



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

***Determinación de glicohemoglobina
comobiomarcador de Diabetes Mellitus
mediante cromatografía ortogonal
y detección por ICP-MS***

María del Campo González
Julio 2013, Oviedo



Departamento de Química Física y Analítica

MARIA MONTES BAYÓN, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “*Determinación de glicohemoglobina como biomarcador de diabetes mellitus mediante cromatografía ortogonal y detección por ICP-MS*” ha sido realizado por el Licenciado **Maria del Campo González** en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Maria Montes Bayón".

Fdo.: Maria Montes Bayón

Contenido

A. INTRODUCCIÓN	1
A.1 El hierro	2
A.1.1 Propiedades	2
A.1.2 Relevancia biológica del hierro	3
A.2 Ferroproteínas: la hemoglobina	3
A.2.1 La Glicohemoglobina.....	5
A.2.2 La Glicohemoglobina como biomarcador de la Diabetes Mellitus	6
A.3 La Espectrometría de Masas en la determinación de glicohemoglobina	8
A.3.1 Electrospray-Masas	8
A.3.2 Espectrometría de Masas con Fuente de Acoplamiento Inductivo	9
B. OBJETIVOS	12
C. EXPERIMENTAL	14
C.1 Instrumentación.....	15
C.1.1 Separaciones cromatográficas	15
C.1.2. Equipos de ICP-MS.....	15
C.1.3 Acoplamiento HPLC-ICP-MS	16
C.1.4 MALDI-MS con tiempo de vuelo	17
C. 2 Materiales y reactivos	18
C.3 Otra instrumentación.....	18
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
D.1 Separación de las variantes de la Hemoglobina mediante HPLC multidimensional.	21
D.1.1 Cromatografía de boroafinidad	21
D.1.2 Cromatografía de intercambio catiónico.....	23
D.1.3 Cromatografía multidimensional	25
D. 2 Caracterización de las proteínas mediante MALDI.....	28
D. 3 Estudio de la preconcentración y desalinización de las fracciones.....	31

D. 4	Análisis por dilución isotópica en especiación elemental. Estudios cuantitativos de la glicación de la hemoglobina.....	34
D.4.1	Procedimiento analítico para la determinación del contenido de hierro en el trazador mediante Dilución Isotópica Inversa	35
D.4.2	Procedimiento analítico para la determinación de hierro mediante Dilución Isotópica post-columna usando HPLC-ICP-MS.....	36
D. 5	Normas de seguridad en la manipulación del material de laboratorio. Tratamiento de residuos.....	39
E.	CONCLUSIONES.....	40
F.	BIBLIOGRAFÍA	42

A. INTRODUCCIÓN

A.1 El hierro

A.1.1 Propiedades

Es un elemento metálico de número atómico 26, peso atómico 55.845 y símbolo químico Fe, que deriva del latín *ferrum*. En la corteza es el cuarto elemento más abundante (5,63% en peso) y en cuanto a los metales es el segundo más abundante.

Tabla 1. Propiedades del hierro

Propiedades atómicas	
Configuración electrónica	[Ar] 3d ⁶ 4s ²
Estados de oxidación	2, 3, 4, 6
Estructura cristalina	Cúbica centrada en el cuerpo
Radio atómico	1,72 Å
Volumen atómico	7,09 cm ³ /mol
Radio covalente	1,17 Å
Radio iónico	0,645 Å
Propiedades físicas	
Estado de la materia	Sólido (ferromagnético)
Punto de fusión	1808 K
Punto de ebullición	3023 K
Densidad (a 20°C)	7,874 g·cm ⁻³
Entalpía de vaporización	349,6 Kj/mol
Entalpía de fusión	13,8 Kj/mol
Conductividad eléctrica	0,0993·10 ⁶ (cm·Ω) ⁻¹
Conductividad térmica	0,802 W(cm·K) ⁻¹
Calor específico	440 J·(K·Kg) ⁻¹
Resistencia máxima	540 MPa
Módulo elástico	200 GPa
Presión de vapor (a 1808 K)	7,5 Pa
Propiedades químicas	
Electronegatividad (Paulling)	1,83
1ª Energía de ionización	7,87 Ev
2ª Energía de ionización	16,18 eV
3ª Energía de ionización	30,65 eV

Tabla 2. Isótopos estables del hierro¹

Isótopo	Spin	Abundancia (%)	Masa atómica (u)
⁵⁴ Fe	0	5,845	53,9396
⁵⁶ Fe	0	91,754	55,9349
⁵⁷ Fe	½	2,119	56,9354
⁵⁸ Fe	0	0,282	57,9333

A.1.2 Relevancia biológica del hierro

El hierro, es un nutriente esencial y al mismo tiempo un potente tóxico para las células, por ello, requiere de un sofisticado complejo de regulación.²

Es un metal clave de muchas enzimas celulares,^{6,7,3} las cuales participan en numerosos procesos celulares tales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, transporte de electrones, respiración celular, diferenciación y proliferación celular, y en la regulación de la expresión de los genes^{4,5,6,7,8}. Su participación en todos estos procesos radica en su capacidad de aceptar o donar electrones al existir tanto en el estado ferroso (Fe^{+2}) como férrico (Fe^{+3}).⁸

Sin embargo, el Fe también posee efectos tóxicos. Su efecto perjudicial está relacionado con su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) por la vía de las reacciones de Fenton,⁹ tales como radicales hidroxilo (OH^-) y superóxido (O_2^-), altamente tóxicas para el organismo. Además, el hierro libre puede dañar la integridad de la membrana y causar la muerte celular.

A.2 Ferropoteínas: la hemoglobina

Con el fin de disminuir la toxicidad del ion metálico libre, en condiciones fisiológicas el Fe se suele presentar en su mayor parte asociado a proteínas, denominadas ferropoteínas. Las ferropoteínas de los mamíferos se pueden agrupar en tres grandes clases.¹⁰

- El primer grupo está constituido por las hemoproteínas. Destacan la hemoglobina y la mioglobina cuyas funciones son el transporte y almacenamiento del oxígeno. Los citocromos también poseen grupo hemo y que participan en la transferencia de electrones al oxígeno durante la respiración celular.
- El segundo grupo lo componen las proteínas encargadas del almacenamiento (ferritina, hemosiderina) y transporte (transferrina, lactoferrina) del hierro. Además pueden complejar el Fe^{3+} libre, evitando así su posible daño oxidativo a las células.
- El tercer grupo se compone de las proteínas ferroflavínicas o proteínas de hierro/azufre (Fe/S). Entre ellas se encuentran la citocromo c reductasa, y la NADH deshidrogenasa entre otras.

El primer grupo está constituido por las hemoproteínas o protoporfirinas de hierro, donde éste se encuentra unido a un anillo de porfirina.

El grupo hemo es un quelato complejo de la protoporfirina IX, compuesto tetrapirrónico donde el Fe^{2+} se encuentra coordinado a los cuatro nitrógenos pirrónicos ubicados en el mismo plano (Figura 1). Para completar la esfera de coordinación octaédrica del hierro, los dos enlaces restantes, quinto y sexto, se encuentran perpendiculares al plano de la porfirina. La quinta posición está ocupada por un grupo imidazol fuertemente unido a la proteína y la sexta posición (trans al grupo imidazol) está disponible para la unión de una molécula de oxígeno (en la oxihemoglobina) o se encuentra vacante (en la desoxihemoglobina).

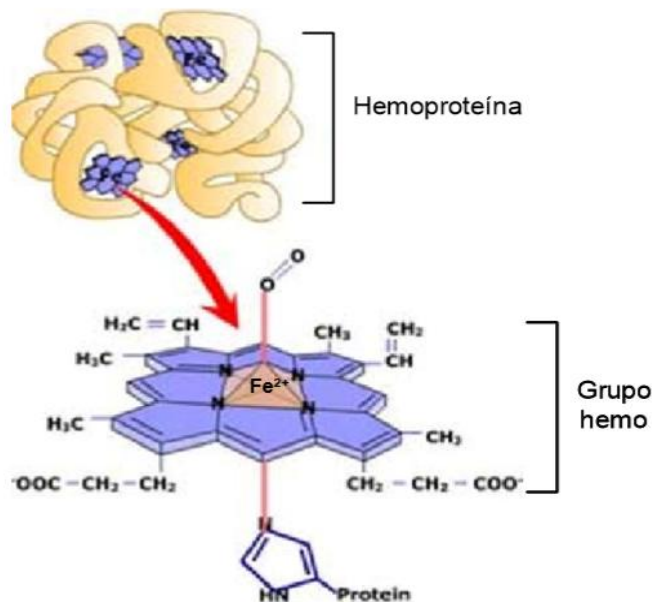


Figura 1. Representación del grupo hemo coordinado a la proteína y a la molécula de oxígeno

En el cuerpo humano la mayor parte del hierro se encuentra como Fe^{2+} formando parte del grupo hemo en la hemoglobina.¹¹ La hemoglobina (Hb) es la hemoproteína en los glóbulos rojos de mamíferos y otros animales responsable del transporte y almacenamiento de oxígeno.

En humanos, el tipo de Hb más común es un tetrámero denominado HbA o HbA₀ que contiene dos subunidades α y β unidas de forma no covalente, cada una con un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno.

Las cuatro cadenas polipeptídicas se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. El peso molecular del tetrámero es aproximadamente de 68 kDa y de 17 kDa el de cada una de las subunidades. HbA ($\alpha_2\beta_2$) representa aproximadamente el 97% de la Hb total, siendo por tanto la especie más abundante. Sin embargo, existen otras formas minoritarias de Hb en adultos como la HbA₂ (2.5%) y la Hb fetal (HbF; <1%), donde las dos globinas β son sustituidas por dos globinas δ y dos γ , respectivamente.

A.2.1 La Glicohemoglobina

La glicación no enzimática es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes, que dan lugar a alteraciones en la estructura y función de muchas proteínas, como es el caso de la Hb.

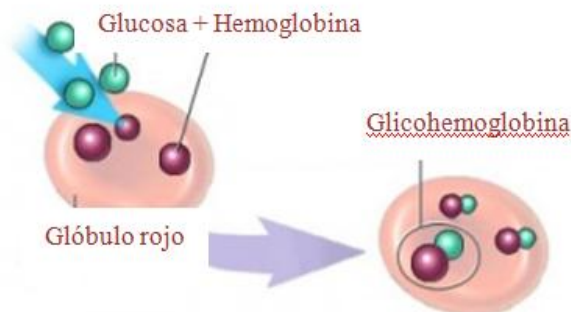


Figura 2. Esquemización de la formación de la glicohemoglobina

La glicación implica una reacción en la cual los azúcares (generalmente glucosa) reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas (y en menor grado con lípidos y ADN) mediante dos reacciones, como queda reflejado en la Figura 3 para el caso concreto de la Hb. En la primera reacción, un grupo amino libre (NH_2 terminal de la valina o grupos ϵ -amino de la lisina) de la Hb reacciona de forma no-enzimática y reversiblemente con el grupo aldehído de un azúcar reductor acíclico (glucosa), vía unión nucleófila para formar una base de Schiff o aldimina. Esta unión, bastante lábil y fácilmente disociable, sufre posteriormente una reacción de reordenamiento de Amadori que origina una

cetoamina (unión covalente y estable prácticamente irreversible) denominada hemoglobina glicada (GHb).¹² En este sentido, la GHb es el término utilizado para designar la glicación no-enzimática de la Hb por la glucosa.

