

Universidad de Oviedo



**Programa de Doctorado
“Química Física y Analítica”**

**Desarrollo de metodologías analíticas
basadas en el uso de compuestos
orgánicos enriquecidos isotópicamente
para su aplicación en
Química Clínica y Metabolómica**

TESIS DOCTORAL

Mario Fernández Fernández

Oviedo, 2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de metodologías analíticas basadas en el uso de compuestos orgánicos enriquecidos isotópicamente para su aplicación en Química Clínica y Metabólica	Inglés: Development of analytical methodologies based on the use of isotopically labelled organic compounds for their application in Clinical Chemistry and Metabolomics.
2.- Autor	
Nombre: Mario Fernández Fernández	DNI/Pasaporte/NIE: -B
Programa de Doctorado: Química Física y Analítica	
Órgano responsable: Dpto. Química Física y Analítica (Universidad de Oviedo)	

RESUMEN (en español)

El principal objetivo de la Tesis que se presenta es el desarrollo de metodologías analíticas basadas en el uso de compuestos orgánicos enriquecidos isotópicamente para su aplicación en Química Clínica y Metabólica.

En la Química Clínica, el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS) es una técnica analítica ampliamente usada para la certificación de materiales de referencia y en ejercicios de intercomparación. Esta técnica se aplica al análisis de compuestos orgánicos utilizando trazadores enriquecidos en varios átomos de ^{13}C , ^2H , o ^{15}N y la concentración del analito se obtiene a partir de la construcción de un calibrado metodológico lo que condiciona su aplicación al análisis de rutina. Por tanto, se requieren procedimientos alternativos basados en IDMS que impliquen la eliminación del calibrado con el correspondiente ahorro de coste y tiempo, posibilitando su aplicación en los laboratorios clínicos de rutina y además en los que estén corregidas todas las posibles fuentes de error.

En Metabólica, se necesita una medida exacta y precisa de la distribución isotópica para el estudio tanto de la regulación y comprensión de las rutas metabólicas, como de la biosíntesis de proteínas utilizando compuestos enriquecidos isotópicamente. La medida de la distribución isotópica en la investigación de las rutas metabólicas implica métodos basados en la integración de las áreas de pico de los diferentes isotopólogos o basadas en regresión lineal múltiple en los cuales se tienen que llevar a cabo complejos cálculos matemáticos para la corrección natural del ^{13}C , mientras que en la biosíntesis de proteínas los cálculos implican complejos y tediosos procedimientos matemáticos que requieren el uso de ajustes polinómicos. Por lo tanto se requiere también el desarrollo de metodologías alternativas simples, novedosas, rápidas, exactas y precisas para el campo de la Metabólica en estudios basados en el empleo de compuestos enriquecidos isotópicamente.



RESUMEN (en Inglés)

The main aim of this Doctoral Thesis is the development of analytical methodologies based on the use of isotopically enriched compounds for their use in Clinical Chemistry and Metabolomics.

In Clinical Chemistry, isotope dilution-mass Spectrometry (ID-MS) is a widely analytical technique used for the certification of reference materials and in intercomparison exercises. IDMS is applied to organic analysis by using multiply labelled analogues in ^{13}C , ^2H , o ^{15}N and the analyte concentration is obtained from the construction of a methodological calibration graph. This precludes its application to routine analysis. Therefore, alternative procedures based on IDMS involving the removal of the calibration graph with the subsequent cost and time reduction is required for their application in a routine basis. In Metabolomics, the accurate measurement of mass isotopomer distributions is essential for the study of the regulation and understanding of metabolic pathways, such as protein turnover using isotopically labelled compounds. The measurement of mass isotopomer distribution analysis in the investigation of metabolic pathways is based on the integration of peak areas of the different isotopologues or based on multiple linear regression methods in which involves complex mathematical calculations for the correction of ^{13}C natural occurrence, while in protein turnover involves complex and tedious mathematical calculations which require the use of a polynomial equation.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA.

A. INTRODUCCIÓN	1
A.1. Naturaleza de los elementos: ISÓTOPOS	3
A.1.1. Isótopo: Concepto e historia	3
A.1.2. Isótopos radioactivos: Decaimiento radioactivo	5
A.1.3. Isótopos estables: Diagrama de Segré.....	6
A.1.4. Isótopos estables enriquecidos	7
A.1.4.1. Obtención de isótopos estables enriquecidos.....	8
A.1.4.2. Preparación de compuestos enriquecidos isotópicamente	10
A.2. Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (ID-MS)	11
A.2.1. Concepto de Análisis por dilución isotópica	11
A.2.2. Breve historia del Análisis por dilución isotópica	12
A.2.3. Ventajas del Análisis por dilución isotópica.....	13
A.2.4. Fuentes de error en el Análisis por dilución isotópica.....	14
A.2.5. La dilución isotópica en el análisis elemental y especiación.....	15
A.2.5.1. Ecuación de la dilución isotópica	16
A.2.5.2. Uso de trazadores isotópicos múltiples.....	18
A.2.6. La dilución isotópica en el análisis orgánico y bioquímico.....	21
A.2.6.1. Ecuación de la dilución isotópica orgánica: Calibrado lineal y no lineal	22
A.2.7. Aplicaciones de la dilución isotópica en el análisis clínico	23
A.2.7.1. Métodos de referencia basados en IDMS: Trazabilidad	24
A.2.7.2. Certificación de materiales de referencia mediante IDMS	25
A.2.7.3. Determinación de Creatinina en los laboratorios clínicos	27
A.2.7.3.1. Importancia del análisis de Creatinina.....	27
A.2.7.3.2. Análisis de creatinina en laboratorios clínicos: Método de Jaffé ..	29
A.2.7.3.3. Interferencia por bilirrubina en el método de Jaffé.....	30
A.2.7.3.4. Alternativas al método de Jaffe: Métodos enzimáticos	32
A.2.7.3.5. Alternativas al método de Jaffe: IDMS	34
A.2.7.3.6. Interconversión creatina-creatinina.....	35
A.3. Determinación de la composición isotópica en moléculas mediante espectrometría de masas	37
A.3.1. Cálculo de la composición isotópica teórica en moléculas de abundancia natural y en análogos enriquecidos: Distribución Binomial.	37
A.3.2. Determinación de la composición isotópica experimental en moléculas	38
A.3.3. Fuentes de ionización moleculares	39
A.3.3.1. Fuente de ionización electrónica (EI)	39
A.3.3.2. Fuente de electrospray (ESI).....	42
A.3.4. Analizadores de masas	44

A.3.4.1. Analizador de masas de tipo cuadrupolo (Q)	44
A.3.4.2. Analizador de masas de sector magnético.....	46
A.3.4.3. Analizadores de masas en tándem (MS/MS)	48
A.3.5. Detectores	50
A.3.5.1. Multiplicador de electrones	50
A.3.5.2. Copas de Faraday	52
A.3.6. Aplicaciones en Metabolómica	53
A.3.6.1. Trazadores isotópicos en la investigación de las rutas metabólicas	53
A.3.6.2. Experimento de marcaje con isótopos estables (¹³ C) en el estudio de las rutas metabólicas	55
A.3.6.2.1. Medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares mediante espectrometría de masas.	57
A.3.6.3. Trazadores isotópicos en el estudio de la biosíntesis de proteínas.....	58
B. OBJETIVOS	63
C. EXPERIMENTAL.....	67
C.1. INSTRUMENTACIÓN.....	69
C.1.1. GC-MS y GC-MS/MS	69
C.1.2. HPLC-ESI-MS/MS.....	70
C.1.3. GC-C-IR/MS	71
C.1.4. Analizador Roche Cobas C711.....	72
C.1.5. Otra instrumentación	73
C.2. Materiales y Reactivos.....	74
C.2.1. Patrones orgánicos de abundancia natural.....	74
C.2.2. Patrones orgánicos enriquecidos isotópicamente en ¹³ C	75
C.2.3. Muestras reales y Materiales de Referencia Certificados.....	76
C.2.4. Reactivos Generales	77
C.2.5. Material de laboratorio	77
C.3. PROCEDIMIENTOS	78
C.3.1. Regresión lineal múltiple.....	78
C.3.1.1. Determinación de la concentración de un compuesto mediante regresión lineal en espectrometría de masas orgánica.	79
C.3.1.2. Determinación de las posibles interconversión entre especies mediante el uso de trazadores isotópicos múltiples y regresión lineal múltiples.	83
C.3.1.3. Determinación de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares mediante regresión lineal múltiple.	87
C.3.1.4. Medida de la biosíntesis de proteínas mediante distribución binomial y regresión lineal múltiple.....	89
C.3.1.5. Determinación de las interferencias isobáricas de un compuesto en la fuente de ionización electrónica mediante regresión lineal múltiple	92

C.3.1.6. Determinación del enriquecimiento isotópico de un compuesto mediante regresión lineal múltiple.....	93
C.3.2. Medida de la composición isotópica mediante Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS).	95
C.3.3. Conversión de los resultados de fracciones molares obtenidos mediante regresión lineal múltiple en relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	97
C.3.4. Cálculo de la incertidumbre asociada a una medida mediante el método de Kragten.....	98
D. RESULTADOS.....	101
D.1. Desarrollo de una metodología para la determinación de creatinina en muestras de suero humano interferidas por bilirrubina mediante dilución isotópica y GC-EI-MS.....	103
D.1.1. Introducción	105
D.1.2. Objetivos	107
D.1.3. Artículo científico I.....	109
D.2. Determinación simultánea de creatina y creatinina en suero humano mediante HPLC-ESI-MS/MS utilizando doble trazador isotópico que permita corregir la posible interconversión Creatina-Creatinina.	137
D.2.1. Introducción	139
D.2.2. Objetivos	140
D.2.3. Artículo Científico II.....	143
D.3. Desarrollo y validación de un procedimiento de medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares en líneas celulares de cáncer de próstata mediante regresión lineal múltiple y GC-MS.	173
D.3.1. Introducción	175
D.3.2. Objetivos	176
D.3.3. Artículo Científico III	179
D.4. Desarrollo de una estrategia de cálculo novedosa, rápida y sencilla para MIDA basada en regresión lineal múltiple.....	223
D.4.1. Introducción	225
D.4.2. Objetivos	226
D.4.3. Artículo científico IV	227
E. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	253
F. CONCLUSIONES	277
G. TRABAJOS FUTUROS	283
H. FACTOR DE IMPACTO	287
H.1. Informe sobre el factor de impacto de las publicaciones presentadas	289
I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	291

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Aparato que condujo al descubrimiento de los isótopos por parte de Thomson.</i>	3
<i>Figura 2: Placa fotográfica en la que se observan las marcas para los isótopos ^{20}Ne y ^{22}Ne.</i>	4
<i>Figura 3: Espectro de masas obtenido por Aston para el cloro donde se observan los isótopos ^{35}Cl y ^{37}Cl.</i>	4
<i>Figura 4: Diagrama de Segré o carta de nucleidos, donde se representan los isótopos estables presentes en la naturaleza con $Z < 84$.</i>	7
<i>Figura 5: Sala de control de Calutrones durante el final de la Segunda Guerra mundial.</i>	9
<i>Figura 6: Ilustración de un análisis por dilución isotópica mediante un ejemplo con bolas blancas y negras.</i>	12
<i>Figura 7: Abundancias isotópicas de un elemento que contiene dos isótopos (a y b) en una muestra natural (abundancias naturales), en un trazador enriquecido isotópicamente en el isótopo b y en una mezcla de ambos.</i>	16
<i>Figura 8: Cromatograma conceptual para los compuestos A y B de un mismo elemento a los que se le ha añadido análogos enriquecidos (compuesto A enriquecido en el isótopo 2, y el compuesto B enriquecido en el isótopo 3). F1 indica la interconversión de B en A y F2 indica la interconversión de A en B.</i>	20
<i>Figura 9: Estructura química de la creatinina.</i>	27
<i>Figura 10: Complejo coloreado de Janovsky (VI) formado en la reacción de Jaffé.....</i>	29
<i>Figura 11: Estructura química de la bilirrubina.</i>	31
<i>Figura 12: Secuencia de reacciones del método enzimático basado en la enzima sarcoxina oxidasa para la determinación de creatinina.</i>	33
<i>Figura 13: Reacciones principal y auxiliar responsables de la determinación de creatinina mediante el método enzimático basado en la enzima creatinina iminohidrolasa.</i>	33
<i>Figura 14: Esquema de reacciones del método enzimático basado en la enzima creatininasasa para la determinación de creatinina.</i>	34
<i>Figura 15: Reacción reversible creatina-creatinina.</i>	36
<i>Figura 16: Esquema para el cálculo de las abundancias isotópicas de un compuesto o molécula mediante espectrometría de masas.</i>	38

