciclo del carbono ya que, al ser autótrofos, tienen la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> siendo uno de los principales reservorios de C del océano. Estos organismos y más concretamente las relaciones B/Ca en sus cocolitos, serán el objeto de estudio del presente capítulo.

El B es un elemento cada vez más presente en los estudios de oceanografía ya que su incorporación en las estructuras cálcicas está directamente relacionada con el pH del medio. El boro está presente en el medio marino en como dos especies, B(OH)<sub>3</sub> y B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> que se encuentran equilibrio como se muestra en la ecuación siguiente:

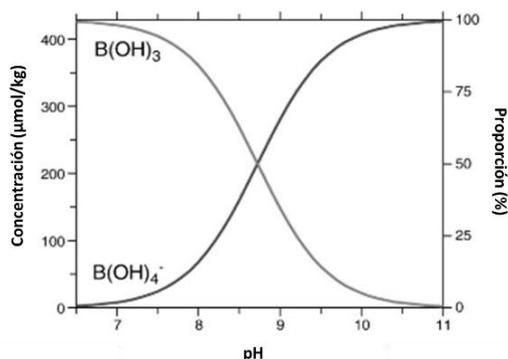


El pK<sub>B</sub> del borato (pK<sub>B</sub>=8.6, 25° C) está cercano al rango de pH natural en el océano y, como la incorporación de B en la estructura cálcica es únicamente a través del borato, a medida que el pH del medio sea más básico, mayor será el contenido de borato en el medio y, por tanto, también lo será el contenido de B en la estructura cálcica.<sup>2</sup> En la figura D.4.1. se representa el desplazamiento del equilibrio en función del pH.

---

<sup>1</sup> Young, J. R.; Geisen, M.; Cros, L.; Kleijne, A.; Probert, I. y Ostergaard, J. B.; *A guide to extant coccolithophore taxonomy*. Journal of Nannoplankton Research, Special Issue 1, p. 1–132, (2003).

<sup>2</sup> Sanyal, A.; Nugent, M.; Reeder, R. J. y Bijma, J.; *Seawater pH control on the boron isotopic composition of calcite: Evidence from inorganic precipitation experiments*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 64, p. 1551-1555. (2000). DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00437-8.



**Figura D.4.1.** Desplazamiento del equilibrio químico entre B(OH)<sub>3</sub> (ácido bórico) y B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> en función del pH (representación para las condiciones típicas del medio marino a Tª de 25 °C). Adaptada de He et al.<sup>3</sup>.

Por tanto, evaluando el contenido en boro en los distintos estratos del registro fósil oceánico, se podría elucidar la evolución del pH marino a través del tiempo geológico. Sin embargo, la medida de B en cocolitos mediante ICP-MS supone un reto analítico, no sólo por su alto potencial de ionización (8.3 eV), sino también por su baja concentración, los altos fondos, y los efectos de memoria en el sistema de introducción de muestra al equipo. Además, el isótopo mayoritario del B (<sup>11</sup>B: 80%) se encuentra muchas veces interferido por la cola del <sup>12</sup>C, cuya abundancia en las matrices de carbonato cálcico es muy grande. El B se incorpora en la matriz cálcica a muy baja concentración (ng mL<sup>-1</sup>), estando ésta muchas veces por debajo del LD con las técnicas habituales.<sup>4</sup>

Por este motivo, la matriz no puede ser diluida en exceso ya que supondría que la señal del analito fuera indistinguible de la señal del blanco. Además, y tal y como se describe en la literatura, una gran dilución de la matriz maximizaría el problema de los blancos, ya que el boro aparece como contaminante habitual en el material de laboratorio, así como en el ambiente<sup>5,6</sup>.

<sup>3</sup> He, M.; Xiao, Y.; Jin, Z.; Liu, W.; Ma, Y.; Zhang, Y. y Luo, C.; *Quantification of boron incorporation into synthetic calcite under controlled pH and temperature conditions using a differential solubility technique*. *Chemical Geology*, 337-338, p. 67-74. (2013). DOI: 10.1016/j.chemgeo.2012.11.013.