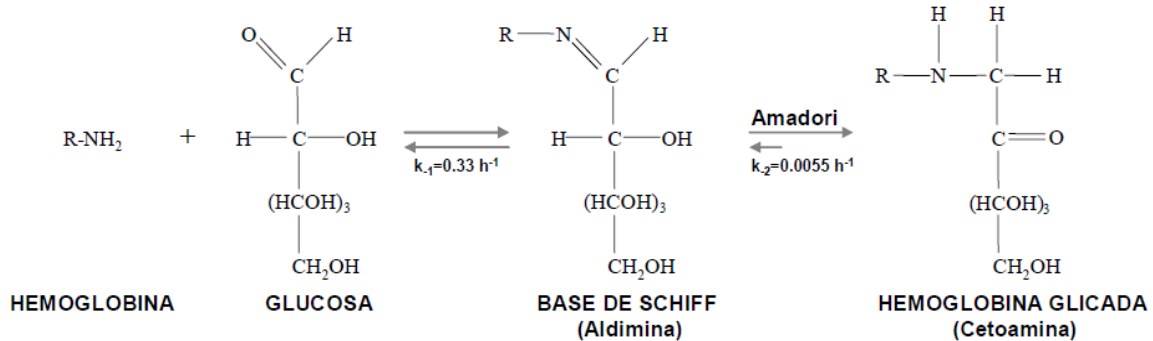


Figura 3. Formación de la hemoglobina glicada

Los posibles sitios de glicación de la Hb son los residuos N-terminal de la valina de las cadenas β , α , γ , y δ y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las cadenas β y α . Las valinas terminales y sobre todo las β valinas son más reactivas que los grupos ϵ -amino, debido a su menor pK que hace que sean unos nucleófilos más eficaces para la formación de la aldimina inicial. Por ello, el sitio preferente de glicación es la valina N-terminal de la cadena β , que representa aproximadamente el 60% de la glucosa unida a la proteína.¹³ Las hemoglobinas glicadas engloban a la HbA₁ (formada por HbA_{1a}, HbA_{1b} y HbA_{1c}, donde HbA_{1c} representa aproximadamente el 80%) y a otros aductos Hb-glucosa. De todas ellas, HbA_{1c} representa la forma más abundante de GHb y ha sido definida por la IFCC (*Internacional Federation of Clinical Chemistry*) como la HbA irreversiblemente glicada en una o ambas valinas N-terminales de las cadenas β .¹⁴

A.2.2 La Glicohemoglobina como biomarcador de la Diabetes Mellitus

De forma general, la Diabetes Mellitus (DM) es el síndrome metabólico más común en todo el mundo. En España se sitúa entre el 2 y el 6% de la población.¹⁵

Se denomina *Diabetes Mellitus* (DM) a un grupo de trastornos metabólicos de carácter crónico caracterizados por un aumento de los niveles de glucosa (hiperglucemia) en sangre, como resultado de una disfunción en la secreción de la

insulina (DM Tipo I), o por una progresiva resistencia a la acción de la misma, con o sin déficit asociado en su secreción¹⁶ (DM Tipo II, ~90% de los pacientes diabéticos).

La DM es una enfermedad crónica que carece de cura, por lo que necesita un control riguroso para prevenir complicaciones. Debido a que los glóbulos rojos son permeables a la glucosa, la cantidad de GHb depende de la concentración media de la glucosa en sangre durante un periodo de 120 días, que es la vida media de los eritrocitos. Por tanto, la medida de la GHb, bien como HbA_{1c} o como GHb total, es utilizada hoy en día en los pacientes diabéticos para la monitorización de la glucemia a largo tiempo y en la evaluación de los posibles riesgos derivados de dicha enfermedad. En un individuo sano, la proporción de GHb varía entre el 4-6% de la Hb total (10-15 g·dL⁻¹), mientras que este valor se ve incrementado entre un 10-15% en diabéticos que no siguen tratamiento.

La *American Diabetes Association* (ADA) recomienda la medida de la GHb tanto a pacientes con Diabetes tipo 1 (patología metabólica en la que el páncreas no produce insulina o produce muy poca) como tipo 2 (el páncreas produce insulina, pero sin embargo el organismo no es capaz de usarla adecuadamente) siendo el objetivo principal terapéutico un valor de GHb menor del 7%. Asimismo, recomiendan realizarse este análisis dos veces al año para pacientes que cumplan los objetivos terapéuticos y cuatro veces para aquellos pacientes que sufren complicaciones.¹⁷

La determinación de la GHb (bien sea como GHb o HbA_{1c}) se realiza de manera rutinaria en los hospitales mediante analizadores automáticos basados en métodos de separación por intercambio iónico, afinidad, electroforesis o por métodos inmunoquímicos.¹⁸ Se ha establecido como método de “referencia” el HPLC de intercambio catiónico utilizando diferentes resinas (Bio-Rex 70 y Mono S). Estos métodos se caracterizan por su precisión y por su estabilidad a largo plazo, pero no son completamente específicos de la HbA_{1c}. La falta de especificidad es debida a que en una cromatografía de intercambio catiónico, así como en cromatografía de afinidad, pueden coeluir con HbA_{1c} otras especies glicadas de la Hb. Por tanto, los resultados proporcionados por ambos métodos siempre entendidos como una sola dimensión, deben referirse a GHb y no HbA_{1c}. Además, destacar que estos métodos proporcionan valores relativos, siendo necesaria la cuantificación de la Hb total mediante otro ensayo independiente para proporcionar concentraciones absolutas de GHb.²⁷

A.3 La Espectrometría de Masas en la determinación de glicohemoglobina

A.3.1 Electrospray-Masas

La ionización por electrospray es una técnica de ionización a presión atmosférica. La disolución de la muestra en un disolvente adecuado es continuamente introducida en el espectrómetro de masas mediante una bomba de cromatografía líquida (LC) o una jeringa a través de un tubo capilar de acero inoxidable (~ 100 μm i.d.). La diferencia de potencial entre la punta del capilar, sometido a un alto potencial (de 3 a 6 kV), y la entrada del espectrómetro de masas (contra-electrodo) produce un fino aerosol a presión atmosférica compuesto de pequeñas gotas del analito altamente cargadas. Así, dependiendo del potencial aplicado al capilar metálico, se puede trabajar en modo positivo o negativo. Normalmente se utiliza un flujo de gas (típicamente N_2) para ayudar a la nebulización del líquido y a la evaporación del disolvente en las gotas. Durante el transporte desde la región a presión atmosférica al alto vacío del analizador de masas, las gotas decrecen en tamaño bien a través de procesos de evaporación del disolvente o por desorción directa de los iones desde la gota debido a la alta tensión electrostática en el interior de la misma (explosión de Coulomb). Este proceso se repite hasta la generación de un aerosol de gotas de diámetros en el rango de las micras exento de disolvente. A continuación, estos iones completamente desolvatados con una o múltiples cargas son acelerados por campos eléctricos hacia el espectrómetro de masas, mientras que las moléculas de disolvente no cargadas son eliminadas.

El método oficial aprobado por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) para la determinación de HbA_{1c} emplea el Electrospray Masas acoplado a la cromatografía de líquidos. Para ello, se lleva a cabo la digestión enzimática de la Hb intacta con endoproteinasaGlu-C, dando lugar a los hexapéptidos β -N-terminales de HbA_{1c} (forma glicada) y HbA (forma no glicada). A continuación, los péptidos son separados mediante cromatografía en fase inversa y cuantificados por ESI-MS o CE-UV. Ambos métodos de detección están exentos de la influencia de otras especies interferentes (e.j. especies carbamiladas, acetiladas, variantes de la Hb) y proporcionan resultados idénticos. La relación de intensidades de los hexapéptidosglicados y no glicados (comparando una con otra) es utilizada para calcular la concentración relativa de HbA_{1c} .

La calibración en ambos métodos se lleva a cabo utilizando estándares individuales altamente purificados de HbA_{1c} y HbA. Pero, desafortunadamente, el estándar individual purificado de HbA_{1c} contiene aproximadamente un 5% de deHb no glicada en la valina terminal, especie que co-eluye con HbA_{1c} en una columna de intercambio catiónico (Mono S).

Con el fin de mejorar la reproducibilidad y fiabilidad de la medida de HbA_{1c}, el método de referencia LC-ESI-MS¹⁹ ha sido ligeramente modificado mediante la utilización de péptidos sintetizados marcados en deuterio como estándares internos.²⁰ Otra posibilidad introducida es la combinación de enzimas (endoproteinasas Glu-C y Asp-N) para llevar a cabo la digestión de la Hb humana.²¹ Esta propuesta ha resultado ser un eficiente método para conocer todos los posibles sitios de glicación de la Hb humana utilizando LC-ESI-MS. Sin embargo, aunque todos los métodos expuestos garantizan la especificidad de HbA_{1c}, están limitados por tres grandes desventajas: (a) posibles variaciones en la ruptura enzimática, (b) diferentes recuperaciones de las especies glicadas y no glicadas en el sistema cromatográfico y (c) diferente eficacia de ionización de los hexapéptidos en el ESI-MS.²²

A.3.2 Espectrometría de Masas con Fuente de Acoplamiento Inductivo

La determinación de GHb se ha abordado recientemente²⁷ a través de espectrometría de masas elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) empleando la monitorización del Fe presente en la misma. Brevemente, el ICP-MS es una de las técnicas analíticas más versátiles y poderosas para la determinación de hetero-elementos traza y ultratrazas en muestras biológicas. El ICP-MS proporciona información sobre la composición elemental de la muestra, sin embargo no proporciona información estructural.

En el ICP-MS, los iones generados a partir de los elementos de la muestra analizar, son dirigidos a través de la interfase hacia el analizador de masas, donde son separados según su relación masa/carga. El plasma consiste básicamente en un gas altamente ionizado (>1%) y conductor de la electricidad. Un plasma ICP a presión atmosférica se forma cuando un gas inerte, generalmente Ar, es introducido en una antorcha de cuarzo que consiste en tres tubos concéntricos de diámetro variable, rodeada de una bobina de inducción a la que se aplica una determinada potencia de radiofrecuencias.

La muestra a analizar, formando un fino aerosol líquido, se introduce a través del canal central de la antorcha en dicho plasma de Ar. Dicho aerosol se forma por aspiración de la muestra líquida (mediante el empleo de una bomba peristáltica incorporada al equipo) hacia el sistema de nebulización, constituido por un nebulizador y una cámara de nebulización refrigerada. En el interior del canal del plasma ICP, la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada (Figura 4). Los analitos se ionizarán en mayor o menor grado en función de la densidad electrónica del plasma, la temperatura y sus diferentes potenciales de ionización.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los elementos de la tabla periódica tienen un primer potencial de ionización menor de 9 eV, su grado de ionización en el plasma superará el 80%, mientras que otros elementos con potenciales de ionización más altos como N, O, F, Cl, Br, I, P, As, Hg y Au se ionizarán en mucho menor grado.