<i>Figura 17: Diagrama de la fuente de ionización electrónica (EI)</i>	40
<i>Figura 18: Esquema de la fuente de electrospray (ESI) y acoplamiento al analizador de masas.</i>	43
<i>Figura 19: Ilustración del principio eléctrico de superposición de voltajes de corriente continua (DC) y radiofrecuencia (RF) en pares de varillas opuesta.</i>	45
<i>Figura 20: Diagrama esquemático de un analizador de masas de sector magnético.</i> ..	47
<i>Figura 21: Esquema de los modos de adquisición en espectrometría de masas en tándem (MS/MS).</i>	49
<i>Figura 22: Diagrama conceptual de un multiplicador de electrones de dinodo discreto.</i>	51
<i>Figura 23: Multiplicador de electrones de dinodo continuo</i>	52
<i>Figura 24: Diagrama esquemático de un detector de Copa de Faraday.</i>	53
<i>Figura 25: Protocolo del experimento de marcaje con ¹³C (“¹³C-fingerprint”) en la investigación de rutas metabólicas.</i>	57
<i>Figura 26: Portada del libro que recoge los estudios de Schoenheimer editada por sus colaboradores poco después de su prematura muerte.</i>	59
<i>Figura 27: Ilustración del principio del MIDA (“mass isotopomer distribution analysis”). A) Proteína formada y su espectro de masas correspondiente cuando el pool precursor está formado por subunidades de abundancia natural. B) Diferentes especies de proteína formada con 0, 1, 2....subunidades marcadas cuando tenemos un 10% de enriquecimiento en el pool precursor, donde la probabilidad de encontrar cada una de ellas vendrá dada por la distribución binomial de probabilidades. Se observa como el espectro de masas de la proteína se modifica respecto al espectro de masas de la proteína de abundancia natural.</i>	62
<i>Figura 28: Esquema del equipo GC-MS de tipo cuadrupolo que consta de un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N y un espectrómetro de masas modelo Agilent 5975B.</i>	69
<i>Figura 29: Esquema de la fuente de ionización de electrospray con tecnología “jet stream”.</i>	70
<i>Figura 30: Diagrama esquemático del analizador de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460.</i>	71
<i>Figura 31: Esquema del equipo GC-C-IRMS (Thermo) utilizado en esta Tesis Doctoral.</i>	72
<i>Figura 32: Analizador de masas de sector magnético Delta V que permite medir las relaciones isotópicas con alta sensibilidad y linealidad.</i>	72

<i>Figura 33: Vista superior del módulo Cobas C701 utilizado para llevar a cabo los análisis fotométricos de creatinina realizados en esta Tesis Doctoral.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 34: Ilustración del concepto de regresión lineal múltiple para una mezcla de compuestos A y B.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 35: Ejemplo de la aplicación de los cálculos basados en regresión lineal múltiple en Excel.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 36: Probabilidad de encontrar (i) subunidades de Leucina marcadas en el péptido SVVLLLR en función del enriquecimiento en el pool precursor (p).....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 37: Determinación del enriquecimiento isotópico en la ¹³C₆-Glucosa mediante regresión lineal múltiple.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 38: Medida de la composición isotópica de un compuesto en modo SRM utilizando resolución de 0.7 FWHM en el primer cuadrupolo.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 39: Medida de la composición isotópica de un compuesto en modo SRM modificando la resolución del primer cuadrupolo a 11 FWHM.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 40: Hoja de cálculo de Microsoft Excel para el cálculo de la incertidumbre combinada de un resultado según el método de Kragten.</i>	<i>100</i>
<i>Figura 41: Espectro de masas de la Creatinina derivatizada en el que se pueden observar los dos clusters principales objeto de estudio.....</i>	<i>256</i>
<i>Figura 42: A) Diagrama Bland-Altman en el que se muestra la diferencia relativa entre la metodología desarrollada basada en GC-IDMS y el método de Jaffé en muestras interferidas por bilirrubina. B) Diagrama Bland-Altman en el que se muestra la diferencia relativa entre la metodología desarrollada basada en GC-IDMS y el método enzimático en muestras interferidas por bilirrubina. En ambas figuras la desviación media y los correspondientes intervalos al 95 % de confianza se representan con líneas punteadas.</i>	<i>259</i>
<i>Figura 43: Diagrama que describe el protocolo utilizado para la evaluación de la interconversión durante el procedimiento de muestra mediante LC-MS/MS y GC-MS y durante el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) requerido en los procedimientos basados en GC-MS.</i>	<i>262</i>
<i>Figura 44: Comparación de las fracciones molares teóricas con las fracciones molares calculadas experimentalmente con la metodología desarrollada en mezclas de A) Glicina natural y Glicina-2-¹³C y B) Glicina natural y Glicina-¹³C₂.....</i>	<i>270</i>
<i>Figura 45: Comparación de los resultados obtenidos mediante GC-MS y GC-C-IRMS en función de la relación ¹³C/¹²C.</i>	<i>271</i>
<i>Figura 46: Cromatograma y espectro de masas en modo SCAN del péptido RGGGLK sintetizado a partir de Glicina natural.....</i>	<i>274</i>

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Principales series de decaimiento descubiertas por Nier en 1936.</i>	5
<i>Tabla 2: Métodos de referencia basados en IDMS para diferentes biomarcadores en suero humano.</i>	25
<i>Tabla 3: Ejercicios de intercomparación desarrollados en el ámbito de la Química Clínica en los que se ha empleado el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas como método primario de análisis.</i>	27
<i>Tabla 4: Comparación de las abundancias teóricas y experimentales obtenidas en la fuente de ionización electrónica EI por Moraes y colaboradores para los dos clúster principales del diclorometano.</i>	42
<i>Tabla 5: Determinación de la contribución de la masa M en las masas M-1 y M+1 de la PFTBA usando un equipo GC-MS y la comparación de la contribución experimental en M+1 con los valores teóricos asumiendo solo la contribución natural de ¹³C en la molécula.</i>	46
<i>Tabla 6: Comparación del valor certificado de creatinina (mg/dL) en los sueros control liofilizados: Precinorm, Precipath and Calibrator CREJ2 y en los materiales de referencia certificados: ERM-DA252a and ERM-DA253a (suero humano congelado) con los valores experimentales de creatina y creatinina obtenidos mediante doble trazador isotópico y LC-MS/MS (in mg/dL). Se muestran también los factores de interconversión F1 (%creatina-creatinina) y F2 (%creatinina-creatina.</i>	261
<i>Tabla 7: Pureza espectral de los clúster objeto de estudio para los diferentes metabolitos intracelulares en la fuente de ionización electrónica (EI).</i>	266
<i>Tabla 8: Comparación de las fracciones molares teóricas con las fracciones molares calculadas experimentalmente con la metodología desarrollada en mezclas de Glucosa natural y Glucosa 2-¹³C y en mezclas de Glucosa natural y Glucosa-¹³C₆.</i>	269
<i>Tabla 9: Parámetros de la biosíntesis de proteínas para los cuatro péptidos RGGGLK sintetizados in vitro a partir de diferentes enriquecimientos de ¹³C₂-Glicina.</i>	275
<i>Tabla 10: Parámetros de la biosíntesis de proteínas obtenidos en la simulación in vivo utilizando diferentes mezclas de péptido RGGGLK de abundancia natural y péptido RGGGLK sintetizado a partir 10 % o 20% ¹³C₂-Glicina.</i>	276

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Naturaleza de los elementos: ISÓTOPOS

A.1.1. Isótopo: Concepto e historia

Se conoce con el término *isótopo*, a las diferentes formas de un átomo que contienen el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones. Su descubrimiento se remonta a principios del siglo XX y se atribuye al científico británico Joseph John Thomson. El trabajo de Thomson estaba basado en los estudios previos desarrollados por Goldstein en 1886^{1,2}, el cual descubrió iones positivos en un tubo de descarga de baja presión, y por Wien en 1898³, quién mostró que un haz de estos iones podría ser deflectado mediante el empleo de campos eléctricos y magnéticos. La primera evidencia de la existencia de isótopos fue publicada por JJ Thomson en 1913^{4,5} cuando introdujo, en un tubo de los empleados para determinar la relación masa-carga de iones, una pequeña cantidad de gas neón y lo atacó con un haz de electrones emitidos desde un cátodo (Figura 1).

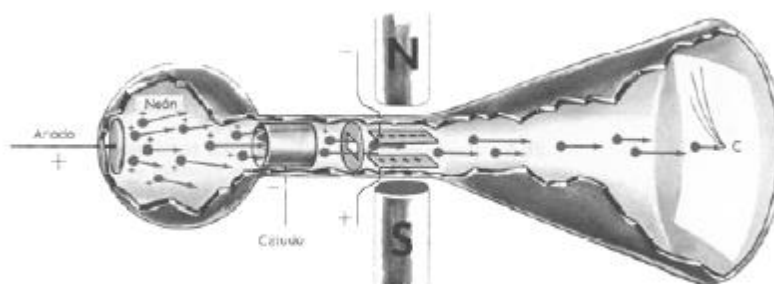


Figura 1: Aparato que condujo al descubrimiento de los isótopos por parte de Thomson⁶.

Los electrones al colisionar con los átomos de Ne eran capaces de extraer algunos de los electrones externos del neón, produciendo así una cierta cantidad de iones Ne^+ . Los iones formados se aceleraban dentro del tubo con un campo magnético orientado de modo perpendicular a su trayectoria. Como consecuencia del proceso, se obtenía el haz de rayos canales, una corriente de iones positivos con un amplio intervalo de velocidades que frente a una pantalla registradora dejaban una señal en forma de línea parabólica. Al medir la masa de las partículas que componían esos rayos, Thompson esperaba confirmar el valor del peso atómico del neón, que se sabía era 20.182. Sin embargo, solo obtuvo un valor de masa 20.0, considerablemente inferior a lo esperado. La discrepancia quedó explicada al observar que el haz desviado no era único, sino que

se dividía en dos ramas: la principal, que suponía más del 90.5% de los iones y otra, más débil, que correspondía a masa 22.0 y contenía el 9.2% (Figura 2). Thomson había encontrado así dos clases de átomos de neón de idéntica naturaleza química e iguales espectros ópticos, pero de distinta masa. Además, los valores de las masas eran casi exactamente números enteros. El neón ordinario era entonces realmente una mezcla de dos neones distintos, y el peso atómico era justamente el promedio de esta mezcla.

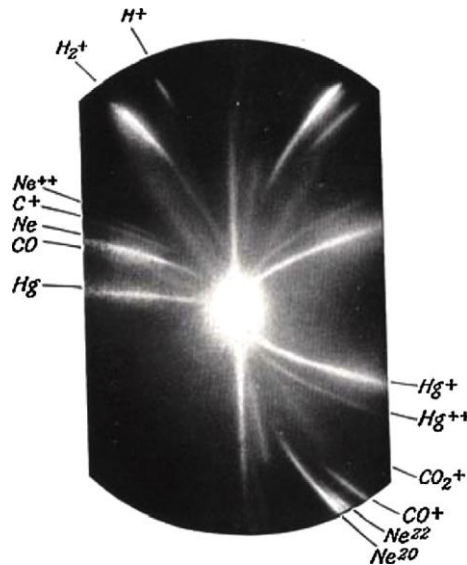


Figura 2: Placa fotográfica en la que se observan las marcas para los isótopos ^{20}Ne y ^{22}Ne ¹.

El término *isótopo*, que en griego significa “mismo lugar” fue asignado por Soddy⁷ en 1913, y se refiere al hecho de que todos los neones de diferente peso atómico ocupan la misma posición en la tabla de los elementos. El aparato original de Thomson fue mejorado por Aston^{8,9}, discípulo de Thomson, consiguiendo entre 1913 y 1919 resolver trayectorias de iones con diferencias de masa inferiores al 10% (la que representan el $^{22}Ne/^{20}Ne$). Por ello, en 1922 se le concedió el premio Nobel a Aston, que en 1924 ya había logrado caracterizar las abundancias isotópicas de más de 50 elementos, incluyendo el descubrimiento de que el cloro estaba formado por una mezcla de isótopos de masas 35 y 37 (Figura 3) con una abundancia de relativa de 0.758 y 0.292, respectivamente.