<sup>4</sup> Stoll, H.; Langer, G.; Shimizu, N. y Kanamaru, K.; *B/Ca in coccoliths and relationship to calcification vesicle pH and dissolved inorganic carbon concentrations*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 80, p. 143-157. (2012). DOI: 10.1016/j.gca.2011.12.003.

<sup>5</sup> Rosner, M.; Romer, R. L. y Meixner, A.; *Air handling in clean laboratory environments: the reason for anomalously high boron background levels*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, p. 120-124. (2015). DOI 10.1007/s00216-005-3170-z.

<sup>6</sup> Leeman, W. P.; Vocke Jr, R. D.; Beary, E. S. y Paulsen, P. J.; *Precise boron isotopic analysis of aqueous samples: Ion exchange extraction and mass spectrometry*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55, p. 3901-3907. (1991). DOI: 10.1016/0016-7037(91)90085-j.

Por otro lado, si matriz de carbonato no se diluye lo suficiente, pueden aparecer problemas relativos a efectos de matriz (obturación de nebulizadores, depósitos de sales en los conos) y aumenta la posible interferencia espectral asociada al carbonato mencionada anteriormente.

Por otra parte, tal y como describen Al-ammar et al.<sup>7</sup>, las muestras que contienen boro, se preparan normalmente en soluciones de ácido nítrico, diluyéndolas hasta el 2% HNO<sub>3</sub> para el análisis por ICP-MS. En pH ácido, el B aparece como ácido bórico, el cual es volátil a temperatura ambiente. Esas gotas procedentes de la volatilización se depositan en la cámara de nebulización durante la medida, y causan un efecto de memoria cuya magnitud es mayor cuanto mayor sea la relación B/Ca en las muestras. Las estrategias para contrarrestar estos efectos se han abordado desde dos puntos de vista: utilizando material inerte tanto en la toma de muestra como en los sistemas de nebulización<sup>7</sup> y/o mediante protocolos de limpieza específicos entre muestra y muestra.<sup>8</sup>

Los problemas descritos, así como el normalmente bajo volumen de muestra disponible, han limitado la aplicabilidad de las medidas de B/Ca como herramienta en los estudios de paleoceanografía. A continuación, se describe una nueva metodología basada en la detección libre de interferencias gracias a la configuración del analizador QQQ empleado. Además, se desarrolló una preparación de muestra que minimiza los efectos de memoria y optimiza al máximo el volumen de muestra disponible.

Este trabajo ha sido el resultado de una colaboración con la Dra. Heather Stoll (actualmente perteneciente al Dpto. Ciencias de la Tierra, ETH, Zurich), dando lugar a un artículo publicado en la revista *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* en el año 2015 (D.4.1.1.). En el mismo año, Aggarwal y You<sup>9</sup>, publicaron unos comentarios sobre el artículo original. La respuesta a dichos comentarios fue también publicada en el año 2016 (D.4.1.2.).

---

<sup>7</sup> Al-Ammar, A.; Gupta, R. K. y Barnes, R. M.; *Elimination of boron memory effect in inductively coupled plasma-mass spectrometry by addition of ammonia*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 54, p. 1077-1084. (1999). DOI: 10.1016/S0584-8547(99)00045-2.

<sup>8</sup> Misra, S.; Greaves, M.; Owen, R.; Kerr, J.; Elmore, A. C. y Elderfield, H.; *Determination of B/Ca of natural carbonates by HR-ICP-MS*. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 15, p. 1617-1628. (2014). DOI: 10.1002/2013GC005049.

<sup>9</sup> Aggarwal, S. K. y You, C.-F.; *Comment on "Determination of low B/Ca ratios in carbonates using ICP-QQQ" by S. D. Fernandez et al.* *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 17, p. 1230-1231, DOI: 10.1002/2015GC006139.