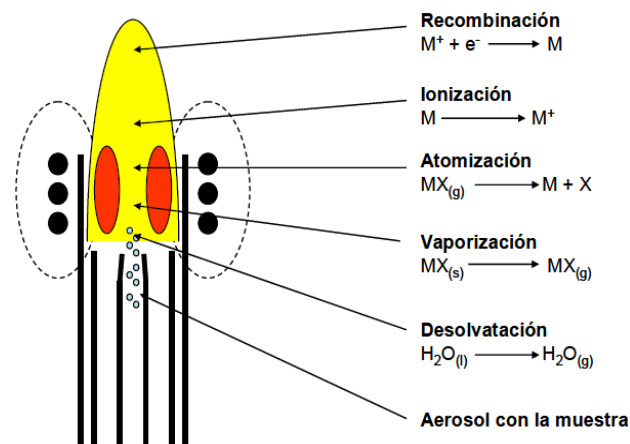


Figura 4. Procesos que ocurren en el plasma

Las principales características analíticas de esta técnica son:²³

- Extremada sensibilidad (límites de detección: $0.001 - 0.1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Análisis multi-elemental y multi-isotópico.
- Análisis isotópico directo (medida de relaciones isotópicas y dilución isotópica).
- Interpretación sencilla de los espectros de masas. El ICP-MS produce predominantemente iones monoatómicos y monopositivos.
- Análisis cuantitativo y semicuantitativo.
- Sistema de introducción de muestra sencillo y fácil de acoplar a otras técnicas como HPLC, vaporización electrotérmica (ETV), ablación láser (LA), electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel (GE) o cromatografía de gases (CG).

-Buena precisión en la determinación de elementos traza mediante calibración externa con patrones internos (2-5%) o por dilución isotópica (1-3%).

Sin embargo, a pesar de las mencionadas características favorables, la técnica de ICP-MS presenta también algunas desventajas entre las que destacan las interferencias espectrales. Las interferencias espectrales están originadas por iones atómicos (interferencias isobáricas) o iones moleculares (interferencias poliatómicas) que tienen el mismo valor nominal de masa que el analito de modo que a la señal del analito se le suma la señal del ion interferente.

En el caso del hierro, los cuatro isótopos presentan interferencias poliatómicas de argón, mientras que sólo los isótopos ^{54}Fe y ^{58}Fe presentan interferencias isobáricas. En concreto para el isótopo ^{56}Fe es necesario un poder de resolución ($R=m/\Delta m$) de 2500 para discriminar entre analito e interferente. Esta resolución no es alcanzada con equipos convencionales de ICP-MS. El empleo de equipos con celdas de colisión/reacción (ICP-DCR-MS) facilitan la eliminación de dichas interferencias. En este tipo de instrumentos, la celda está situada entre las lentes y el analizador de masas y se presuriza con un gas adecuado para producir colisiones y reacciones con los iones extraídos del plasma (y, de esta manera eliminar o reducir los iones interferentes). Por ejemplo, la interferencia del $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ (m/z 55.957) sobre el isótopo más abundante de hierro, ^{56}Fe (m/z 55.935) se puede reducir mediante el empleo de H_2 como gas de reacción.²⁴

Este tipo de instrumentación se ha utilizado para la determinación de GHb después de la separación cromatográfica de la forma no glicada empleando cambio catiónico como mecanismo de separación.²⁷ Posteriormente, con el objetivo de mejorar la selectividad del proceso para aislar la HbA_{1c} específicamente se ha desarrollado una metodología multidimensional basada en los mecanismos de afinidad y cambio catiónico acoplada al ICP-MS.²⁸ En este último trabajo hemos basado las investigaciones que se han desarrollado en el presente proyecto con el objetivo de establecer una metodología cuantitativa basada en ICP-MS para la determinación de HbA_{1c} en materiales de referencia para su futura comercialización.

B. OBJETIVOS

La glicación de proteínas es una modificación post-traducciona que afecta a un gran número de proteínas extracelulares y de la superficie celular. En particular, algunas de estas proteínas contienen hierro como ion metálico bien en su propia estructura o enlazado a sus sitios activos. Estas ferropoteínas están involucradas en numerosos procesos biológicos. Teniendo en cuenta la importancia de la hemoglobina glicada como biomarcador de la Diabetes Mellitus, el IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) va a comercializar en breve un material de referencia certificado en el contenido de HbA_{1c}. Con tal objeto, además de las medidas de ESI-MS realizadas mediante el método oficial por otros laboratorios, dicha institución ha solicitado incluir los datos empleando las metodologías basadas en ICP-MS y que se comenzaron a desarrollar anteriormente en el Grupo de Espectrometría Analítica de la Universidad de Oviedo.

Por tanto, el objetivo principal de este Proyecto es *establecer una metodología cuantitativa para llevar a cabo la determinación específica de HbA_{1c} en materiales de referencia* donde se encuentra también presente la forma no glicada. Este objetivo principal se aborda a través de los siguientes objetivos parciales:

- ❖ Familiarización con la estrategia HPLC multidimensional previamente desarrollada de afinidad e intercambio catiónico para la separación específica de la HbA_{1c} empleando la detección mediante UV-VIS a 280 y 415 nm.
- ❖ Caracterización estructural de las distintas especies encontradas mediante el sistema multidimensional previamente mencionado mediante (MALDI).
- ❖ Evaluación de la cuantitatividad del proceso de preconcentración necesario entre las dos cromatografías.
- ❖ Cuantificación de HbA_{1c} mediante dilución isotópica con ICP-MS.

C. EXPERIMENTAL

C.1 Instrumentación

C.1.1 Separaciones cromatográficas

En las separaciones por HPLC la instrumentación empleada fue:

- ✓ Equipo de HPLC Agilent modelo 1100 (Agilent Technologies) que consta de una bomba cuaternaria, un desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostatación de las columnas y un detector de diodearray (DAD). En este caso se emplearon las longitudes de onda de 280 nm y 415 nm (específica del grupo hemo) para monitorizar las especies.
- ✓ Equipo de HPLC compuesto por una bomba de alta presión de doble pistón Shimadzu LC-20 AD y una válvula de inyección Reodyne modelo 7125 con bucles de inyección de peek de 100 y 50µL de capacidad.

Las columnas cromatográficas empleadas fueron:

- ✓ Intercambio catiónico, Mono S 4.6/100 PE de 10 × 100 mm d.i. y 10 µm de tamaño de partícula (Pharmacia, AmershamBioscience, España).
- ✓ Afinidad, TSK-GEL®Boronate-5PW de 7.5 cm x 7.5 mm d.i. y 10 µm de tamaño de partícula (TosohBioscience GMBH, Stuttgart, Alemania).

C.1.2. Equipos de ICP-MS

Con el fin de evitar las interferencias poliatómicas del argón que afectan al hierro el ICP-MS empleado fue el modelo 75000c con Sistema de Octapolo de Reacción (ORS) de Agilent Technologies (Tokio, Japón).

Para poder eliminar la interferencia $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ que afecta al ^{56}Fe se empleó la celda de reacción con un flujo de 4,3mL·min⁻¹ en hidrógeno. El resto de las condiciones de operación para el uso del ICP-ORS-MS se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación de ICP-ORS-MS

Parámetros del plasma	
Potencia de radiofrecuencia	1500W
Flujo de gas refrigerante	15 mL·min ⁻¹
Flujo de gas portador	1,12 mL·min ⁻¹
Flujo de gas de reacción	4,3 mL·min ⁻¹
Sampler y skimmer	Ni, 1 y 0,4 mm d.i.
Parámetros de la celda de reacción	
Flujo de hidrógeno	4,3 mL·min ⁻¹
QP Focus	-10 V
QP Bias	-16V
OctapoloBias	-18 V
CellExit	-76 V
Parámetros de adquisición de datos (determinación total de hierro)	
Isótopos monitorizados	⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁵⁸ Fe
Puntos por pico	3
Tiempo de integración (por punto)	4 segundos
Réplicas	5
Parámetros de adquisición de datos (análisis cromatográfico)	
Isótopos monitorizados	⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁵⁸ Fe
Puntos por pico	1
Tiempo de integración (por punto)	0,1 segundos

C.1.3 Acoplamiento HPLC-ICP-MS

Al conectar el sistema de separación directamente con el ICP-MS como detector, se obtienen resultados altamente reproducibles y en tiempos mucho más cortos en comparación con los métodos tradicionales discontinuos. Por otro lado, esta técnica híbrida permite el empleo directo y rápido de métodos de Dilución Isotópica en línea.²⁵

El acoplamiento HPLC-ICP-MS es muy sencillo ya que los flujos utilizados en la segunda dimensión cromatográfica (cambio catiónico) que es aproximadamente de 1 mL·min⁻¹ permite el empleo de nebulizadores convencionales. Desde el punto de vista técnico, el acoplamiento consiste en unir la salida de la columna analítica al nebulizador a través de un tubo de un plástico inerte y de reducida longitud para evitar volúmenes muertos y ensanchamiento de los picos cromatográficos.

Las limitaciones de este acoplamiento vienen dadas por las características de las fases móviles. Se necesita emplear un tampón volátil para evitar depresión o incremento de la señal a la vez que la obstrucción del nebulizador y/o cono de muestreo.²⁶

C.1.4 MALDI-MS con tiempo de vuelo

El equipo de MALDI-MS empleado fue el modelo Voyager-DE™ STR Biospectrometry™ Workstation de Applied Biosystems (Langen, Alemania) equipado con un analizador de tiempo de vuelo y un láser pulsado de nitrógeno (337 nm).

Las condiciones de trabajo se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de operación del MALDI-TOF-MS

Tipo de barrido	Positivo
Modo	Lineal
Intensidad del láser	3000 V
Matriz	Acidosinapínico
Voltajes	
<i>Accelerating</i>	25000 V
<i>Grid</i>	62%
<i>Delay time</i>	350 nanosegundos
Spectrum acquisition	
<i>Shots/spectrum</i>	150
<i>Massrange</i>	5000-20000 Da
<i>LowMassGate</i>	500 Da

C. 2 Materiales y reactivos

- ✓ Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para el lavado y preparación de disoluciones se empleó agua ultrapura (18 MΩ cm) obtenida en un sistema Milli-Q System (Millipore Co, Bedford, MA, USA).
- ✓ El patrón de hemoglobina liofilizada empleado es de Sigma.
- ✓ Para las separaciones cromatográficas se empleó Tris(hidroximetil) aminometano (Tris), sorbitol, acetato de amonio, ácido acético (HAc), amoníaco (NH₃) Suprapur® de Merck, y cloruro de magnesio anhídrico, ácido malónico y azida de sodio de Sigma.
- ✓ Los patrones y disoluciones de limpieza se filtraron mediante filtros Millex-GV de 0.22 μm (Millipore) de un solo uso y jeringas de 1 mL BD Plastipak™ (Becton Dickinson and Company, España).
- ✓ Para la desalinización y preconcentración de las fracciones recolectadas se utilizaron membranas de ultrafiltración Amicon de 10,000 Da de corte de peso molecular.
- ✓ Para la optimización diaria del ICP-ORS-MS se utilizó una disolución de 10 ng g⁻¹ de Li, Co, Y y Tl en HNO₃ 1% (p/p) de Merck.
- ✓ En el análisis por MALDI se utilizó ácido sinapínico, en acetonitrilo (Merck) y ácido trifluoroacético (grado espectrofotométrico, ≥99%, Sigma). La limpieza de la placa se realizó mediante disoluciones acuosas de acetonitrilo (Merck).
- ✓ Los gases Ar, He y H₂ (99.999% de pureza) fueron suministrados por la casa comercial Air Liquide (Madrid, España).
- ✓ Para realizar las limpiezas de las columnas se utilizaron disoluciones de cloruro de sodio, azida de sodio e hidróxido sódico de Sigma, y etanol, ácido acético y ácido clorhídrico de Merck.