Figura 3: Espectro de masas obtenido por Aston para el cloro donde se observan los isótopos ^{35}Cl y ^{37}Cl ¹.

Estudios posteriores demostraron que una gran cantidad de los elementos se componen de una mezcla de varios isótopos, de manera que en la naturaleza no solo están presentes 90 elementos, sino sus correspondientes 1300 isótopos conocidos. De esta manera, el mundo no solo está estructurado según su apariencia química, sino también según su faceta isotópica. Por lo tanto, muchas de las sustancias presentes en la naturaleza presentan una huella isotópica propia⁶.

A.1.2. Isótopos radioactivos: Decaimiento radioactivo

Las teorías de formación de los elementos indican que, cuando los elementos se formaron durante la creación del universo, principalmente en el interior de las estrellas¹⁰, además de los isótopos estables (la mayoría en la naturaleza) se formaron muchos isótopos radioactivos. La mayoría de ellos tienen una vida media mucho menor que el tiempo de existencia de la tierra ($\sim 4.5 \times 10^9$ años) y por lo tanto han decaído ya a isótopos estables. Sin embargo, hay otros que poseen una vida media muy larga y no han decaído completamente¹¹, formando lo que se conoce como “series de decaimiento”. Existen tres series de decaimiento principales (Tabla 1), las cuales fueron descubiertas por Nier^{12,13} en 1936, el cual observó como el ^{207}Pb y ^{206}Pb eran producidos por el decaimiento radiactivo del ^{235}U y ^{238}U ; mientras que el ^{208}Pb procedía del ^{232}Th , ambos debido a una serie de desintegraciones alfa y beta.

Tabla 1: Principales series de decaimiento descubiertas por Nier en 1936.

Isótopo radioactivo	Isótopo estable	Vida media	Nombre de la serie
^{235}U	^{207}Pb	7.0×10^8 años	Serie del actinio
^{238}U	^{206}Pb	4.5×10^9 años	Serie del Uranio
^{232}Th	^{208}Pb	1.4×10^{10} años	Serie del Torio

Esto da lugar a que la composición isotópica de plomo no sea constante en la naturaleza y que dicha composición dependa de la fuente del mineral. Estas variaciones naturales en la composición isotópica de plomo han encontrado numerosas aplicaciones en arqueometría, concretamente en geocronología, en estudios basados en la comparativa de relaciones isotópicas de plomo en artefactos y minerales metálicos, donde los primeros estudios fueron realizados en los años 60. Desde ese momento, la aplicación de esta metodología se extendió a una gran variedad de muestras analizadas, entre las

que se encuentran obsidias, monedas, lingotes, pigmentos, bronce, etc¹⁴. Además de estas aplicaciones, también existen numerosos estudios medioambientales basados en la medida de las relaciones isotópicas de plomo presentes en el medio ambiente, con el objetivo de asignar las fuentes de contaminación ambiental¹⁵.

Otra importante serie de decaimiento de un isótopo de vida media muy larga ($\sim 4.88 \times 10^{10}$), es el decaimiento de ⁸⁷Rb a ⁸⁷Sr. El sistema Rb-Sr ha sido ampliamente utilizado en arqueometría, tanto en la determinación de la edad de un determinado sistema geológico terrestre o extraterrestre¹⁰, como en estudios de la movilidad humana en la antigüedad a través de la medida de las relaciones isotópicas de estroncio en los huesos y en el esmalte dental de los humanos¹⁶. Otro campo donde la medida de relaciones isotópicas de estroncio ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad, es en estudios de autenticación de alimentos, en productos tales como vino¹⁷, queso¹⁸ o sidra¹⁹, entre otros.

A.1.3. Isótopos estables: Diagrama de Segré

Se entiende por núcleo estable aquel que no experimenta transmutaciones radiactivas espontáneamente, es decir, que no se desintegra en otro transcurrido un cierto periodo de tiempo. Desde el hidrógeno con número atómico $Z=1$, hasta el bismuto con número atómico $Z=83$ existen aproximadamente 300 isótopos estables, no existiendo a partir de $Z>83$ ningún núcleo estable. La representación de cómo se distribuyen los isótopos estables en los diferentes elementos (Figura 4) recibe el nombre de diagrama de Segré o carta de nucleidos²⁰ y fue propuesto por primera vez por E. Segré en 1945. En él, cada núcleo se localiza mediante sus valores de N (número de neutrones) y Z (número atómico), representando los núcleos estables mediante puntos negros, y con una línea punteada la posición en la que $N=Z$. Como se puede observar en la Figura 4, en los elementos con número atómico $Z<20$, los núcleos estables están constituidos generalmente por el mismo número de protones y de neutrones, y que el número de neutrones excede cada vez más el de protones conforme va aumentando el número atómico. Un ejemplo es el mercurio ($Z=80$), que requiere aproximadamente 1,5 neutrones por cada protón para formar un núcleo estable. Esto es debido, a que a medida que Z aumenta la repulsión de Coulomb se hace más grande, siendo energéticamente más favorable situar un exceso de nucleones en los niveles de los neutrones.

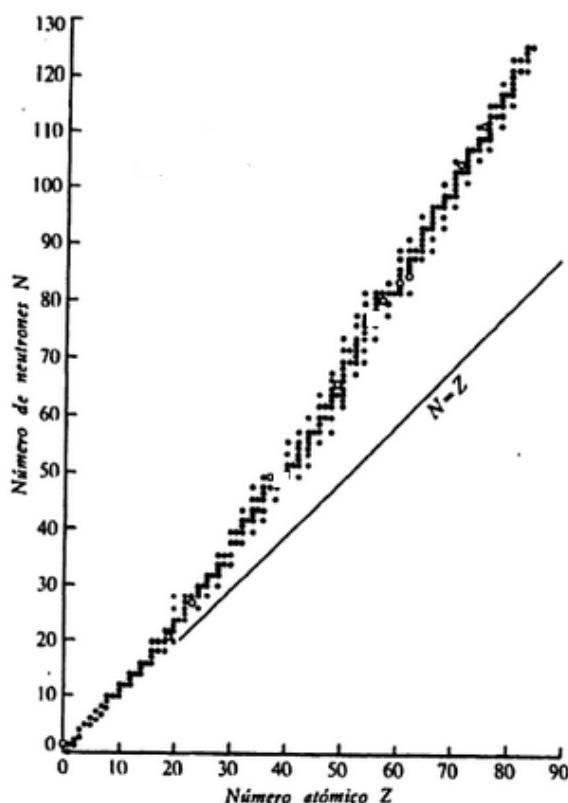


Figura 4: Diagrama de Segré o carta de nucleidos, donde se representan los isótopos estables presentes en la naturaleza con $Z < 84$ ²¹.

Por lo tanto, para los 81 elementos existentes en la naturaleza entre el hidrógeno y el Bismuto hay 281 isótopos estables con masas desde 1 (^1H) hasta 209 (^{209}Bi), donde los elementos con número atómico impar poseen menos isótopos estables que los elementos con número atómico par. Como existen más isótopos que posibles masas, alguno de esos isótopos poseen la misma masa nominal como es el caso del ^{54}Cr y ^{54}Fe . A estos isótopos se les conoce con el nombre de isótopos isobáricos y se tienen que tener en cuenta cuando se estudia la composición isotópica de los elementos por espectrometría de masas, teniendo que realizar en algunos casos una separación química de los elementos que contienen isótopos isobáricos para poder estudiar su composición isotópica sin interferencias.

A.1.4. Isótopos estables enriquecidos

Actualmente, teniendo en cuenta las diferentes propiedades físicas y también termodinámicas de los isótopos, es posible modificar la composición isotópica natural de los elementos. Para obtener un elemento enriquecido isotópicamente es necesario llevar a cabo una separación de sus isótopos. El ^2H y el ^1H fueron los primeros isótopos

separados por H.Urey²² en 1932, por lo cual recibió el Premio Nobel en el año 1934. Sin embargo, no fue hasta comienzos de los años 40, con el estallido de la Segunda Guerra Mundial, cuando comienza el auge de los métodos de separación de isótopos destacando la separación de los isótopos de uranio²³. En el marco del proyecto Manhattan, Estados Unidos se centró en la producción de ²³⁵U para el desarrollo de propulsión nuclear sin límites en los submarinos. Pero paralelamente, otro de los objetivos por los que se trabajaba con más énfasis era el uso del ²³⁵U enriquecido para la fabricación de la primera bomba atómica.

A.1.4.1. Obtención de isótopos estables enriquecidos

Existen varios métodos para la separación de isótopos que se pueden clasificar en cuatro grandes categorías: los basados directamente en diferencias en el peso atómico del isótopo (separación electromagnética, difusión gaseosa y centrifugación gaseosa), los basados en diferentes velocidades de difusión debido a su peso atómico (difusión térmica), los basados en la diferencia en las propiedades termodinámicas (destilación criogénica) y los basados en diferencias en la cinética cualitativa de los isótopos (electrólisis, ionización inducida por láser). Las dos primeras categorías son más eficientes en la separación de isótopos de elementos pesados, mientras que las dos últimas son más adecuadas para la separación de isótopos de elementos ligeros. La mayoría de estos procesos, exceptuando la separación electromagnética, están basados en varias etapas consecutivas de enriquecimiento, donde el resultado final será que nuestro elemento de interés se separa en dos fracciones, una enriquecida en el isótopo ligero y otra en el isótopo pesado.

La **separación electromagnética**^{23,24} fue desarrollada por primera vez por Ernest O. Lawrence en la Universidad de California, dentro del proyecto Manhattan para la obtención de ²³⁵U enriquecido, justo un día antes que Japón atacara a los Estados Unidos en Pearl Harbor (7 de Diciembre de 1941). La separación está basada, en que las partículas cargadas se deflecan en un campo magnético y el ángulo de deflexión depende de su relación masa-carga. Se lleva a cabo en un instrumento al que Lawrence puso el nombre de Calutron (Figura 5): donde *Cal* se refiere a California; *u* a Universidad y *tron* a Cyclotron. La producción de gran cantidad de isótopos enriquecidos de elementos pesados se realiza utilizando Calutrones.



Figura 5: Sala de control de Calutrones durante el final de la Segunda Guerra mundial²³.

La **difusión gaseosa**²⁵ fue desarrollada durante la Segunda Guerra Mundial también dentro del proyecto Manhattan. Está basada en que, bajo equilibrio térmico, dos isótopos con la misma energía cinética poseen diferente velocidad. De este modo, los isótopos ligeros se moverán más rápido que los isótopos pesados, por lo que su difusión a través de una membrana permeable producirá un gas enriquecido en el isótopo ligero. Para conseguir un alto rendimiento en el enriquecimiento isotópico, es necesario una gran infraestructura y varias etapas consecutivas.

La **centrifugación gaseosa**^{26,27} fue demostrada por primera vez por Beams y Haynes en el año 1936 para la separación de los isótopos de cloro. Actualmente es la técnica más utilizada para la separación de isótopos de uranio. Para llevar a cabo la separación se utiliza una gran cantidad de cilindros rotativos en formaciones en paralelo y en serie. Esta rotación da lugar a una fuerza centrífuga muy fuerte, de tal modo que el isótopo más pesado se desplaza y es recogido en la parte exterior del cilindro, mientras que el isótopo ligero se recoge en la zona centro. La principal ventaja de esta técnica es que requiere menor energía y tiene una mayor eficiencia de enriquecimiento que la difusión gaseosa.

La **difusión térmica**^{28,29} fue utilizada por primera vez para llevar a cabo la separación de isótopos por Clusius y Dickel en 1938. Consiste en que un gradiente de temperatura en una mezcla de dos gases, da lugar a un gradiente relativo de concentraciones de los constituyentes de la mezcla. El isótopo pesado se va concentrando en la zona fría,

mientras que el isótopo ligero se acumula en la zona caliente. Se utiliza principalmente en la separación de isótopos de los gases nobles.