**E. CONCLUSIONES/**

**CONCLUSIONS**



**E.1. CONCLUSIONES.**

Las principales conclusiones que pueden deducirse como resultado de lo expuesto a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se resumen en los siguientes puntos:

1. Se ha evaluado la metodología basada en el acoplamiento de LC capilar (capLC) al ICP-QQQ mediante una interfase de consumo total para la cuantificación absoluta de (fosfo)péptidos, a través de la determinación elemental de los heteroátomos presentes en ellos (P y S). La adición de patrones genéricos que contengan dichos heteroátomos a la muestra, ha permitido obtener factores de respuesta para cada elemento, que se aplican posteriormente para cuantificar el péptido analito. Esta metodología permitió obtener los LDs más bajos para el análisis de (fosfo)péptidos hasta esa fecha.
2. Se ha demostrado que el concepto desarrollado para la cuantificación absoluta de péptidos es aplicable, también al análisis de mezclas de proteínas intactas. La aplicación de dicha metodología basada el sistema capLC-ICP-QQQ requería encontrar condiciones que permitieran una recuperación cuantitativa de la columna cromatográfica empleada independientemente de la proteína, y la corrección de los cambios de sensibilidad que ocurren durante el gradiente. Una vez optimizadas tanto la cromatografía como la dilución isotópica post-columna, se ha validado la metodología con diferentes proteínas patrón obteniéndose LD en el rango de los fmol. Finalmente, se aplicó a la cuantificación absoluta genérica de las todas las proteínas (27) presentes en una muestra real de veneno de serpiente que, gracias al análisis paralelo por capLC-ESI-QTOF permitió convertir los fmol de S cuantificados en cada pico cromatográfico en fmol de la proteína correspondiente.
3. Se ha demostrado que la base metodológica desarrollada, el sistema híbrido RP-capHPLC-ICP-QQQ, es aplicable a la determinación del grado total de fosforilación en fosfoproteínas intactas mediante la medida experimental de las relaciones molares P/S previamente calibradas mediante mezclas de compuestos genéricos de P y S. Este concepto se ha demostrado tanto para patrones comerciales, como para muestras reales de proteínas previamente purificadas. Además, se ha evaluado la potencialidad de la metodología para

## E. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

la determinación del grado específico de fosforilación en los componentes trípticos de dichas proteínas, con resultados satisfactorios para la proteína modelo ensayada ( $\beta$ -caseína, en este caso), estando condicionada su aplicación a muestras reales por las limitaciones inherentes a los procesos de purificación y digestión enzimática.

4. Se ha desarrollado una metodología para la determinación de relaciones B/Ca en matrices cálcicas de origen biogénico, demostrándose que el excelente valor de sensibilidad en abundancia (SA) que aporta el analizador QQQ, permite la detección libre de interferencias de estos elementos incluso cuando el nivel de B en las muestras se encuentra a muy bajos niveles de concentración. ( $<1 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Además, se ha demostrado la compatibilidad de esta metodología con la medida simultánea de otros elementos como S o P presentes habitualmente en las muestras analizadas, que pueden aportar información muy útil desde el punto de vista geológico.

En resumen, se puede concluir que la configuración en MS/MS del ICP-QQQ ha demostrado ser, en las aplicaciones estudiadas, un sistema robusto que permite la cuantificación precisa y exacta de elementos (y relaciones elementales) tradicionalmente problemáticos debido a su naturaleza físico-química, así como a las numerosas interferencias espectrales asociadas a ellos. Creemos, por tanto, que esta configuración puede ser la base de numerosas estrategias para la cuantificación elemental, especialmente en el campo de la proteómica y la paleoceanografía.