C.3 Otra instrumentación

- ✓ Las pesadas se realizaron en una balanza Precisa XB 220^a, con precisión hasta ±0,0001g.
- ✓ La preconcentración mediante Speed Back se llevó a cabo utilizando el modelo concentrator 5301 de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).

- ✓ La centrifugación de las disoluciones se llevó a cabo utilizando una centrífuga BiofugeStratos modelo Heraeus (Hanau, Alemania). Y una Mini Spin plus de eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).
- ✓ Para el ajuste del pH de las fases móviles se empleó un pH-metro modelomicropH2000 de Crisol Instruments S.A. (Barcelona, España).
- ✓ Se utilizó un agitador magnético o VortexVelP (Scientifica, España) para la completa disolución de las soluciones.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

D.1 Separación de las variantes de la Hemoglobina mediante HPLC multidimensional.

Basándonos en los estudios anteriores, el presente trabajo emplea para la separación de las especies glicadas (GHb) y no glicadas (HbA) de la Hbuna primera dimensión cromatográfica de afinidad (separación basada en las diferencias estructurales) seguida de una cromatografía de cambio catiónico (basada en las diferencias de carga).^{27,28} Aunque el orden inverso ha proporcionado también resultados satisfactorios, la fase móvil empleada en cambio catiónico resulta más compatible con el ICP-MS como detector. El primer paso fue la familiarización con las dos metodologías analíticas de separación de forma independiente como se muestra a continuación.

D.1.1 Cromatografía de boroafinidad

La cromatografía de afinidad está basada en las características estructurales de los grupos glicados de la Hb. El ácido m-aminofenilborónico o boronato, utilizado como fase estacionaria, interactúa específicamente con los grupos 1,2-cis diol de la glucosa enlazada a la Hb (Hbglicada), unión representada en la Figura 5. En solución alcalina ($\text{pH} \geq 8.0$) se facilita la transición del ligando boronato desde su estructura trigonal coplanar a su configuración tetraédrica, la cual da lugar a un complejo covalente reversible con los grupos hidroxilo vecinales. Debido a que la longitud del enlace ácido borónico-oxígeno es corta, la interacción con los grupos cis-diol coplanares en la configuración, *cis* está altamente favorecida. También contribuyen a esta interacción fuerzas iónicas e hidrofóbicas.

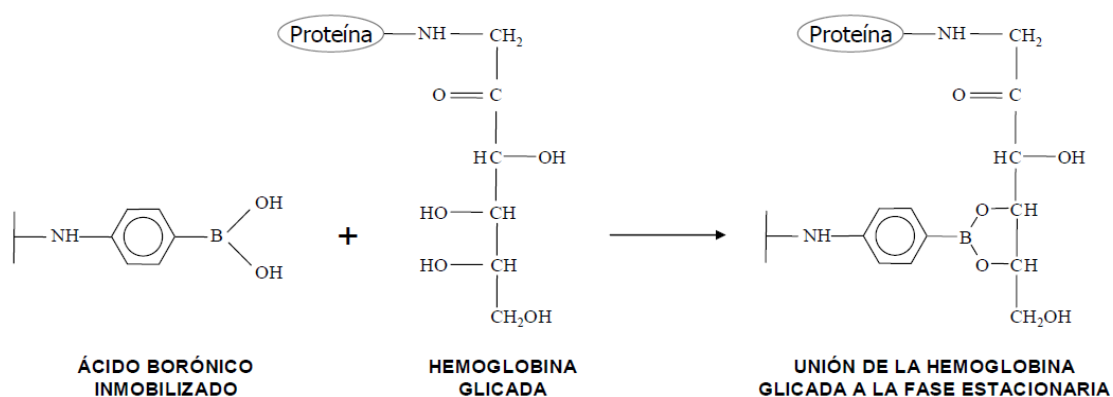


Figura 5. Unión de la hemoglobina glicada al ácido m-aminofenilborónico inmovilizado

Tras la elución de la fracción no glicada, se hace pasar a través de la columna un agente que contiene grupos diol (e.j. sorbitol), desplazando la Hbglicada de la columna. En este caso, se utilizó como fase móvil A o de carga (*load buffer*) una disolución que contiene 250 mM acetato de amonio, 50 mM MgCl₂ y 0.2 g L⁻¹ NaN₃ a pH 8.5 (pH es ajustado mediante 1 M NaOH). La adición de sales (e.j. NaCl o MgCl₂) ayuda a la supresión de interacciones inespecíficas, incrementando la interacción de la Hb no glicada con el boronato.²⁹ A continuación la fracción de Hbglicada es eluida mediante la fase B o de elución que consta de 200 mM sorbitol (agente de elución), 100 mM Tris y 0.2 g L⁻¹ NaN₃ a pH 8.5 (pH es ajustado mediante 1 M HAc). Finalmente, se lleva a cabo un paso de regeneración o limpieza (Fase C) de la columna pasando una disolución de 100 mM de HAc glacial. Estas condiciones se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las condiciones de la cromatografía de boroafinidad para la separación de la fracción glicada y no glicada de la Hb

Cromatografía de boroafinidad	
Columna	TSK-GEL Boronate-5PW (7,5cm x 7,5mm i.d.; Tosoh Bioscience)
Volumen de inyección	100µL
Flujo	1mL·min ⁻¹
Fase móvil A (carga)	250 mM Acetato de amonio (pH 8.5, 1 M NaOH) 50 mM MgCl ₂ 0.2 g L ⁻¹ NaN ₃
Fase móvil B (elución)	200 mM Sorbitol (pH 8.5, 1 M HAc) 100 mM Tris 0.2 g L ⁻¹ NaN ₃
Fase móvil C (regeneración)	100 mM HAc glacial
Gradiente	0-20 min, 100% Fase A 20.01-40 min, 100% Fase B 40.01-50 min, 100% Fase C
Detección	UV-VIS: 460, 541 y 577 nm

Diariamente se realizó al menos un blanco de gradiente, hasta obtener un perfil cromatográfico exento de material enlazado. La salida de la columna cromatográfica se conectó a un detector UV-VIS fijado a 415, 541 y 577 nm (longitudes de onda características del grupo hemo, banda α y banda β , respectivamente).

El cromatograma obtenido tras la cromatografía de afinidad con un patrón de Hb de $3,9 \text{ mg mL}^{-1}$ se representa en la Figura 6. El primer pico aparece a unos 3 minutos y corresponde a la hemoglobina no-glicada mientras que el segundo pico, que se observa a los 24 minutos es de la hemoglobina glicada. Los picos están completamente resueltos.

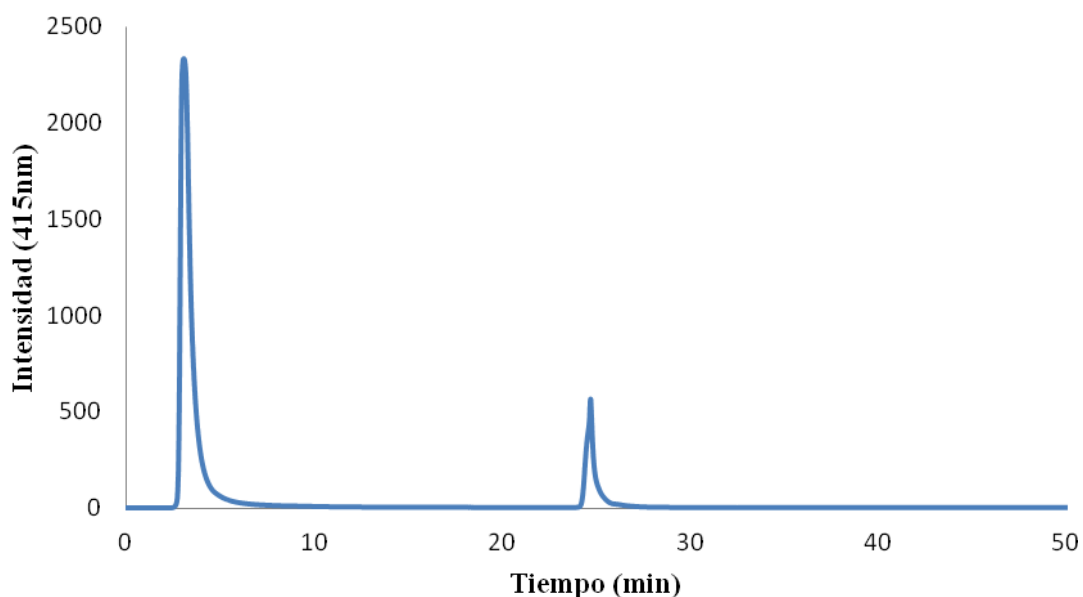


Figura 6. Cromatografía de afinidad para la hemoglobina

Es importante destacar que en este tipo de cromatografía, todas las formas de la hemoglobina no-glicada aparecen en el pico de 3 minutos mientras que todas las especies glicadas (incluida la HbA_{1c}) aparecen en el pico de 24 minutos.

D.1.2 Cromatografía de intercambio catiónico

En la cromatografía de intercambio catiónico, las diferentes especies de la Hb son separadas en función de su carga. La unión de la glucosa a los enlaces N-terminal de la Hb disminuye el pI de la proteína. De este modo, las especies glicadas (en concreto la GHb) son más negativas y eluyen antes que las especies no glicadas (en concreto la Hb mayoritaria, HbA).

Se necesitan fases móviles compatibles con el ICP-MS, como son las sales de amonio. En este sentido, se utilizó como fase móvil A una disolución de

malonatoamónico (5.6 gde ácido malónico en 1L, ajustado el pH de 5.7 con una disolución de NH₃) que contiene 0.2 g L⁻¹ de azida de sodio (NaN₃). Y la fase B consiste en fase A más 250 mM de acetato de amonio. Se ha añadido NaN₃ en ambas fases para evitar el crecimiento bacteriano. Como en el caso de la columna de boroafinidad se realizó diariamente al menos un blanco de gradiente, hasta obtener un perfil cromatográfico exento de material enlazado. La salida de la columna cromatográfica se conectó a un detector UV-VIS fijado a 415, 541 y 577 nm (longitudes de onda características del grupo hemo, banda α y banda β , respectivamente). El resumen de las condiciones de la separación aparecen en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen las condiciones cromatográficas de cambio catiónico

Cromatografía de intercambio catiónico		
Columna	Mono S 4,6 PE (10 x 100 mm i.d.; Pharmacia)	
Volumen de inyección	50 μ L	
Flujo	1 mL·min ⁻¹	
Fase móvil A	Malonato de amonio + 0,2g·L ⁻¹ NaN ₃ (pH 5,7)	
Fase móvil B	Fase A + 250 mM acetato de amonio (pH 5,7)	
Gradiente	Tiempo (min)	Fase B (%)
	0	0
	10	50
	15	100
	25	100
Detección	UV-VIS: 415, 541 y 577 nm ICP-MS: ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe	

El perfil cromatográfico obtenido para la separación de la hemoglobina glicada y no glicada únicamente mediante cromatografía de intercambio iónico puede observarse en la Figura 7. En este caso, a diferencia de lo que ocurría en el caso de la cromatografía de afinidad pueden observarse diversos picos cromatográficos o formas de la hemoglobina (puesto que muestran absorción a 415 nm). De acuerdo con previas publicaciones, el pico correspondiente a HbA_{1c} podría ser el que aparece a aproximadamente 6 minutos (no existen estándares puros para confirmarlo). Sin embargo, la cuantificación directa parece bastante compleja con esta separación puesto que aparecen diversas especies solapando el pico de interés.