La **destilación criogénica**^{30,31} fue desarrollada para el enriquecimiento en ^{13}C por McIneer en el Laboratorio Internacional de los Álamos en 1980. Está basada en que cuando los gases son licuados en largas columnas de fraccionamiento, los isótopos pesados se hunden al fondo de la columna, mientras los ligeros van a la parte superior. Calentando, a continuación, el fondo de la columna da lugar a una fracción altamente enriquecida. Es el único método económico a escala industrial para la producción de ^{13}C . La **electrólisis**^{32,33,34} para la separación de isótopos tiene un interés histórico, ya que fue el primer método utilizado para separar deuterio prácticamente puro. Está basada en que cuando el agua sufre una electrólisis, el isótopo más ligero del hidrógeno tiende a salir antes, dejando atrás un residuo de agua enriquecida con el isótopo más pesado.

La **separación inducida por láser**^{35,36,37} surgió en los años 60 con la invención del láser. La separación está basada en que al vaporizar un elemento, sus átomos pueden ser excitados e ionizados selectivamente para separar el isótopo deseado. Este tipo de separación tiene una gran eficiencia de enriquecimiento con unos costes bastante reducidos.

A.1.4.2. Preparación de compuestos enriquecidos isotópicamente

Una vez que se ha obtenido el elemento enriquecido en el isótopo estable deseado, se puede llevar a cabo la síntesis de diferentes compuestos enriquecidos isotópicamente en uno o varios de sus átomos. La gran mayoría de los compuestos sintetizados se encuentran enriquecidos en ^2H , ^{13}C y ^{15}N . La síntesis de compuestos enriquecidos en ^2H es sencilla, sin embargo, es más frecuente el uso de compuestos enriquecidos en ^{13}C o ^{15}N debido a que son compuestos más estables. Existen actualmente gran variedad de compuestos enriquecidos en ^2H , ^{13}C y ^{15}N entre los que podemos destacar: aminoácidos^{38,39}, proteínas⁴⁰, compuestos de interés metabólico⁴¹, contaminantes ambientales⁴² y compuestos utilizados para la detección de dopaje^{43,44}. Además, en la última década también se ha desarrollado la síntesis de compuestos enriquecidos en heteroátomos^{45,46,47}, como son el ^{37}Cl , ^{81}Br y ^{34}S .

Todos ellos son actualmente utilizados como trazadores isotópicos en multitud de metodologías basadas en dilución isotópica y espectrometría de masas en numerosos campos de aplicación, siendo los más importantes el análisis clínico, metabólico y medioambiental.

A.2. Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (ID-MS)

A.2.1. Concepto de Análisis por dilución isotópica

El análisis por dilución isotópica se basa en la modificación de la composición isotópica de un elemento o un compuesto en una muestra mediante la adición de una cantidad conocida de ese mismo elemento o compuesto enriquecido isotópicamente, que denominaremos trazador. El concepto del análisis por dilución isotópica se puede explicar con un ejemplo sencillo como es la determinación del número de bolas blancas que hay en una bolsa. Aunque lo más sencillo sería contarlos, éste proceso llevaría mucho tiempo y se podrían cometer muchos errores. Además, en el caso de que se quisiese calcular la incertidumbre del resultado final, el proceso se debería realizar varias veces, aumentando considerablemente el tiempo de conteo.

La mejor opción es recurrir a un proceso de "dilución isotópica" en donde disponemos de bolsitas que contienen un número conocido de bolas negras cada una. La única diferencia entre las bolas blancas y negras es el color, por lo que podemos aplicar el concepto de dilución isotópica para saber la cantidad de bolas blancas que tenemos en la bolsa. Para ello, se añade un número conocido de bolas negras a la bolsa de bolas blancas. Una vez que el contenido está completamente homogenizado, podemos coger un puñado de la mezcla en la que, contando el número de bolas blancas (W) y negras (B), obtenemos la relación que se muestra en la Figura 6. El número total de bolas blancas (N_w) se puede determinar a partir de la relación entre bolas blancas y negras y la cantidad conocida de bolas negras añadida inicialmente usando la ecuación [1].

$$N_w = N_B \frac{W}{B} \quad [1]$$

Este tipo de experimentos, conocido como métodos de captura-recaptura fueron utilizados por primera vez en 1895 en estudios ecológicos por C. G. J. Petersen⁴⁸ para estimar poblaciones de pez Solla. Estos experimentos consisten en capturar un grupo de individuos, marcarlos, y devolverlos al ecosistema. Después de un tiempo, se lleva a cabo una segunda captura de un grupo de individuos, y se lleva a cabo el recuento de peces marcados y no marcados. A partir de esta proporción, se podrá estimar la población del pez Solla en el ecosistema. En este tipo de experimentos se necesita que el ecosistema sea cerrado, de manera que la probabilidad de recapturar un animal sea la misma que la de la primera captura.

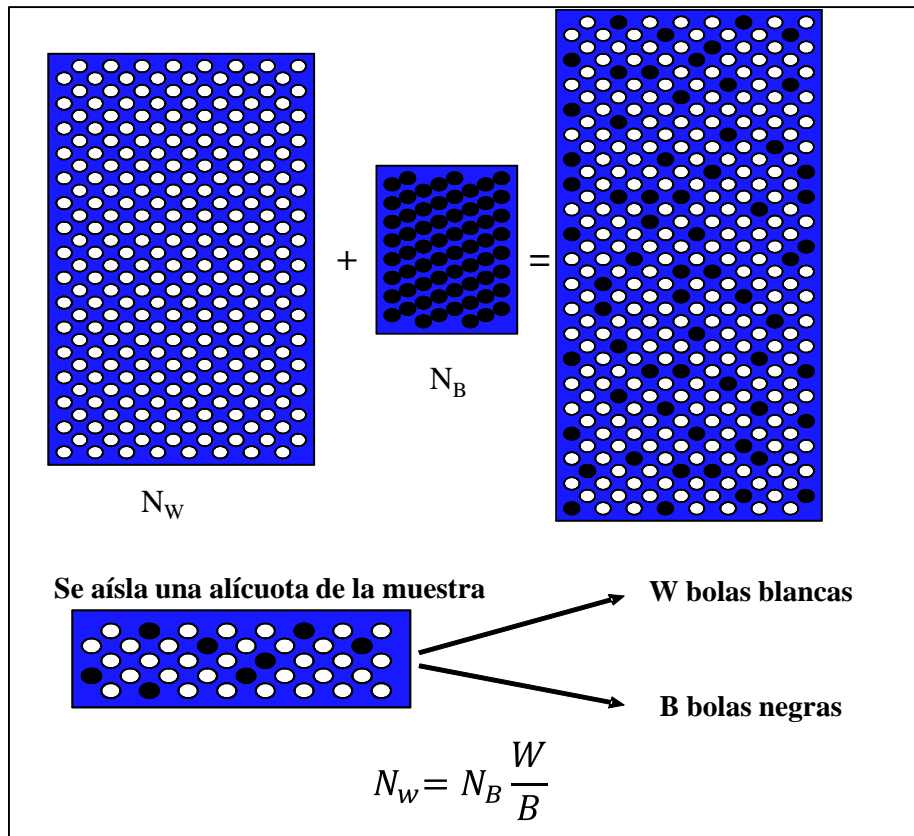


Figura 6: Ilustración de un análisis por dilución isotópica mediante un ejemplo con bolas blancas y negras.

A.2.2. Breve historia del Análisis por dilución isotópica

El concepto de dilución isotópica en análisis químico fue desarrollado inicialmente en 1913 por Havesy y Paneth en la determinación de la solubilidad del sulfuro de plomo en aguas, para lo cual emplearon isótopos radiactivos de plomo como trazadores⁴⁹. La primera publicación de dilución isotópica con isótopos radioactivos fue en el año 1931 por Havesy y Hobie⁵⁰, los cuales en el año 1935 utilizaron por primera vez el ^{32}P como trazador en sistemas biológicos⁵¹. Por todos estos estudios el profesor Havesy fue galardonado en 1943 con el Premio Nobel de Química.

En combinación con la espectrometría de masas, los primeros estudios utilizando isótopos estables enriquecidos datan de 1939-1940, en donde se emplearon aminoácidos y ácidos grasos enriquecidos en ^{15}N o ^2H ⁵². En años posteriores se popularizó el uso del ^{13}C y el ^{18}O como trazadores isotópicos en el análisis por dilución isotópica de compuestos de interés biológico, y en el estudio de intermediarios metabólicos en organismos vivos. Los primeros trabajos dentro del análisis por dilución isotópica en el campo elemental sufrieron un gran auge a finales de los años 40 y comienzo de los 50.

Su principal aplicación fue principalmente la determinación de elementos procedentes de procesos de decaimiento radiactivo o en la determinación de rendimientos absolutos de fusión, utilizando mayoritariamente ionización térmica acoplada a espectrometría de masas (TIMS) debido a que con esta técnica se obtenían muy buenos resultados en la medida de relaciones isotópicas⁵³.

Durante los años 70 y 80, se generalizó la aplicación del análisis por dilución isotópica al análisis de compuestos orgánicos en el campo del análisis clínico y toxicológico⁵⁴. Esto se debió fundamentalmente a la popularización de nuevos espectrómetros de masas acopladas a técnicas cromatográficas (en especial GC-MS) y a la mayor disponibilidad de compuestos marcados en ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O debido a que comenzó su preparación a larga escala. Ya durante los años 80-90 se popularizó el empleo del plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrometría de masas (ICP-MS)⁵⁵ en el análisis por dilución isotópica elemental, consiguiendo niveles de precisión parecidos a los obtenidos con el TIMS⁵⁶. Además debido a la posibilidad de acoplamiento con técnicas cromatográficas (HPLC y GC) se desarrollaron aplicaciones en el campo de la especiación elemental. Durante la última década, se ha generalizado el uso de la dilución isotópica acoplada a espectrometría de masas en el ámbito de la proteómica, para la medida de concentraciones de proteínas utilizando péptidos marcados⁵⁷. Este campo de aplicación está creciendo exponencialmente y son cada vez más las aplicaciones de la dilución isotópica en proteómica.

Hoy en día, debido a que la dilución isotópica es, como se explicará más adelante, un método primario de análisis, se utiliza ampliamente en el desarrollo de métodos de referencia en análisis clínicos, los cuales nos permiten asegurar la trazabilidad de los resultados ofrecidos por los diferentes laboratorios, además de en la certificación de materiales de referencia⁵⁸.

A.2.3. Ventajas del Análisis por dilución isotópica

La principal ventaja que presenta la dilución isotópica frente a otros métodos de análisis es que ha sido reconocido como método primario de análisis por el Comité Consultivo para la Cantidad de Materia (CCQM)⁵⁹. Por lo tanto, la dilución isotópica proporciona resultados analíticos con la más alta calidad metrológica siendo aceptados sin necesidad de realizar un calibrado metodológico.

Otras ventajas que presenta la dilución isotópica⁶⁰, siempre y cuando se asegure un equilibrio isotópico o mezcla completa del trazador y del analito se detallan a continuación:

- Cualquier pérdida de sustancia durante los diferentes procesos de tratamiento de muestra (digestión, extracción, preconcentración, separación, etc...) no afectará al resultado final, debido a que la relación isotópica analito/trazador se mantendrá constante a lo largo de todo el proceso.
- Cualquier cambio en la sensibilidad instrumental, debido a efectos de matriz o deriva de la señal, serán corregidos y no afectarán al resultado final.
- La incertidumbre del resultado final, únicamente dependerá de la incertidumbre de la relación isotópica analito/trazador medida. Por lo tanto, la exactitud y la precisión del método van a depender exclusivamente de la exactitud y precisión de la relación isotópica medida, la cual se puede medir de manera muy precisa mediante espectrometría de masas.

A.2.4. Fuentes de error en el Análisis por dilución isotópica

Para que se puedan cumplir las ventajas anteriormente citadas, se deben de tener en cuenta una serie de factores que podrían dar lugar a errores en la determinación del analito⁶⁰:

- No se deben de producir pérdidas de analito antes de que tenga lugar el equilibrio isotópico. Esto es importante en muestras sólidas cuando el trazador es añadido en disolución, debido a que es posible que la digestión de la muestra o la extracción del compuesto de interés de la misma sean incompletas, dando lugar a una pérdida de analito antes de que se produzca el equilibrio isotópico.
- Una vez que el equilibrio isotópico se alcanza, el trazador añadido a la muestra y el analito deben de comportarse de manera idéntica durante todo el proceso analítico.
- La medida de la relación isotópica analito/trazador mediante espectrometría de masas debe de realizarse en ausencia de interferencias espectrales y además, se deben controlar todos los factores que afectan a la exactitud de la medida de la relación isotópica (tiempo muerto del detector y discriminación de masa).
- Por último, debe de realizarse un exhaustivo control de blancos, debido a que cualquier tipo de contaminación presente en la muestra puede dar lugar a una medida errónea de la relación isotópica.