***E.2. CONCLUSIONS.***

The conclusions arising from the results expounded through the present PhD Thesis are summarized by the following states:

1. A methodology based on capillary liquid chromatography (capLC) coupled to ICP-QQQ by means of a total consumption interfase was evaluated for the absolute quantification of (phospho)peptides through the elemental detection of the heteroatoms present (P and S). The addition to the sample of generic standards containing such heteroatoms, allowed to obtain element-specific response factors that could be subsequently employed to quantify each corresponding peptide. This methodology has provided the best DL ever obtained for (phospho)peptide analysis with ICP-MS.
2. It has been shown that absolute peptide quantification strategy also resulted to be valid for intact proteins mixtures. Such methodology based on the use of capLC-ICP-QQQ required of chromatographic solutions to obtain quantitative and protein-independent recoveries from the column employed, as well as the correction of sensitivity changes due to the chromatographic gradient. Once the chromatography and the post-column isotope dilution were properly chosen and optimized, the methodology was validated with different protein standards obtaining DL in the fmol range. Finally, this methodology was applied for the absolute and generic quantification of all the proteins (27) present in a venom snake real sample that in combination with a parallel analysis by capLC-ESI-QTOF, allowed the translation of the S fmol quantified in each chromatographic peak, into fmol of the corresponding protein.
3. It has been shown that the developed methodology based in the hybrid RP-capHPLC-ICP-QQQ system, is applicable to the total phosphorylation degree in intact phosphoproteins by means of the experimental determination of P/S molar ratios, with a previous calibration using mixtures of P and S generic standards. The concept has been proved both for commercial standards and protein real samples, previously purified. Furthermore, the potential of this methodology has been evaluated for the specific phosphorylation degree in tryptic compounds of proteins, with satisfactory results for the model protein essayed ( $\beta$ -

## E. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

casein), being its application conditioned in real samples by the inherent limitations to the purification and enzymatic digestion processes.

4. A methodology for B/Ca ratios determination in calcareous matrices of biogenic origin has been developed, being shown that the excellent abundance sensitivity value obtained with this QQQ analyzer, allows an interference-free detection of the elements involved, even when B concentration in the samples is at very low levels ( $<1 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Additionally, it has been shown that this methodology is compatible with the simultaneous measurement of other elements such as S or P, typically present in this type of samples, that might provide useful information from in a geological context.

Summarizing, the MS/MS configuration of the ICP-QQQ has been proved to be, in the studied applications, a robust system, which allows accurate and precise quantification of traditionally problematic elements (and elemental ratios) due to their physical and chemical nature, along with numerous spectral interferences associated with them. Therefore, we believe that this configuration can be very valuable in the development of numerous strategies for elemental quantification, especially in the fields of proteomics and paleoceanography.

**G. RELACIÓN DE**  
**PUBLICACIONES**



Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1. Diez Fernández, S.; Sugishama, N.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* 84, (14), **2012**. Índice de impacto: 5.695. Q1: 3/75. **Capítulo D.1. Resultados y discusión.**
2. Calderón-Celis, F.; Silvia Diez-Fernández, S.; Costa-Fernández, J. M.; Ruiz Encinar, J.; Calvete, J. J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, 88, (19), **2016**. Índice de impacto: 5.886. Q1: 4/75. **Capítulo D.2. Resultados y discusión.**
3. Diez Fernández, S.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A.; Isensee, K.; Stoll, M. H. *G<sup>3</sup>*, 16, (6), **2015**. Índice de impacto: 2.993. Q1: 17/81. **Capítulo D.3. Resultados y discusión**

### *Publicaciones relacionadas (enviadas)*

4. Diez-Fernández, S.; Freije-Carrelo, L.; Calderón-Celis, F.; Sanz-Medel, A.; Ruiz Encinar, J. **Enviado a J. Chrom. A, 2017.**

### *Otras publicaciones*

5. Reply to comments: Diez Fernández, S.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A.; Isensee, K.; Stoll, M. H. *G<sup>3</sup>*, 17, (3), **2016. Derivada de la publicación número 3.**
6. Diez Fernández, S.; Sugishama, N.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Publication note: 5991-1461EN. Agilent Technologies. Publication date (web): 01 June, **2016. Derivada de la publicación número 1.**
7. Gonzalo Huelga-Suarez, G.; Diez-Fernández, S.; Moldovan, M.; Fernández Pardiñas, A.; López, B.; García Alonso, J. I. *Anthropol. Sci. of Nipon*, 124, (3), **2016.**