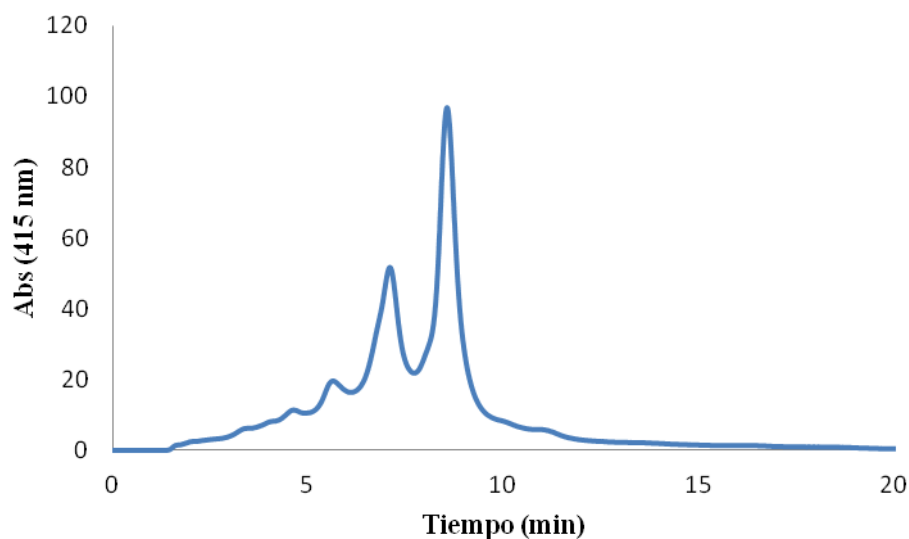
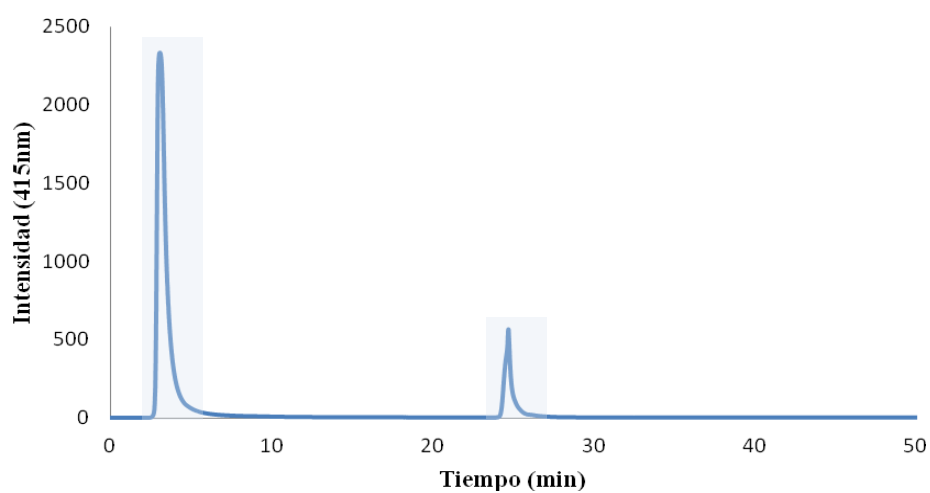


Figura 7. Perfil cromatográfico de cambio catiónico para un patrón de hemoglobina

D.1.3 Cromatografía multidimensional

Para lograr mejorar la selectividad de la cromatografía de cambio catiónico, se aplicó la estrategia multidimensional: las formas separadas previamente por boroafinidad son recogidas como se muestra en a Figura 8A y a continuación se preconcentran (empleando ultracentrifugación) para llevarlas a la segunda. En este caso, los resultados de la cromatografía de cambio catiónico como segunda dimensión aparece en la Figura 8B.

A)



B)

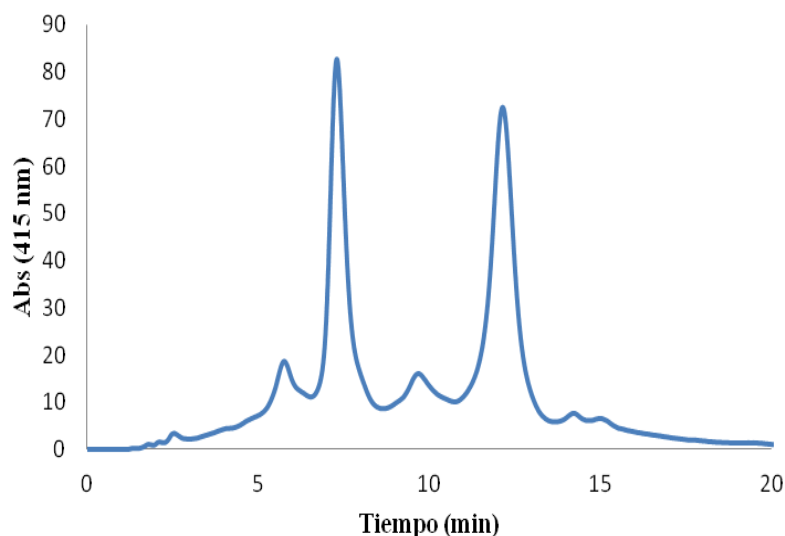


Figura 8. Perfil cromatográfico multidimensional de un patrón de hemoglobina: A) boroafinidad mostrando el área recogida y B) cambio catiónico de la fracción de 24 minutos obtenida por boroafinidad

Como se puede observar a pesar de las limitaciones en cuanto a la resolución se observa más claramente la presencia de dos picos principales en la segunda dimensión procedentes de la fracción glicada recogida en boroafinidad a 7 y 12 minutos respectivamente. En un principio se intuye que el primer pico a 7 minutos podría corresponder a la HbA_{1c}, mientras que el segundo más intenso correspondería a la Hb sin glicar. El primer pico intenso podría corresponder a la GHb ya que por el pH de las fases móviles eluiría primero en esta cromatografía. Es importante observar que aunque la cromatografía de boroafinidad permite obtener solo dos picos, estos no son totalmente puros y por tanto la determinación de HbA_{1c} no puede realizarse directamente con este sistema. A 6 y 10 minutos aparecen otras dos especies desconocidas minoritarias en el cromatograma.

De forma similar, se realiza por otro lado un cromatograma a una fracción de Hbno glicada recogida en boroafinidad (3 minutos en el cromatograma de la Figura 7) y se preconcentra de la misma manera que la fracción de GHb para ser inyectada en la segunda dimensión de cambio catiónico. El cromatograma obtenido en este caso se puede observar en la Figura 9.

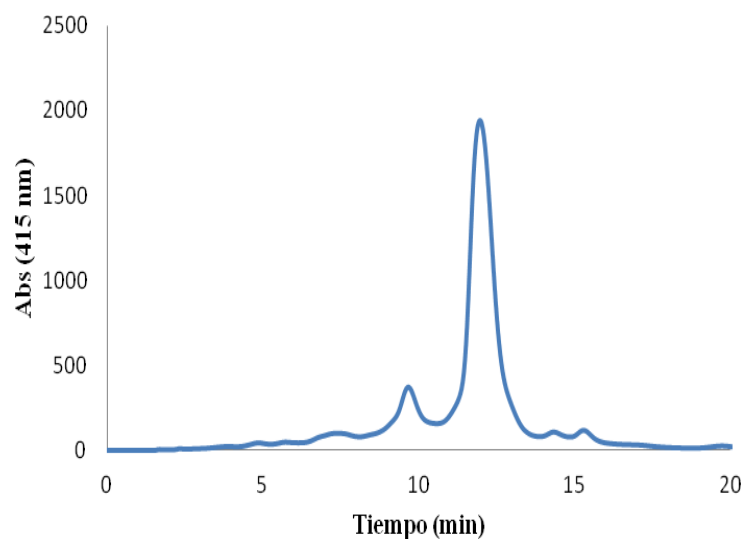


Figura 9. Perfil cromatográfico de cambio catiónico para una fracción de Hb recogida en boroafinidad y preconcentrada

En este caso, se observa un pico mayoritario únicamente que aparece a 12 minutos (similar al observado en la Figura 8B). Ambos cromatogramas aparecen superpuestos en la Figura 10. A la vista de los resultados que se pueden observar en esta figura parece que las especies de 10 y 12 minutos corresponden a las distintas especies no-glicadas mientras que el pico de 7 minutos puede corresponder a la HbA_{1c}. Para confirmar dichas suposiciones, ambos picos fueron recogidos, preconcentrados y llevados a MALDI-MS.

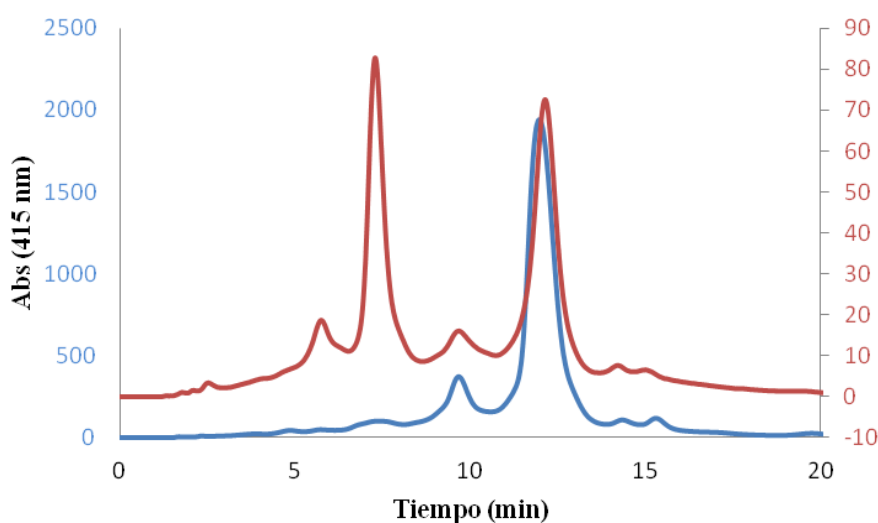


Figura 10. Superposición de los perfiles cromatográficos para intercambio catiónico de las dos fracciones recogidas en afinidad

D. 2 Caracterización de las proteínas mediante MALDI

La Espectrometría de Masas mediante Desorción/Ionización con Láser asistida por Matriz (MALDI-MS) es un método de ionización suave capaz de analizar compuestos de alto peso molecular, no volátiles y térmicamente lábiles como proteínas, oligonucleótidos, polímeros sintéticos y compuestos inorgánicos de un amplio rango de pesos moleculares (500-100000 Da). MALDI-MS es también un método muy sensible que permite la detección de cantidades inferiores a los femtomoles con una precisión entre 0.1-0.01%.100.

En el MALDI, la muestra se mezcla con un exceso de matriz (~ 1000 veces mayor) de naturaleza orgánica sobre la placa de MALDI en la que co-cristalizan ambas al evaporarse el disolvente. La mezcla es sometida en alto vacío a pulsos cortos de luz láser en la frecuencia del UV o del IR medio que inciden sobre la muestra co-cristalizada dando lugar a la volatilización de la misma, gracias a la absorción de la luz láser por la matriz vía electrónica (láser UV) o por vía excitación vibracional (láser IR). El área irradiada por el láser, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa; los cuales son transferidos por campos electromagnéticos al analizador de masas, donde los iones son separados según su masa/carga antes de su llegada al detector.