A.2.5. La dilución isotópica en el análisis elemental y especiación

El análisis por dilución isotópica elemental⁶⁰ está basado en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas de un elemento endógeno presente en la muestra mediante la adición de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido de ese elemento (trazador). El elemento que se quiere analizar debe de tener al menos dos isótopos estables, que se puedan medir libres de interferencias espectrales mediante espectrometría de masas.

Este principio se ilustra en la Figura 7 para un elemento que posee dos isótopos diferentes **a** y **b**. Como se puede observar el isótopo **a** es el más abundante en la muestra, mientras que el trazador está enriquecido isotópicamente en el isótopo **b**. Por lo tanto, las abundancias isotópicas en la mezcla de ambos serán intermedias entre las de la muestra y el trazador y dependerán de la cantidad de trazador añadido y de la cantidad de elemento en la muestra

Cuando se quiere determinar la cantidad total de un elemento en la muestra donde el trazador es un isótopo enriquecido de ese elemento, el cual se añade a la muestra al principio del análisis. Sin embargo, cuando se quiere determinar una forma fisicoquímica del elemento es necesaria una separación previa de las especies que se quiere determinar antes de su determinación mediante espectrometría de masas. En el análisis de especiación elemental se utilizan técnicas híbridas, basadas en el acoplamiento de una técnica de separación a un detector sensible y específico del elemento a determinar⁶¹. La selección de una técnica de separación adecuada es muy importante y dependerá de la naturaleza de la muestra y de las especies que se quieren determinar. Las más utilizadas son técnicas cromatográficas (HPLC y GC) o la electroforesis capilar (CE) acopladas a ICP-MS dado su alta sensibilidad y su capacidad de análisis multielemental.

Dependiendo de cuándo y en qué forma química se añade el trazador isotópico a la muestra, el análisis para especiación elemental se lleva a cabo de dos modos diferentes: *modo inespecífico* y el *modo específico*.

- En el modo inespecífico, la adición del trazador isotópico se lleva a cabo después de la separación de las especies que se quieren determinar y anteriormente al proceso de ionización, donde el trazador isotópico presenta una forma diferente al analito. Este modo de análisis se aplica cuando no se conoce exactamente la estructura química de la especie a analizar o cuando no se dispone comercialmente ni se pueden sintetizar los

correspondientes patrones enriquecidos isotópicamente. El principal inconveniente que presenta este modo es que no se corrigen las posibles pérdidas de muestra antes de la separación cromatográfica y además solo se puede aplicar cuando la eficiencia de ionización del elemento a determinar es independiente de la forma química en la que se encuentra⁶².

-El modo específico requiere que la disolución de trazador contenga exactamente las mismas especies que se quieren determinar enriquecidas isotópicamente en uno de sus heteroátomos. En este modo, al contrario que en el modo inespecífico, la estructura química de las especies que se quieren determinar tiene que ser conocida exactamente, para sintetizar las correspondientes especies enriquecidas isotópicamente o adquirir la correspondiente disolución comercial de trazador. La disolución de trazador es añadida al comienzo del análisis, y una vez que se alcanza el equilibrio isotópico, este modo de análisis presentará todas las ventajas del análisis por dilución isotópica descritas anteriormente.

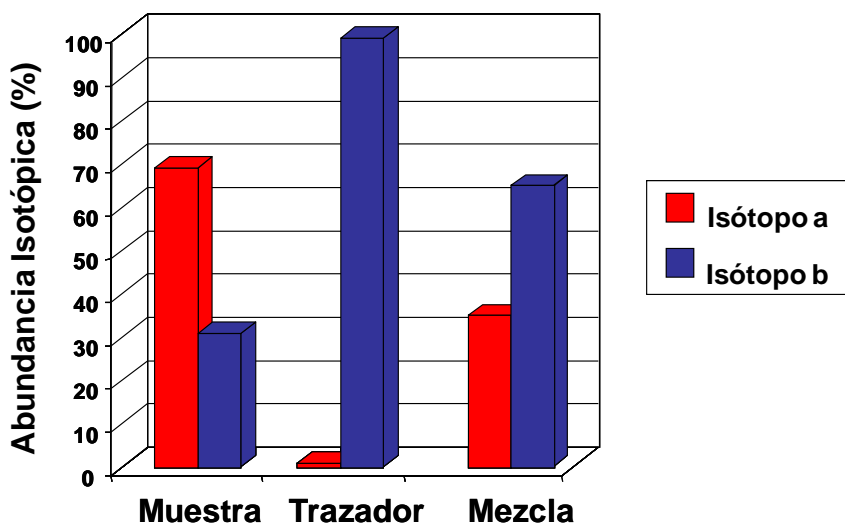


Figura 7: Abundancias isotópicas de un elemento que contiene dos isótopos (a y b) en una muestra natural (abundancias naturales), en un trazador enriquecido isotópicamente en el isótopo b y en una mezcla de ambos.

A.2.5.1. Ecuación de la dilución isotópica

La ecuación que permite obtener directamente la concentración inicial del elemento o compuesto natural en la muestra utilizando un trazador isotópico en el modo específico recibe el nombre de Ecuación de la dilución isotópica⁶⁰.

Para el desarrollo de esta ecuación se considera que si N_s es el número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra y N_t el número de moles del mismo elemento en el trazador, el número de moles del elemento en la mezcla N_m resultante vendrá dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad [2]$$

De la misma manera se pueden obtener balances de masa similares para los isótopos **a** y **b**:

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad [3]$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad [4]$$

Si se divide la Ecuación [3] entre la Ecuación [4] se obtiene la relación isotópica de ambos isótopos (a/b) en la mezcla (R_m) la cual puede expresarse de la siguiente manera:

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

en dónde $N_s^a = N_s A_s^a$; $N_t^a = N_t A_t^a$; $N_s^b = N_s A_s^b$; $N_t^b = N_t A_t^b$ si se tienen en cuenta las abundancias de los isótopos a y b en la muestra (A_s^a y A_s^b) y en el trazador (A_t^a y A_t^b), respectivamente.

Despejando N_s en la Ecuación [5] se obtiene:

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

La Ecuación [6] expresa el número de moles del elemento en la muestra en función del número de moles de trazador añadidos y de las abundancias de ambos, así como de la relación isotópica medida. Si se define:

$$R_s = \frac{A_s^b}{A_s^a} \quad \text{Relación isotópica (b/a) en la muestra}$$

$$R_t = \frac{A_t^a}{A_t^b} \quad \text{Relación isotópica (a/b) en el trazador}$$

el número de moles de elemento natural en la muestra viene dado por:

$$N_s = N_t \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad [7]$$

Utilizando las expresiones $N_s = \frac{C_s \cdot m_s}{M_s}$ y $N_t = \frac{C_t \cdot m_t}{M_t}$ donde:

- C_s y C_t son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador.
- m_s y m_t son la masa tomada de muestra y la masa añadida de trazador.
- M_s y M_t son los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador.

se obtiene la ecuación final de la dilución isotópica en la que, con excepción de la relación isotópica R_m , todos los parámetros se conocen de antemano y por tanto la concentración del elemento en la muestra C_s se determina con la simple medida de R_m mediante Espectrometría de Masas.

$$C_s = C_t \frac{m_t}{m_s} \frac{M_s}{M_t} \frac{A_t^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad [8]$$

A.2.5.2. Uso de trazadores isotópicos múltiples

Cuando se necesitan analizar varias especies de un mismo elemento, cada compuesto puede ser enriquecido en un isótopo diferente del elemento. Este tipo de trazadores se denominan trazadores múltiples y permiten no solo cuantificar dichas especies sino también cuantificar y corregir las posibles reacciones de interconversión entre los analitos.

El uso de trazadores isotópicos múltiples en el análisis de especiación, se emplea principalmente en dos campos de aplicación: En primer lugar, en el estudio de los procesos de formación y degradación de especies elementales en ecosistemas naturales, como por ejemplo: la metilación-demetilación del mercurio en sedimentos por la acción de bacterias^{63,64,65,66} o la degradación de los compuestos butilados de estaño^{67,68,69} en aguas. En segundo lugar, estos trazadores se utilizan para corregir las reacciones de degradación o interconversión que pueden ocurrir durante el procedimiento analítico,

como por ejemplo en la determinación de Cr(VI) en muestras medioambientales, en la cual es posible que el Cr (VI) se reduzca a Cr(III) o que el Cr(III) se oxide a Cr(VI) durante el proceso analítico^{70,71}.

Para ilustrar estos estudios con trazadores isotópicos múltiples vamos a suponer un sistema cerrado en el cual tenemos dos compuestos interconvertibles (**A** y **B**). Podemos asumir inicialmente que ambos compuestos **A** y **B** se pueden obtener en tres formas isotópicas diferentes, las cuales se pueden distinguir mediante espectrometría de masas y cada una de ellas está enriquecida en un isótopo estable del elemento que se quiere analizar. Vamos a considerar el elemento posee tres isótopos diferentes a los que denominaremos **1**, **2** y **3**, donde el isótopo **1** es el más abundante en el elemento en estado natural. A la muestra, que contiene una cantidad desconocida de A y de B (N_s^A y N_s^B) se añaden cantidades conocidas de análogos enriquecidos para cada compuesto (N_t^A y N_t^B), pero cada uno enriquecido en un isótopo diferente del elemento que queremos analizar: el compuesto **A** enriquecido en el isótopo **2** y el compuesto **B** enriquecido en el isótopo **3**. Por lo tanto, podremos obtener un balance de masas para el número de moles de los compuestos A y B en la mezcla (N_m^A y N_m^B):

$$N_m^A = N_s^A + N_{tA}^A + N_{tB}^A \quad [9]$$

$$N_m^B = N_s^B + N_{tB}^B + N_{tA}^B \quad [10]$$

Donde N_{tB}^A y N_{tA}^B son las posibles impurezas de A presentes en el trazador isotópico de B, y las posibles impurezas de B en el trazador isotópico de A. Antes de la adición de los trazadores isotópicos de ambos compuestos, los valores de N_{tB}^A , N_{tA}^B , N_{tA}^A y N_{tB}^B deben de ser conocidos mediante determinación experimental o mediante un certificado de análisis de ambos trazadores proporcionado por el fabricante.

Después de la adición de la muestra, y una vez que se ha alcanzado el equilibrio isotópico, una fracción de compuesto **A** puede convertirse en **B** y viceversa durante las diferentes etapas de preparación de la muestra. Si asumimos que el equilibrio isotópico entre muestra y trazadores se ha producido antes de que haya tenido lugar ninguna interconversión, podremos establecer nuevos balances de masas, en los cuales, $F1$ se refiere a la posible interconversión de **B** en **A** y $F2$ se refiere a la posible interconversión de A en B como se observa en la Figura 8.

$$N_m^A = (N_s^A + N_{tA}^A + N_{tB}^A) \times (1 - F2) + (N_s^B + N_{tA}^B + N_{tB}^B) \times F1 \quad [11]$$

$$N_m^B = (N_s^B + N_{iB}^B + N_{iA}^B) \times (1 - F1) + (N_s^A + N_{iA}^A + N_{iB}^A) \times F2 \quad [12]$$

Estos balances de masas se utilizarán para conseguir el objetivo final, que es el cálculo de la cantidad original de compuesto **A** y **B** en la muestra ($N_{s,A}$ y $N_{s,B}$) junto con los factores de degradación $F1$ y $F2$.

Para llevar a cabo este objetivo durante los últimos años se han desarrollado diferentes modelos matemáticos^{63,67,68,69,70,72} que nos permiten el cálculo tanto de los factores de degradación ($F1$ y $F2$) como de las concentraciones corregidas de ambos compuestos ($N_{s,A}$ y $N_{s,B}$). De ellos, actualmente, el modelo basado en el uso de la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)⁶⁹, es el más utilizado debido a que es el que ofrece un mayor número de ventajas^{73,74}.

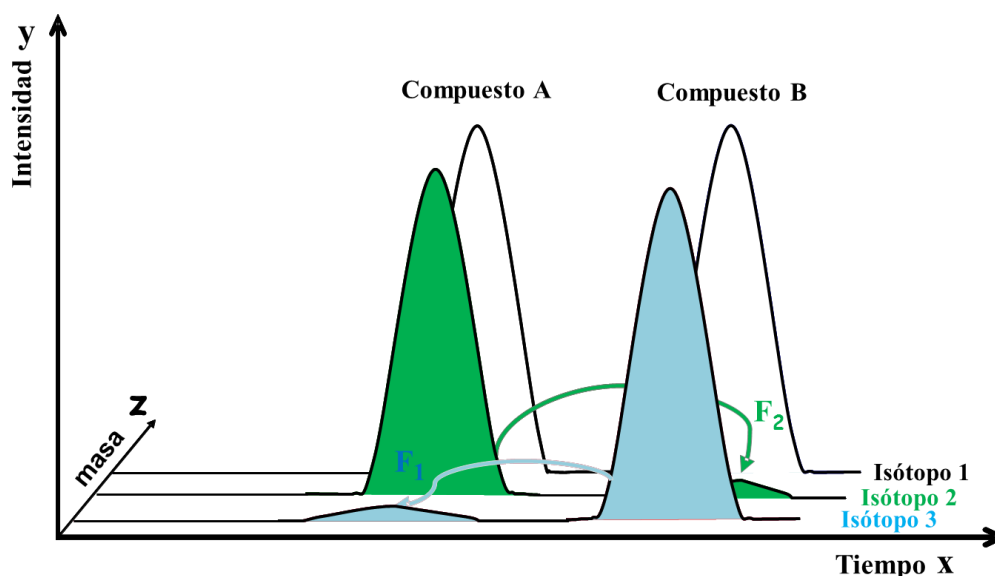


Figura 8: Cromatograma conceptual para los compuestos A y B de un mismo elemento a los que se le ha añadido análogos enriquecidos (compuesto A enriquecido en el isótopo 2, y el compuesto B enriquecido en el isótopo 3). $F1$ indica la interconversión de B en A y $F2$ indica la interconversión de A en B.

El uso de trazadores isotópicos múltiples, a pesar de su complejidad matemática, presenta las mismas ventajas que ofrece el análisis por dilución isotópica elemental con trazador sencillo y además añade nuevas y potentes posibilidades en el cálculo y corrección de las reacciones de interconversión. Por otra parte, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones en el uso de esta técnica: La composición isotópica de los diferentes trazadores isotópicos tiene que ser conocida exactamente, la estabilidad de los trazadores tiene que estar totalmente asegurada lo que requiere una determinación

previa de su concentración y su composición isotópica, Además, es necesario que el equilibrio isotópico se alcance antes de que ocurran las degradaciones o interconversiones entre las especies. La principal limitación de esta estrategia se produce cuando las concentraciones de las especies en la muestra son muy diferentes entre sí ya que las incertidumbres en el cálculo de las concentraciones o los factores de conversión pueden ser demasiado elevadas.

Otras posibles aplicaciones de los trazadores isotópicos múltiples son: En primer lugar, el estudio del metabolismo mineral de elementos traza^{75,76} en los cuales se añade un trazador isotópico (trazador metabólico) que nos permitirá observar su distribución entre los diferentes tejidos y posteriormente se añade un segundo trazador isotópico que nos permitirá la cuantificación de la cantidad total de elemento. Y en segundo lugar, es la adición de dos isótopos enriquecidos a productos manufacturados⁷⁷ u organismos vivos⁷⁸ en una relación conocida, lo que nos va a permitir su aplicación en la lucha contra la falsificación o en el marcaje transgeneracional de organismos vivos.

Sin embargo, a día de hoy, un campo muy importante de aplicación, y que todavía no ha sido explotado, es la aplicación de trazadores isotópicos múltiples a la determinación de compuestos orgánicos.

A.2.6. La dilución isotópica en el análisis orgánico y bioquímico

El análisis por dilución isotópica se ha aplicado en el campo del análisis de compuestos orgánicos desde los años setenta mediante el enriquecimiento isotópico del compuesto a analizar en uno o varios átomos de ^{13}C , ^2H , o ^{15}N . Al igual que en el análisis elemental por IDA, el principio básico reside en obtener la concentración del analito por medio de la relación isotópica medida en la mezcla muestra-trazador, la cual se debe mantener constante a lo largo de los distintos procesos analíticos. Sin embargo, existen tres limitaciones importantes respecto a la dilución isotópica inorgánica:

- a) La diferencia de masa entre el trazador y el compuesto de abundancia isotópica natural puede producir pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas de ambos dando lugar a lo que se conoce como "efectos isotópicos"⁷⁹ los cuales se observan principalmente en compuestos deuterados.
- b) Las fuentes de ionización utilizadas en el campo del análisis orgánico, como las fuentes de ionización de impacto electrónico⁸⁰ o el electrospray⁸¹, producen para un determinado compuesto orgánico un "cluster" isotópico^{82, 83} en cada fragmento

molecular en el que se incluye no solo la masa nominal m del fragmento, sino también las masas $m+1$, $m+2$ debido a la presencia natural de isótopos de ^{13}C , ^2H , ^{15}N . Por tanto, cuando se introduce un compuesto marcado isotópicamente en una muestra se puede producir un solapamiento espectral entre el compuesto natural y el trazador.

c) Tradicionalmente, debido a la dificultad de medir correctamente la composición isotópica de compuestos orgánicos por Espectrometría de Masas la cuantificación en dilución isotópica orgánica se basa en la construcción de una curva de calibrado.⁸⁴ Para ello se añade una cantidad constante de trazador a una serie de disoluciones de concentración creciente del analito. En estos casos el trazador isotópico se emplea simplemente como un patrón interno^{85,86}. Esto tiene como desventaja el aumento del tiempo de análisis total y del consumo de compuesto marcado isotópicamente.

A.2.6.1. Ecuación de la dilución isotópica orgánica: Calibrado lineal y no lineal

En 1976, Pickup y McPherson⁸⁷, partiendo de la ecuación de la dilución isotópica elemental [5] y dividiendo el numerador y el denominador por el número de moles del trazador (N_t) propusieron la forma básica de la ecuación de la dilución isotópica orgánica:

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} A_s^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} A_s^b + A_t^b} \quad [13]$$

Cuando se evita el solapamiento espectral mediante el marcaje en varios átomos de la molécula, la ecuación [13] toma la forma de una función lineal. La ausencia de solapamiento espectral implica que la abundancia del isótopo de referencia del trazador (b) en el compuesto natural (A_s^b) es cero, al igual que la abundancia del isótopo de referencia del compuesto natural (a) en el trazador (A_t^a). Bajo estas condiciones la ecuación [13] se puede expresar como:

$$R_m = \frac{N_s}{N_t} \cdot \frac{A_s^a}{A_t^b} \quad [14]$$

Por lo tanto cuando se representa la relación (R_m) frente a la relación del número de moles ($\frac{N_s}{N_t}$) se obtiene una línea recta (*Ecuación Lineal*) de pendiente $\frac{A_s^a}{A_t^b}$ y ordenada en el origen 0.

Sin embargo, existen dos casos donde el calibrado no es lineal: El primero de ellos, es un caso intermedio, donde el calibrado es lineal pero solo en un rango de concentración^{88,89,90}. Este caso tiene lugar cuando existe solapamiento espectral parcial entre analito y trazador. Y el segundo, se produce cuando los trazadores utilizados dan lugar a solapamiento espectral con el analito, utilizando en estos casos ajustes polinómicos⁹¹ o hiperbólicos⁹².

Una vez que se construye la curva de calibración, la medida de R_m en la mezcla muestra-trazador nos dará directamente la concentración de analito en la muestra, ya que el número de moles de trazador es conocido. Además no es necesaria una caracterización previa del trazador como ocurre en la dilución isotópica elemental ya que tanto la composición isotópica del trazador como su concentración no tienen influencia en el resultado final.

A.2.7. Aplicaciones de la dilución isotópica en el análisis clínico

El análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS) está considerado internacionalmente como un método primario de análisis por lo que tiene numerosas aplicaciones en el campo del análisis clínico. Por una parte, el desarrollo de métodos de referencia basados en ID-MS permite asegurar la trazabilidad al sistema internacional de otros métodos rutinarios empleados en diferentes laboratorios clínicos para un mismo compuesto. Por otro lado, IDMS es la técnica analítica utilizada por los Institutos Nacionales de Metrología (NMIs) en la certificación de materiales de referencia (CRMs) debido a que proporciona resultados analíticos de una gran calidad metrológica.

En los últimos años, el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas se está aplicando cada vez más en análisis de rutina debido a una mayor disponibilidad de espectrómetros de masas en los laboratorios analíticos y a la comercialización a precios asequibles de compuestos marcados isotópicamente. Además, la necesidad de acreditación de los laboratorios y la rapidez de los análisis en comparación con los métodos convencionales basados en calibrados son otras razones de la popularización de esta estrategia de calibración.

A.2.7.1. Métodos de referencia basados en IDMS: Trazabilidad

Según la norma UNE-ISO Guía 99 IN (2012) se define trazabilidad como “*la propiedad del resultado de una medida o del valor de un patrón mediante la cual puede relacionarse con referencias establecidas, normalmente patrones nacionales o internacionales mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones cada una de las cuales con su incertidumbre calculada*”⁹³.

Para asegurar la trazabilidad metrológica es necesario por tanto una cadena de trazabilidad ininterrumpida a un patrón nacional o internacional, una incertidumbre documentada, una competencia técnica reconocida y la relación de los resultados de medida al sistema internacional de unidades (Kg, mol, amperio, segundo, etc.).

En la Química Clínica, uno de los principales problemas, es asegurar la trazabilidad de diferentes métodos usados en diferentes laboratorios de rutina para la determinación de un mismo parámetro. Debido a los rápidos desarrollos de las técnicas analíticas existen numerosos métodos para un mismo parámetro y normalmente los resultados difieren de método a método y de laboratorio a laboratorio. Esto se debe a la inespecificidad de los propios métodos, a problemas derivados del material biológico analizado o al incumplimiento de principios básicos de la metrología.

Para una mejor exactitud y compatibilidad entre resultados de diferentes laboratorios, en los años 70-80, un trabajo pionero de la *Oficina Nacional Americana de Normas* (NBS, American National Bureau of Standards) abrió una vía muy importante para solucionar este problema introduciendo el concepto de **Método de Referencia**.^{94,95} Un método de referencia se define como: “*Aquel método que después de exhaustivas investigaciones ha demostrado tener una inexactitud despreciable*”⁹⁶. Por lo tanto, IDMS es una herramienta extremadamente útil en el desarrollo de métodos de referencia en la Química Clínica ya que es capaz de proporcionar resultados analíticos con la más alta calidad metrológica así como una elevada exactitud y precisión.

En la actualidad existen más de 125 métodos de referencia para 76 diferentes biomarcadores los cuales vienen recogidos dentro de una base de datos establecida por la *Comisión Conjunta para la Trazabilidad en la medicina de laboratorio* (JCTLM, Joint Commite for Traceability in Laboratory Medicine)⁹⁷. En la Tabla 2 se muestran algunos métodos de referencia basados en IDMS para diferentes biomarcadores importantes en suero humano. El JCTLM fue fundado en el año 2002 y está formado por representantes y trabajadores de laboratorios clínicos, agencias gubernamentales y

fabricantes para promover una compatibilidad internacional, fiabilidad y equivalencia en los resultados de los laboratorios clínicos con el objetivo de mejorar la asistencia sanitaria.

Tabla 2: Métodos de referencia basados en IDMS para diferentes biomarcadores en suero humano.

Biomarcador	Método de referencia basado en ID-MS
Creatinina	GC-ID-MS ⁹⁸ , LC-ID-MS ⁹⁹
Colesterol	GC-ID-MS ¹⁰⁰
25-hidroxyvitamina D2	LC-ID-MS-MS ¹⁰¹
Urea	GC-ID-MS ¹⁰²
Ácido Úrico	GC-ID-MS ¹⁰³
Triglicéridos	GC-ID-MS ¹⁰⁴

A.2.7.2. Certificación de materiales de referencia mediante IDMS

Actualmente, en la Química Clínica se llevan a cabo numerosos análisis que nos permiten el diagnóstico de diferentes enfermedades. El control de calidad y la validación de las medidas clínicas se llevan a cabo mediante el análisis de materiales de referencia certificados (CRMs). Según la norma ISO Guide 35 del año 2006⁹⁵ *un material de referencia certificado es aquel material de referencia que se caracteriza por un procedimiento metrológico válido para una o más propiedades especificadas, acompañado de un certificado que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada, y una declaración de trazabilidad metrológica*. El principal objetivo de un CRMs es evaluar y demostrar las capacidades de un laboratorio para desarrollar un determinado análisis químico.