La interpretación de los espectros de MALDI es relativamente sencilla, debido a que en el proceso del MALDI se producen predominantemente iones moleculares monocargados ($[M+H]^+$ o $[M-H]^-$). Aunque también se pueden generar iones doble y triplemente cargados y dímeros para proteínas con pesos moleculares superiores a 5kDa. El análisis para su caracterización de la hemoglobina o de las fracciones recogidas de sus diferentes formas de estudio en este trabajo se llevó a cabo mediante un MALDI-TOF MS, trabajando en todos los casos en modo positivo.

La preparación de la muestra fue necesaria la preparación de una disolución saturada de matriz en una mezcla de acuosa con el 30% de acetonitrilo que contenga 0.1% de TFA para facilitar la desorción e ionización de los compuestos de la muestra. La proteína (~1-10 μ M en solución acuosa) y la matriz (~ 10 mM) se mezclaron en proporción 1:1. Es importante que tanto la matriz como el analito no precipiten cuando se mezclan ambas disoluciones para la formación adecuada de los cristales.

Para terminar se coloca 1 μ L de la mezcla en cada pocillo por triplicado y se deja secar a temperatura ambiente. Ésta es la técnica más común para la preparación de la muestra y recibe el nombre de gota secada al aire (drieddroplet). Las muestras se prepararon en una placa de acero inoxidable recubierta deteflónVoyager 96 x 2 SamplePlate P/N V700813, placa tipo hidrofóbica.

Gracias a la realización de los espectros de MALDI se puede dar nombre a cada una de las proteínas y fracciones de HPLC recogidas. Debido a la estructura de la proteína, como ya se explicó, se espera encontrar dos cadenas iguales dos a dos (α y β) puesto que la unión entre las subunidades suele ser lábil al láser. Los pesos moleculares teóricos de las cadenas de la hemoglobina aparecen recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Pesos moleculares de las cadenas de las proteínas de interés

	Hemoglobina no glicada (HbA ₀)	Hemoglobina glicada (HbA _{1c})
Cadena α	15126 kDa	15288 kDa
Cadena β	15867 kDa	16029 kDa

Para optimizar las condiciones, primero se realizó el espectro de MALDI para un patrón de hemoglobina sin previo paso por ningún tipo de separación cromatográfica, Figura 11. Como se puede observar aparecen las cadenas α y β de la hemoglobina no glicada a las m/z 15123 y 15842 puesto que se trata de la especie más abundante en dicho patrón. Además también se observan las señales de estas cadenas pero doble cargadas: M+2 a las masas 7574 y 7909 respectivamente. En el espectro obtenido y con la resolución del sistema para proteínas intactas no es posible saber si se pueden detectar las formas glicadas.

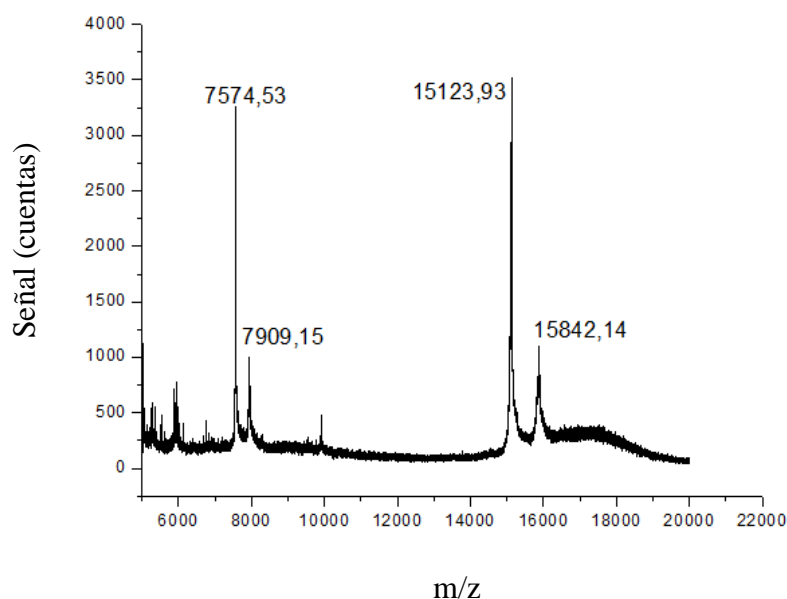


Figura 11. Espectro de MALDI para un patrón de hemoglobina

Las fracciones obtenidas a través de la cromatografía bidimensional fueron preconcentradas con la metodología habitual y embebidas en la matriz para ser introducidas en el sistema MALDI. La fracción correspondiente al pico de 7 minutos en la cromatograma de la Figura 10 se trató de esta manera y el espectro obtenido aparece recogido en la Figura 12. De forma análoga el pico de 12 minutos fue recogido y preconcentrado para el mismo propósito. El espectro se recoge en la Figura 13.

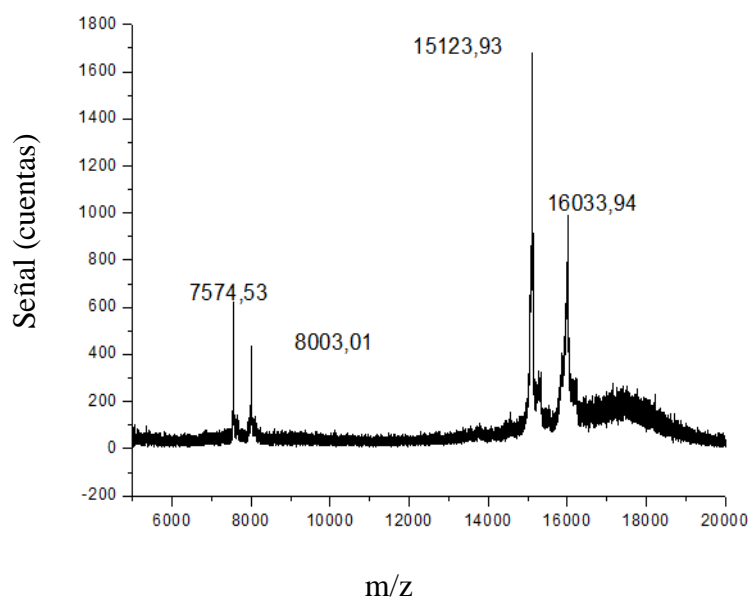


Figura 12. Espectro de MALDI para la primera fracción (7 minutos) de la cromatografía de cambio catiónico(Figura 10)

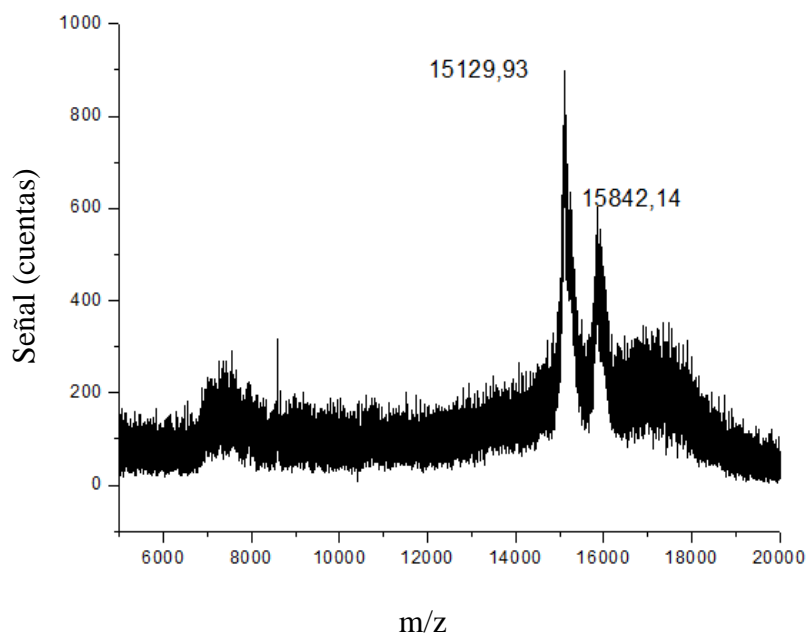


Figura 13. Espectro de MALDI para el segundo pico (12 minutos) de la cromatografía de cambio catiónico (Figura 10)

Gracias a las Figuras 12 y 13 se puede corroborar lo que se esperaba, el primer pico mayoritario de la cromatografía de cambio catiónico corresponde a la hemoglobina glicada HbA_{1c} ya que concuerda el peso de la glicación en la cadena β (encontrada a m/z 16033 respecto a la teórica de 16029). Además puede observarse la cadena α que aparece alrededor de 15129 en las dos fracciones aunque la fracción no glicada aparece con mucho mayor ruido. Esto puede deberse al mayor contenido en sales de esta segunda fracción que pueden no haber desaparecido totalmente en el proceso de preconcentración y afectan a la señal en MALDI por culpa de una mala cristalización de la muestra.

D. 3 Estudio de la preconcentración y desalinización de las fracciones

La preconcentración de las fracciones entre la primera y la segunda dimensión es necesaria para tener una detección adecuada de las especies. Tratando de establecer la mejor forma de llegar a ello se probaron tres métodos de preconcentración:

liofilización, preconcentración mediante speed back y lualtrafiltración mediante filtros de membrana (Amicon).

La primera forma de preconcentración se lleva a cabo la liofilización de las fracciones recogidas en la primera dimensión (Hb y GHb) durante toda una noche. Se obtienen unos precipitados blancos para cada una de las dos fracciones.

Tras la liofilización se realizan los cromatogramas de la segunda dimensión para cada una de las fracciones en distintos niveles de concentración pero en todos los cromatogramas que se realizaron no se observó ninguna señal.

Para la preconcentración mediante Speed Back se emplea el método de trabajo que trae el equipo para disoluciones acuosas y a una temperatura de 30°C. Se evapora 0,5 mL de disolución cada cuatro horas. Tras esta preconcentración el aspecto de las fracción de la GHb es gelatinoso lo cual es normal ya que la fase móvil en la que eluye contiene sorbitol (azúcar). Para la fracción de la Hb se observa un precipitado blanco mientras que para la GHb no.

Para comprobar si estos precipitados son en realidad las proteínas deseadas se realizó la segunda dimensión a cada una de las fracciones preconcentradas. Los cromatogramas que se obtienen, al igual que en el caso de la liofilización no se observan ninguna señal en ellos.

Para tercera forma de preconcentración se utilizaron membranas de ultrafiltración con un tamaño de corte de 50 kDa y de 10kDa. Estas membranas permiten preconcentrar y desalinizar lo cual proporcionaría a priori mejores resultados. Todo lo que tenga un peso molecular mayor o igual del tamaño de corte no atraviesa la membrana y permanece en la parte superior del *Amicon*, denominada “disolución retenida”. En el vial de filtrado tendremos los restos salinos y las proteínas y péptidos menores. El volumen de capacidad de estos Amicones es de 0,4 mL. Las fracciones recogidas se someten a la centrifugación: 12 rpm, a temperatura ambiente durante 9 minutos. Una vez realizados los lavados con agua, la muestra se recupera invirtiendo el dispositivo por centrifugación a 2rpm, temperatura ambiente y 5 min; obteniéndose el volumen final requerido. El proceso total de desalinización y preconcentración de las fracciones es de 0,5 mL cada 18 minutos aproximadamente.

Los cromatogramas obtenidos de la segunda dimensión con las membranas de 50KDa daban señales poco intensas, por lo que se pensó que se podría estar perdiendo proteína a pesar de que su peso es de 60KDa. Cuando se realizó la segunda dimensión a

las fracciones tras la preconcentración con membranas de 10KDa se observó que se estaba en lo cierto.