El desarrollo y la producción de los materiales de referencia certificados (CRMs) involucran procedimientos de fabricación muy especializados como por ejemplo^{105,106}:

a) **Estudios de homogeneidad:** Para conseguir el objetivo de proporcionar medidas estables y consistentes en el tiempo, los materiales de referencia certificados deben ser homogéneos. La homogeneidad de un material de referencia se refiere tanto a la homogeneidad en un envase como entre diferentes envases. Debido a que la mayoría de CRMs en clínica están formados por material congelado (suero, plasma, orina) o líquidos que han sido liofilizados dentro de un mismo envase rara vez se observa una falta de homogeneidad. Sin embargo, cuando se alícuota una gran cantidad de envases a lo largo de varias horas, pueden producirse cambios en el material que impliquen

diferencias en la concentración de analito entre diferentes botellas. Este es el principal punto crítico, por lo que para asegurar la homogeneidad se mide la concentración de analito en varias botellas de un mismo lote.

b) Estudios de estabilidad: Los estudios de estabilidad, incluyen estabilidad a corto plazo o a largo plazo. La estabilidad a corto plazo se realiza para comprobar si hay cambios en la concentración de analito desde el fabricante al destinatario. Para ello se somete el material de referencia a temperaturas extremas que se esperan durante el transcurso del envío, y se mide la concentración de analito comparándola con una muestra control almacenada.

La estabilidad a largo plazo, se refiere a que el valor certificado del analito sea válido durante 5-10 años. Existen numerosos métodos para llevar a cabo estos estudios¹⁰⁷ que dependen de la estabilidad del analito.

c) Certificación del valor de referencia: Según la norma ISO 35, 2006 existen tres maneras diferentes de llevar a cabo la certificación:

- i) Certificación dentro de un laboratorio utilizando un método primario de análisis.
- ii) Certificación dentro de un laboratorio utilizando dos o más métodos independientes realizados por dos o más operadores.
- iii) Certificación por medio de *ejercicios de intercomparación* entre distintos laboratorios incluyendo la posibilidad de utilizar métodos primarios de análisis.

Es muy importante establecer la incertidumbre del valor certificado. No hay un método específico para su evaluación, pero asegurándose ha de asegurar que sea válida durante el periodo completo de validez expresado en el certificado que acompaña al material¹⁰⁸.

La mejor certificación es mediante la realización de *ejercicios intercomparación* utilizando métodos primarios de análisis, ya que se consigue la identificación y eliminación de posibles fuentes de error. Por lo tanto, el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas, al ser un método primario de análisis va a ser la técnica más utilizada en la certificación de materiales de referencia.

Estos ejercicios intercomparación son organizados por el Comité Consultivo para la cantidad de materia (CCQM, Comité Consultatif pour la Quantité de Matière) creado en 1993 con el objetivo de introducir la metrología en las medidas químicas^{109,110}. Como se observa en la Tabla 3 durante los últimos 15 años, en el ámbito de la Química Clínica se han organizado diversos ejercicios intercomparación en los cuales participan diferentes institutos nacionales de metrología (NMIs) utilizando métodos primarios de análisis, siendo en algunos casos obligatorio el uso de la dilución isotópica, con el fin de evaluar

las capacidades analíticas de dichos institutos y de producir y certificar nuevos materiales de referencia.

Tabla 3: Ejercicios de intercomparación desarrollados en el ámbito de la Química Clínica en los que se ha empleado el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas como método primario de análisis.

Referencia	Compuesto	Matriz	ID-MS	Año
CCQM-K6.2	<i>Colesterol</i>	Suero humano	Requerido	2012
CCQM-K11.2	<i>Glucosa</i>	Suero humano	Requerido	2012
CCQM-K12.2	<i>Creatinina</i>	Suero humano	Requerido	2012
CCQM-K14	<i>Calcio</i>	Suero humano	Recomendado	2004
CCQM-K63	<i>Cortisol y Progesterona</i>	Suero humano	Requerido	2010
CCQM-K69	<i>Testosterona</i>	Orina humana	Requerido	2009
CCQM-K132	<i>Vitamina D</i>	Suero humano	Requerido	2016

A.2.7.3. Determinación de Creatinina en los laboratorios clínicos

A.2.7.3.1. Importancia del análisis de Creatinina

La Creatinina (*Figura 9*) es un producto de desecho metabólico que resulta de la conversión no enzimática de creatina y fosfocreatina, moléculas fundamentales para la transferencia de energía a los músculos. La creatinina es excretada por los riñones a la orina. En condiciones “normales” su excreción es constante, siendo la cantidad de creatinina producida proporcional a la masa del individuo, sexo, edad, raza y dieta¹¹¹.

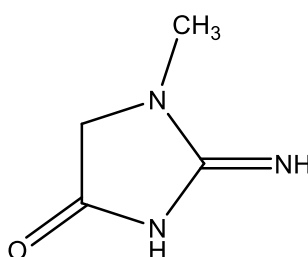


Figura 9: Estructura química de la creatinina.

Aunque es una sustancia de desecho, el nivel de creatinina en suero es una prueba de diagnóstico que se incluye en los análisis de sangre comunes, ya que una subida en los niveles de creatinina¹¹² (> 1mg/dL) solo se observa cuando hay una insuficiencia renal crónica, por lo tanto esta prueba no es válida para detectar estadios tempranos de las enfermedades renales.

La enfermedad renal crónica (CKD) es un problema mundial de salud pública, ya que ha habido un incremento notable en los últimos años del número de pacientes que se encuentran en la fase final de la enfermedad, es decir que requieren diálisis o un trasplante¹¹³. Se estima que aproximadamente 19 millones de personas en el mundo poseen esta enfermedad. Por tanto, la detección temprana de CKD es vital para evitar que la enfermedad derive a estados tan avanzados o incluso la muerte.

En el año 2002, la fundación para la iniciativa de la calidad de los resultados de la enfermedad renal (K/DOQI) recomendó el uso del índice de filtrado glomerular (GFR) para la detección precoz de CKD¹¹⁴. El índice de filtrado glomerular (GFR)¹¹⁵ es el volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo desde los capilares glomerulares renales (unidad anatómica funcional del riñón) hacia el interior de la cápsula de Bowman (esfera que rodea a los capilares glomerulares renales en la que se realiza el filtrado de la creatinina que se va a excretar). Actualmente se define como enfermedad renal crónica, cuando el GFR es menor de 60 mL/min por 1.73m² de área de superficie corporal durante 3 meses, independientemente de la causa, siendo los valores normales en hombres y mujeres jóvenes y sanos 130 mL/min/1.73m² en hombres y 120 mL/min/1.73m² en mujeres, y disminuye 1 mL/min/1.73m² por año a partir de los 40 años de edad¹¹⁶.

Para facilitar la detección de CKD, se recomienda a los laboratorios clínicos que la estimación del GFR se realice utilizando ecuaciones, como por ejemplo las derivadas del estudio de la modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDRD)¹¹⁷. Las ecuaciones originales del estudio de MDRD fueron desarrolladas usando 1628 pacientes que tenían enfermedad del riñón no diabética. Estas ecuaciones usadas para el cálculo del GFR estaban basadas en 6 variables: edad, sexo, raza y los niveles de concentración en suero de creatinina, urea y albúmina¹¹⁸, sin embargo para su uso clínico estas ecuaciones se simplificaron y se redujeron a 4 variables [Ecuación 15]: edad, sexo, raza y concentración de creatinina en suero (SCr)¹¹⁹.

$$\begin{aligned} GFR[mL \times min^{-1} \times (1.73m^2)^{-1} = \\ 186 \times (SCr)^{-1.154} \times (edad)^{-0.203} \times (0.742 \text{ si es femenino}) \quad [15] \\ \times (1.210 \text{ si es raza Africana – Americana}) \end{aligned}$$

A día de hoy la ecuación [15] es la más utilizada por la mayoría de laboratorios clínicos para estimar el GFR. En ella la medida exacta y precisa de la concentración de

creatinina en suero juega un papel muy relevante, por ello el Programa de Educación de la Enfermedad Renal de los Estados Unidos (NKDEP)¹²⁰, ha sugerido una serie de recomendaciones a los laboratorios clínicos, entre las que se encuentra que se debe conseguir una medida exacta de la concentración de creatinina en suero mediante los métodos de rutina existentes, o si fuera necesario llevar a cabo una recalibración de los métodos de rutina para hacerlos trazables a los métodos de referencia basados en el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (ID-MS).

A.2.7.3.2. Análisis de creatinina en laboratorios clínicos: Método de Jaffé

En los laboratorios clínicos de rutina, el método más utilizado para la determinación de creatinina es el conocido como método colorimétrico de Jaffé. Este método recibe su nombre del Bioquímico y Farmacólogo Alemán Max Jaffé que observó en 1886 que cuando se hacía reaccionar creatinina con ácido pícrico en medio alcalino se formaba un color rojo^{121,122}. Esta reacción fue utilizada por primera vez por Folin en el año 1904 para medir creatinina en orina¹²³. El estudio de la reacción de Jaffé fue estudiada por primera vez por Greenwald¹²⁴ en el año 1925, demostrando que el color rojo se debía a un tautómero de creatinina, ácido pícrico e hidróxido de sodio, pero no especificaba la estructura del tautómero. Estudios posteriores espectroscópicos y cromatográficos¹²⁵ demostraron que las especies no eran ácido picramico.

En el año 1975, basado en estudios realizados en años anteriores sobre reacciones de nitrocompuestos, Butler¹²⁶ demostró con razonable certeza que el color rojo se debía a un complejo de Janovsky (VI) (Figura 10) cuyo máximo de absorbancia se produce a 510 nm. El rendimiento de esta reacción depende de la concentración de hidróxido de sodio, observando una mayor absorbancia del complejo a altas concentraciones¹²⁷. Por tanto, se necesita un control rígido de la concentración de hidróxido de sodio para medir correctamente creatinina mediante la reacción de Jaffé.

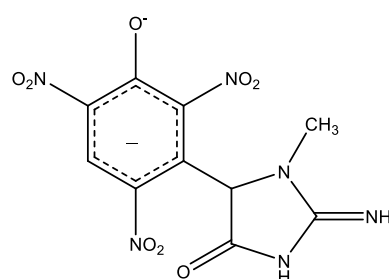


Figura 10: Complejo coloreado de Janovsky (VI) formado en la reacción de Jaffé

Además cabe resaltar que existen otras variables que pueden influir en la reacción de Jaffé. En primer lugar el ajuste de la temperatura y el tiempo de reacción, influirán en el desarrollo de color en la reacción de Jaffé, siendo óptimas temperaturas por debajo de 30° (no mostrándose diferencias en temperaturas entre 15-25° en el desarrollo de color) y tiempos de reacción que no superen los 15 minutos¹²⁸. En segundo lugar, aunque en principio la intensidad del color producido en la reacción de Jaffé es aparentemente independiente de la concentración de ácido pícrico utilizada¹²⁹, si este se añade en concentraciones muy altas, puede llegar a producir una disminución en el desarrollo de color. Por otra parte, el grado de recuperación de creatinina en filtrados de proteínas depende del pH del compuesto que induce la precipitación. A pH<2 la recuperación de creatinina es cuantitativa¹³⁰. Sin embargo filtrados con ácido tungstico (formas hidratadas del óxido de tungsteno, WO₃) en el rango de pH entre 3 y 4,5 pueden producir pérdidas. Otra variable importante es el pH ya que juega un papel muy importante en el grado de desarrollo de color en la reacción de Jaffé¹³¹, dependiendo por lo tanto de la concentración de hidróxido de sodio y de la acidez de las disoluciones originales de creatinina. Finalmente es importante resaltar que homólogos y derivados de la creatinina como la Glicociamida, 5-metil-glicociamida y 5-metil-creatinina interfieren en la reacción así como compuestos carbonilos, glucosa, acetona, sarcosina, dopamina, drogas (cefatoxima, cefuroxima, cefalotina) y especialmente la bilirrubina¹³². Estos interferentes conducen a errores positivos y negativos en los valores de creatinina provocando un problema en la determinación exacta y precisa de creatinina en los laboratorios de rutina.