Tras esta serie de experimentos se pudo concluir como mejor opción la ultracentrifugación. Dado que estos filtros poseen una membrana, es necesario comprobar si se pierde la proteína de interés en ella porque se quede retenida de manera inespecífica. En el caso de que así sea hay que conocer su valor.

Para saber qué porcentaje de proteína se pierde en la membrana, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Se recogen las fracciones correspondientes a cada una de las dos proteínas en la primera dimensión y se llevan sin ningún tratamiento intermedio a la segunda dimensión. Por otro lado se hace el mismo procedimiento pero en este caso si se preconcentran en dichas membranas y se comparan los resultados obtenidos. Este estudio se llevó a cabo solo con la Hb no glicada puesto que en el caso de la especie glicada la fracción no preconcentrada no se observaba señal alguna para la GHb. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 14 (A y B).

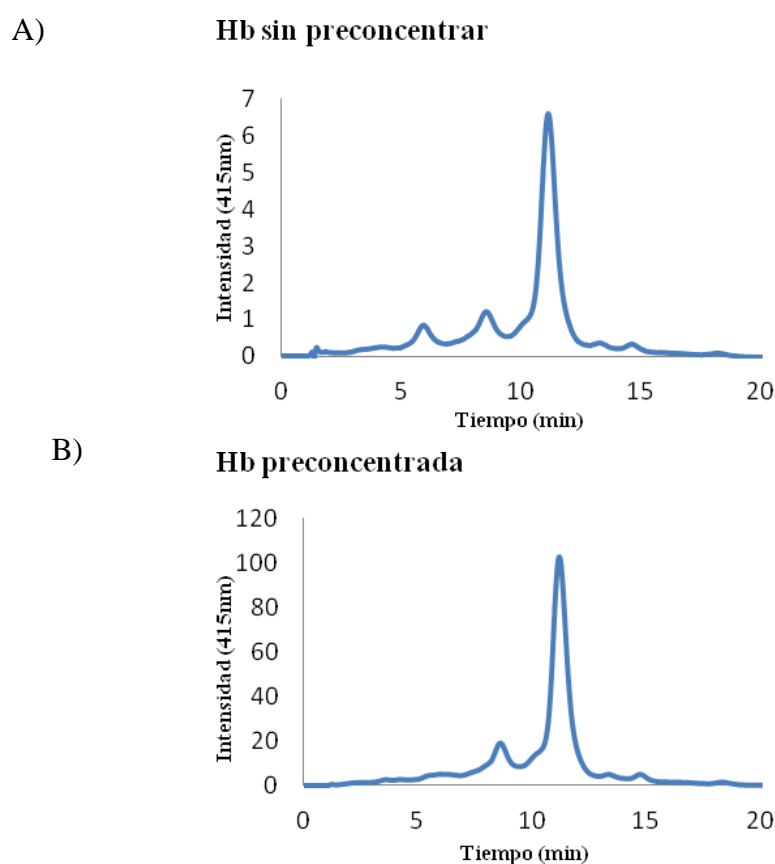


Figura 14. Cromatogramas de la fracción no glicada antes (A) y después (B) de la preconcentración

Los resultados obtenidos mostraron que en el proceso de preconcentración con filtros de corte de 10kDa se perdía una cantidad significativa de proteína y la recuperación resultó ser del 88%.

D. 4 Análisis por dilución isotópica en especiación elemental. Estudios cuantitativos de la glicación de la hemoglobina

De manera sencilla, la dilución isotópica es una estrategia de cuantificación en el análisis de trazas donde se emplea un trazador o spike enriquecido en uno de los isótopos del elemento a cuantificar y cuya concentración y abundancias isotópicas se encuentran perfectamente establecidas. Una vez añadido el trazador a la muestra y alcanzado el equilibrio isotópico, las abundancias isotópicas de la mezcla y por tanto las relaciones isotópicas, serán intermedias entre las de la muestra y el trazador, y dependerán tanto de la cantidad de trazador adicionado como de la cantidad original del elemento en la muestra.⁵⁴

A partir de la medida de la nueva relación isotópica en la mezcla se puede calcular la concentración del elemento en la muestra original utilizando la ecuación de la Dilución Isotópica.

$$\text{Ecuación 1} \quad C_S = C_{Sp} \frac{m_{Sp}}{m_S} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right)$$

- N_S : número de moles del elemento poli-isotópico presente en la muestra
- N_{Sp} : número de moles del mismo elemento en el trazador (spike)
- N_m : número de moles del elemento en la mezcla
- R_m : relación isotópica de ambos isótopos (a/b) en la mezcla
- A_S^a y A_S^b : abundancias de los isótopos a y b en la muestra respectivamente
- A_{Sp}^a y A_{Sp}^b : abundancias de los isótopos a y b en el trazador respectivamente
- C_S y C_{Sp} : concentración del elemento en la muestra y en el trazador respectivamente
- m_S y m_{Sp} : peso de muestra tomada y peso de spike añadido respectivamente
- M_S y M_{Sp} : peso atómico del elemento en la muestra y en el trazador respectivamente

Todos los parámetros de la ecuación 1 son conocidos o medibles, por lo que la concentración del elemento en la muestra C_s se calcula simplemente a partir de la medida de la relación isotópica R_m mediante Espectrometría de Masas.

D.4.1 Procedimiento analítico para la determinación del contenido de hierro en el trazador mediante Dilución Isotópica Inversa

Como paso previo a la cuantificación del hierro por dilución isotópica es necesario caracterizar el spike que se va a utilizar (sus abundancias y concentración) y calcular el efecto de discriminación de masas (transmisión preferencial de los iones más pesados frente a los más ligeros en el espectrómetro). En este trabajo se empleó para llevar a cabo el análisis por dilución isotópica un patrón de ^{57}Fe preparado en el grupo de trabajo que según sus indicaciones contiene 14,6% de HNO_3 , 0,7% de HCl y 2000ppm de ^{57}Fe . Para su caracterización se procedió a la determinación del contenido en hierro por dilución isotópica inversa, es decir a cierta cantidad del patrón enriquecido se le añade una cantidad conocida del patrón natural certificado de Fe (Merk) y se calcula la concentración por la ecuación de la dilución isotópica inversa.

Abundancias isotópicas y concentraciones de los patrones enriquecidos isotópicamente obtenidos mediante dilución isotópica inversa. Para la corrección del factor de discriminación de masas, se ha utilizado el modelo exponencial y una disolución de 25 ppb de composición isotópica natural. El factor K se obtiene midiendo las intensidades experimentalmente y obteniendo las relaciones isotópicas para compararlas con las relaciones isotópicas teóricas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Caracterización de la composición y concentración del trazador mediante dilución isotópica inversa

Isótopo	Abundancia %	Concentración spike madre calculada	2459,7 ppm
^{54}Fe	0,03529	Concentración real spike utilizado	13,2 ppb
^{56}Fe	5,76292	Peso atomic	56,88 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
^{57}Fe	93,75060		
^{58}Fe	0,45119		

D.4.2 Procedimiento analítico para la determinación de hierro mediante Dilución Isotópica post-columna usando HPLC-ICP-MS

El objetivo será desarrollar una metodología que nos permita cuantificar la concentración de hemoglobina glicada a través de la cuantificación del Fe presente en la misma. Para ellos, es necesario llevar a cabo la cuantificación precisa y exacta de hierro a través de la dilución isotópica. En este caso, la cuantificación de hierro en los picos cromatográficos se llevó a cabo mediante el análisis por Dilución Isotópica en línea, es decir mezclando la muestra y el trazador en continuo y midiendo la relación isotópica en la mezcla con el tiempo. Si el aporte del trazador a la mezcla se mantiene constante en el tiempo, la relación isotópica medida en la mezcla (R_m) dependerá únicamente del aporte del elemento proveniente de la muestra, que puede ser constante o variable. En nuestro caso, el aporte del elemento de la muestra a la mezcla varía con el tiempo debido a la separación cromatográfica. Por tanto se ha de modificar la ecuación de la Dilución Isotópica (Ecuación 1) introduciendo el flujo másico del elemento como variable. El flujo másico total (mol min^{-1}) para dos isótopos a y b del elemento en la mezcla será (Ecuación 2):

$$\text{Ecuación 2} \quad MF_S = C_{Sp} d_{Sp} f_{Sp} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right)$$

Esta ecuación indica que si la relación isotópica en la mezcla (R_m) varía con el tiempo (por ejemplo, al eluir un compuesto de la columna cromatográfica), MF_S también variará con el tiempo. La representación de MF_S en función del tiempo será el denominado cromatograma de flujo másico. Si el flujo másico viene expresado en $\text{ng} \cdot \text{min}^{-1}$ y el tiempo en min la integración de cada pico cromatográfico nos proporcionará la masa del elemento eluído en dicho pico (en ng). La concentración en la muestra original podrá calcularse conociendo la masa (o el volumen y la densidad) de la muestra inyectada en el sistema cromatográfico.

En nuestro caso, para llevar a cabo la cuantificación de hierro en las diferentes fracciones cromatográficas por Dilución Isotópica en línea, el eluyente se mezcló a la salida de la columna cromatográfica a un flujo continuo ($0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) con

unadisolución del patrón enriquecido (disolución de ^{57}Fe de 32,2 ppb) que se impulsa utilizando labomba peristáltica del ICP-MS. La mezcla de ambos flujos se consiguió mediante unapieza en “T” a la salida de la columna analítica, siendo la mezcla nebulizadadirectamente al plasma. Para conocer con exactitud el flujo de la disolución de trazador se llevó a cabo una calibración diaria (al principio y al final del análisis) del flujo debombeo de la bomba peristáltica. Para la solubilización del trazador (^{57}Fe) se usó una disolución reguladora de 25 mM citrato desodio/ácido cítrico ($\text{pH}\approx 4$), consiguiéndose de este modo una señal estable deltrazador.

En la Figura 15 se observa el cromatograma de intensidades correspondiente a la segunda dimensión de la fracción glicada (obtenida mediante cromatografía de afinidad y preconcentrada como se ha detallado anteriormente) en las condiciones cromatográficas y de ICP-MS que se hayan recogidas en las diferentes Tablas.

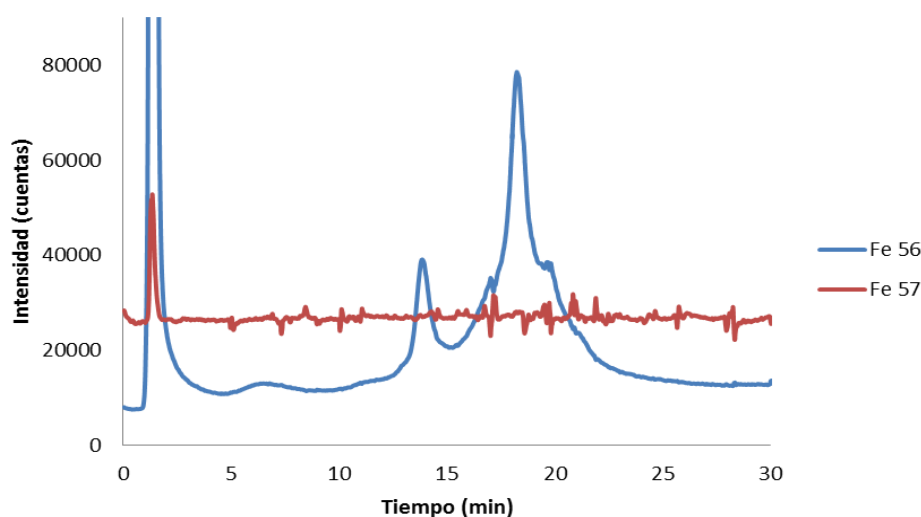


Figura 15. Cromatograma de intensidades para los isótopos ^{56}Fe y ^{57}Fe durante la segunda dimensión cromatográfica mediante IDA post-columna y HPLC-ICP-MS

Como se puede observar, en el cromatograma de ICP-MS los tiempos de retención se encuentran desplazados respecto a los encontrados mediante UV-VIS lo que implica una pérdida de resolución notable en el cromatograma. Esto se debe a las conexiones empleadas en el sistema y a los posibles volúmenes muertos. Así mismo, se ha observado un aumento de la señal de Fe en el fondo cromatográfico debido al incremento en la concentración de sales de las fases móviles con el tiempo que tiene pequeñas contaminaciones de Fe a pesar de que se trata de reactivos de alta pureza.

La conversión del cromatograma de intensidades en cromatograma de flujo másico es llevada a cabo mediante una serie de operaciones matemáticas aplicadas en cada punto del cromatograma. En primer lugar se transforma en un cromatograma de relaciones isotópicas. Cuando a cada punto de este último cromatograma se le aplica la ecuación de la dilución isotópica en línea se obtiene así el cromatograma de flujo másico que aparece en la Figura 16.

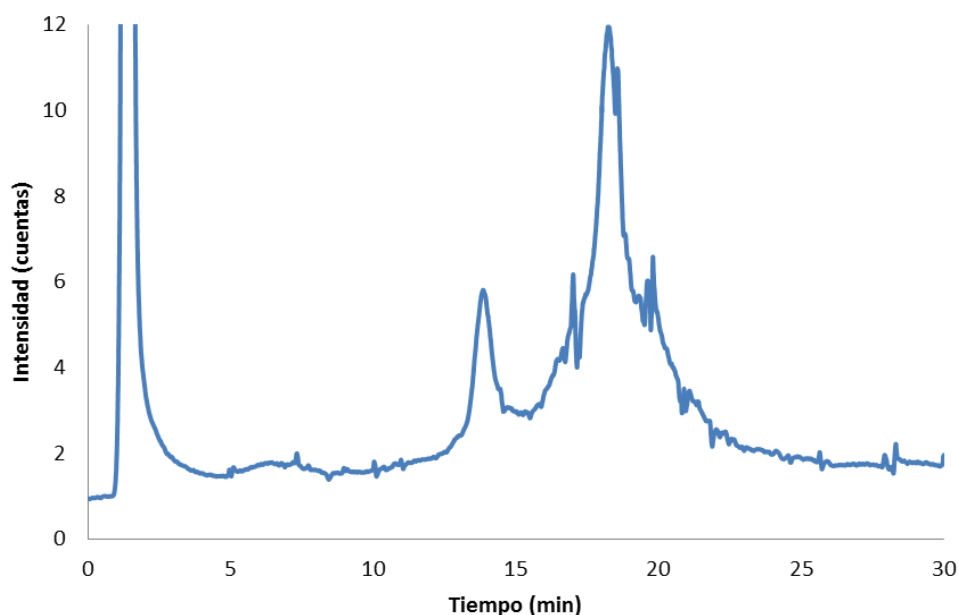


Figura 16. Cromatograma de flujo másico durante la segunda dimensión cromatográfica por HPLC-ICP-MS

La integración de los picos cromatográficos permite cuantificar el hierro presente en cada uno de los picos correspondientes a la HbA_{1c} y HbA respectivamente. La cantidad de hierro en cada fracción (ng) se obtuvo a partir de la integración de los picos cromatográficos usando el software *Origin 7.5* (Microcal Software Inc. Northampton, MA, EE.UU.). La concentración de hierro (ng g⁻¹) se calculó dividiendo la cantidad de hierro encontrada entre el peso de muestra inyectado en el HPLC. Realizando los cálculos, teniendo en cuenta las áreas de cada cromatograma de flujo másico, el peso de las fracciones preconcentradas y el peso inyectado en cada análisis y teniendo en cuenta la estequiometría entre Fe y Hb (1 mol de proteína contiene 4 moles de Fe) se obtienen los resultados resumidos en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados para la cuantificación de proteína mediante IDA post-columna y HPLC-ICP-MS

Cantidad de Fe en la fracción glicadaseparada en la segunda dimensión	1,99 ng de Fe
Concentración de GHb en el patrón inicial*	41 ppm
Porcentaje de GHb respecto a la Hb presente en el patrón inicial*	0,68%
Concentración de GHb	6,86mMol GHb·mMol Hb ⁻¹

*Se refiere a la concentración teórica del patrón inicial entendiendo que en él, toda el material pesado en la balanza es hemoglobina

D. 5 Normas de seguridad en la manipulación del material de laboratorio. Tratamiento de residuos

Durante toda la realización del trabajo de laboratorio llevado a cabo durante este proyecto, requiere principalmente el uso de guantes y bata. Siendo recomendable en ocasiones como el manejo de ácidos o bases el uso de gafas así como trabajar en campana extractora cuando se manejan reactivos volátiles.

Para el tratamiento de los residuos no sería necesario un tratamiento específico ya que siempre se está trabajando con patrones y no con muestras reales, pero en todo caso es recomendable desechar las disoluciones que contienen hemoglobina de manera que sean tratadas como muestras biológicas.

E. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de fin de Máster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Aunque la cromatografía de afinidad proporciona dos picos bien resueltos para el patrón de hemoglobina donde se encuentran las formas glicadas y no glicadas, el empleo de la segunda dimensión mediante intercambio catiónico confirma que dichos picos no son puros y que contienen, particularmente en la fracción glicada otras especies que proporcionarían una cuantificación por exceso de la forma HbA1c.
2. La estrategia multidimensional afinidad + cambio catiónico proporciona especies lo suficientemente puras para ser cuantificadas puesto que los resultados de MALDI-MS avalan la presencia de la cadena β -glicada, característica de la HbA1c. Por tanto la estrategia multidimensional sería adecuada para la determinación específica de esta especie.
3. La preconcentración necesaria entre las distintas cromatografías proporciona mejores resultados si se realiza empleando membranas de corte de 10kDa donde no se han observado grandes pérdidas significativas de los analitos por retención inespecífica en la membrana.
4. La cuantificación por dilución isotópica post-columna podría emplearse como estrategia para abordar la cuantificación de los materiales de referencia a través de la medida del Fe con ICP-MS.

F. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹De Laeter JR, Böhlke JK, De Bièvre P, Hidaka H, Peiser HS, Rosman KJR, Taylor PDP. *Atomic weights of the elements: review 2000* (IUPAC technical report). Pure Appl Chem 2003;75(6):683–800
- ²Pietrangelo, A. 2002. *Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 282: G403-G414.
- ³Ponka, P. 1999. *Iron metabolism: physiology and pathophysiology*. Trace Elem. Res. Hum. 5, 55- 57.
- ⁴Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B., 1994. *Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?*. J. Neurochem. 63, 793-807.
- ⁵ Andrews, N.C., 1999. *Disorders of iron metabolism*. N. Engl. J. Med. 341, 1986-1995.
- ⁶Boldt, D.H., 1999. *New perspectives on iron: an introduction*. Am. J. Med. Sci. 318, 207-212.
- ⁷Conrad, M.E., Umbreit, J.N. Moore, E.G., 1999. *Iron absorption and transport*. Am. J. Med. Sci. 318, 213-229.
- ⁸Wessling-Resnick, M., 1999. *Biochemistry of iron uptake*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 34,285- 314
- ⁹McCord, J.M., 1998. *Iron, free radicals, and oxidative injury*. Seminars Hematol. 35, 5-12.
- ¹⁰Messerchmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghart K. *Handbook of metalloproteins*, Volume 2, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- ¹¹Cocho de Juan JA, Escanero JF, Gonzalez de Buitrago JM. *Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos*. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica y Patología Molecular, 1998.
- ¹² Zhang X, Medzihradzky KF, Cunningham J, Lee PDK, Rognerud CL, Ou C-N, Harmatz P. *Characterization of glycated hemoglobin in diabetic patients: usefulness of electrospray mass spectrometry in monitoring the extent and distribution of glycation*. J Chromatogr B 2001;759:1–15.
- ¹³Krishnamurti U, Steffes MW. *Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of Diabetes Mellitus*. ClinChem 2001;47:1157–65.
- ¹⁴Bry L, Chen PC, Sacks DB. *Effects of haemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin*. ClinChem 2001;47:153–63.

- ¹⁵Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano E, Fernández-Fernández I. *La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades*. Gac. Sanit. 2006, 20, 15-24.
- ¹⁶American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus*. Diab. Care 2008, 3, S55-S60.
- ¹⁷American Diabetes Association. *Clinical practice recommendations*. Diab Care 2007;30(1):S4-S41.
- ¹⁸WG John. *Haemoglobin A1c: analysis and standardisation*. Clin. Chem. Lab. Med. 2003, 41, 1199-1212.
- ¹⁹Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoetzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C. *Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood*. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(1), 78-89
- ²⁰Iguchi K, Nakanishi T, Miyazaki A, Shimizu A, Ota A. Development of an isotope dilution mass spectrometry assay for HbA1c based on enzyme-cleaved peptide analysis. J Chromatography B, 2004, 25-31
- ²¹Zhang X, Medzihradszky KF, Cunningham J, Lee PDK, Rognerud CL, Ou C-N, Harmatz P. *Characterization of glycosylated hemoglobin in diabetic patients: usefulness of electrospray mass spectrometry in monitoring the extent and distribution of glycation*. J Chromatogr B 2001;759:1-15.
- ²²Nakanishi T, Shimizu A. *Determination of ionization efficiency of glycosylated and non-glycosylated peptides from the N-terminal of hemoglobin β -chain by electrospray ionization mass spectrometry*. J Chromatography B, 2000, 83-89
- ²³Becker JS, Dietze HJ. *Inorganic mass spectrometric methods for trace, ultratrace, isotope and surface analysis*. Int J Mass Spectrom Ion Processes 2000;197:1-35.
- ²⁴Vanhaecke F, Balcaen L, De Wannemacker G, Monees L. *Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of Fe isotope ratios*. J Anal AtSpectrom 2002;17:933-43.
- ²⁵Heumann KG. *Isotope dilution mass spectrometry*. Int J Mass Spectrom Ion Process 1992,118/119:575-92.
- ²⁶SoldadoCabezuelo AB, Montes Bayón M, Blanco González E, García Alonso JI, SanzMedel A. *Speciation of basal aluminum in human serum by fast protein liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection*. Analyst 1998;123:865-9.
- ²⁷del Castillo Busto ME, Montes Bayón M, Añón E, Sand Medel A, *Simultaneous determination of glycosylated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and*

total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS. J. Anal. At.Spectrom., 2008, 23, 758-764

²⁸ del Castillo Busto ME, Montes Bayón M, Añón E, Sand Medel A, *Quantitative targeted biomarker assay for glicated haemoglobin by multidimensional LC using mass spectrometric detection. J. Proteomics, 2011, 74, 35-43*

²⁹Li YC, Jeppsson J-O, Jörntén-Karlsson M, Larsson EL, Jungvid H, Galaev IY, Mattiasson B. *Application of shielding boronate affinity chromatography in the study of the glycation pattern of haemoglobin. J Chromatogr B 2002;776:149-60.*