A.2.7.3.3. Interferencia por bilirrubina en el método de Jaffé

Como se ha descrito en la sección anterior son muchos los interferentes que influyen en el método de Jaffé, entre los que se puede destacar de especial manera la bilirrubina. La bilirrubina (Figura 11) es un pigmento amarillo formado en el interior del cuerpo humano en el metabolismo del grupo hemo, mediante la reducción enzimática de biliverdina a bilirrubina¹³³. La bilirrubina viaja unida a la albúmina (proteína transportadora) en el torrente sanguíneo hasta el hígado donde se separan y se secreta por la bilis. Cuando el nivel de bilirrubina en la sangre aumenta, se observa una coloración amarillenta de la piel y mucosa lo cual se conoce como ictericia. El nivel de bilirrubina es un parámetro bioquímico muy importante en las pruebas de función hepática y renal, debido a la existencia de enfermedades en órganos

primarios asociados o a interrelaciones hemodinámicas. Esta conexión da lugar ocasionalmente a fallo crónico de ambos órganos necesitándose un trasplante combinado de hígado y riñón ¹³⁴.

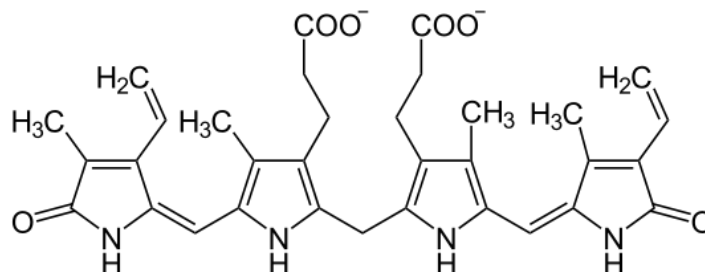


Figura 11: Estructura química de la bilirrubina.

La bilirrubina da lugar a una interferencia negativa en la determinación de creatinina mediante el método de Jaffé ^{133,135,136,137,138}, la cual puede dar lugar a un falso negativo en pacientes con enfermedad renal crónica. Esta interferencia es debida tanto a la bilirrubina conjugada como a la no conjugada ^{139,140} e independiente de la concentración de creatinina en la muestra ¹⁴⁰. Sin embargo, hay diferentes puntos de desacuerdo en la naturaleza y magnitud de esta interferencia: Por ejemplo, hay trabajos en los que se concluye que la interferencia está relacionada linealmente con la concentración de bilirrubina ¹⁴¹, mientras que en otros estudios no se muestra dicha correlación ^{137,142}. También existen autores que afirman que la bilirrubina no es la única responsable de esta interferencia, sino que existen otros compuestos en las muestras ictericas, como es el caso de la biliverdina ¹⁴³.

El mecanismo exacto de la interferencia por bilirrubina no está del todo claro. Mientras que algunos estudios sugieren que la bilirrubina afecta al rendimiento en la reacción de formación del complejo de Janovsky (VI) formado en la reacción entre creatinina y el ácido pícrico ¹³⁵, otros autores creen que la bilirrubina podría ser oxidada a biliverdina en medio alcalino con la consiguiente disminución de la absorbancia a 510 nm ¹³⁷.

Existen diferentes técnicas que se han aplicado con el objetivo de reducir la interferencia por bilirrubina en el método de Jaffé, entre las que cabe destacar:

- Adición de ferrocianuro potásico ^{144,145} antes que tenga lugar la reacción de Jaffé con el objetivo de oxidar la bilirrubina a biliverdina y así minimizar la interferencia.
- Pretratamiento de las muestras con peroxidasa de rábano silvestre y H₂O₂ ¹⁴⁶ para conseguir la disociación de la bilirrubina de la albúmina y la consiguiente oxidación de la bilirrubina.

- Incorporación de dodecil sulfato de sodio (SDS)^{143,147,148} en el reactivo de la reacción de Jaffé, facilitará la disociación de la bilirrubina de la albúmina. Una pre incubación de la muestra con el oxidante antes que tenga lugar la reacción de Jaffé es una técnica eficiente para minimizar la interferencia por bilirrubina.

- Eliminación de la bilirrubina mediante ultrafiltración¹⁴⁹. Consiste en una simple ultracentrifugación con la que se conseguirá la eliminación de la bilirrubina y se minimizará su interferencia. Esta técnica se podrá aplicar también en muestras pediátricas donde el volumen de muestra es más pequeño.

- “Rate blanking”^{150,151}. En esta técnica se utiliza el grado de cambio de color en la muestra con el NaOH solo como un factor de corrección, que se aplica al cambio de color observado después de la adición de ácido pícrico. Esta estrategia proporciona solo una corrección parcial de la interferencia por bilirrubina debido a la naturaleza curvilínea de la oxidación.

- Separación de proteínas mediante diálisis o desproteínización en medio ácido^{147,152}. Esta técnica consiste en llevar a cabo diálisis o una desproteínización en medio ácido antes de llevar a cabo la reacción de Jaffé para eliminar el complejo bilirrubina-albúmina. Es la técnica que nos proporciona mejores resultados.

Estos esfuerzos por eliminar la interferencia por bilirrubina no fueron del todo satisfactorios, siendo necesaria la introducción de nuevas metodologías en el análisis de rutina de creatinina que mejoren la especificidad de estos ensayos.

A.2.7.3.4. Alternativas al método de Jaffe: Métodos enzimáticos

Hace 30 años, se empezaron a desarrollar métodos enzimáticos como una alternativa metodológica para solucionar los problemas ocasionados por el método de Jaffé en la determinación de creatinina en los laboratorios clínicos de rutina.

Estos métodos enzimáticos se pueden clasificar en tres grupos diferentes:

a) Los basados en la enzima sarcosina oxidasa^{153,154}: Este método está basado en el uso combinado de las enzimas sarcosina oxidasa (SOD), creatina amidohidrolasa y creatinina amidohidrolasa que permiten la conversión de creatinina a glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno. A su vez, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzoico, catalizado por la peroxidasa para formar un cromógeno de quinonaimina.

La intensidad cromática del cromógeno de quinonaimina formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. El esquema de reacciones se muestra en la Figura 12.

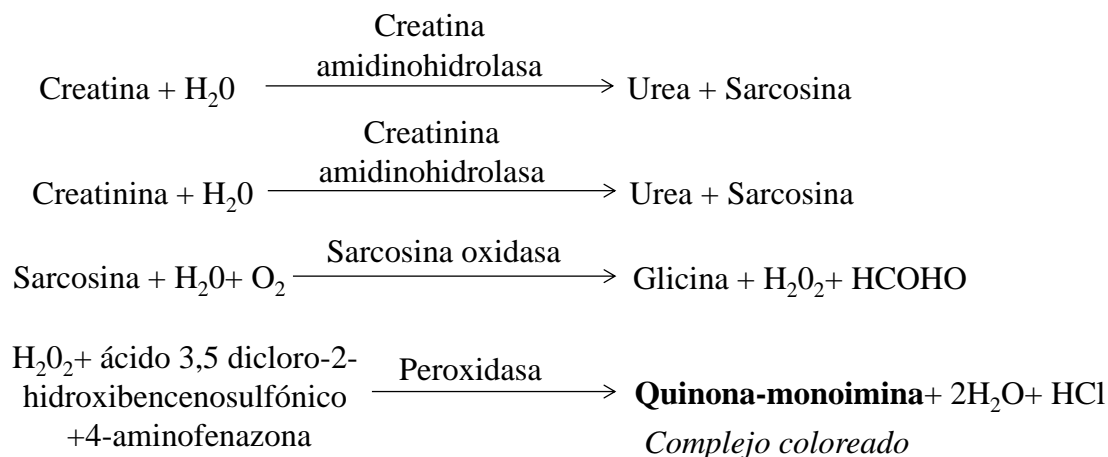


Figura 12: Secuencia de reacciones del método enzimático basado en la enzima sarcosina oxidasa para la determinación de creatinina.

b) Los **basados en la enzima creatinina iminohidrolasa**¹⁵⁵: En este método la enzima creatinina iminohidrolasa convierte la creatinina en N-metilhidantoína y amonio (NH_4^+). El ion amonio formado se utiliza en la reacción auxiliar, donde es catalizado mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) formándose NADP^+ . La cantidad de NADP^+ formada es directamente proporcional a la cantidad de creatinina en la muestra. Las reacciones se muestran en la Figura 13.

El amonio endógeno presente en la muestra se elimina en una etapa previa de incubación la cual implica la misma reacción auxiliar, pero no la creatinina imidohidrolasa.

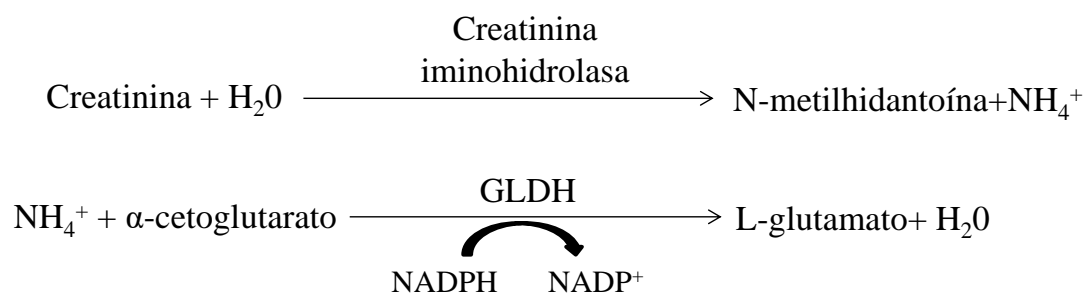


Figura 13: Reacciones principal y auxiliar responsables de la determinación de creatinina mediante el método enzimático basado en la enzima creatinina iminohidrolasa.

c) **Los basados en la enzima creatininas**¹⁵⁶: En ellos, la creatinina es hidrolizada a creatina por acción de la enzima creatininas. La creatina, debido a tres reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por las enzimas creatina quinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa es transformada en NADH. El esquema completo de reacciones se muestra en la Figura 14. La cantidad de creatinina en la muestra estará relacionada con la absorbancia medida para el NADH a 310 nm.

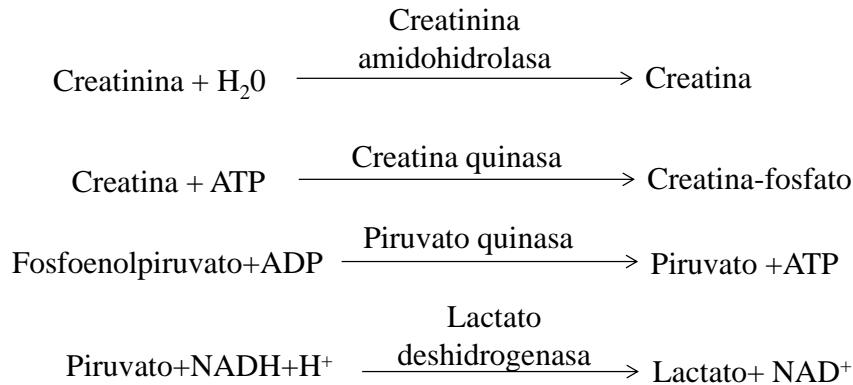


Figura 14: Esquema de reacciones del método enzimático basado en la enzima creatininas para la determinación de creatinina.

Estos métodos enzimáticos se encuentran menos interferidos que el método de Jaffé^{157, 158, 159}, siendo los que implican las enzimas creatinina imidohidrolasa y creatininas los que proporcionan unos mejores resultados¹⁵¹. Por lo tanto, se recomienda cada vez más su uso en el análisis de rutina^{160,161} sin embargo aún no están siendo ampliamente aceptados en los laboratorios de rutina debido a sus altos costes¹⁵⁹.

A.2.7.3.5. Alternativas al método de Jaffe: IDMS

Todos los problemas encontrados en los métodos anteriormente descritos hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos que nos aseguren una determinación exacta y precisa de creatinina en los análisis de rutina¹⁶². En este sentido el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (ID-MS) juega un papel esencial. En Química clínica, y más concretamente en la determinación de creatinina la ID-MS se usa en el desarrollo de métodos de referencia para asegurar una trazabilidad entre los métodos utilizados en el análisis de rutina. Estos métodos de referencia basados en ID-MS para la determinación de creatinina están recogidos dentro de una base de datos establecida por la *Comisión Conjunta para la Trazabilidad en la medicina de laboratorio (JCTLM,*

Joint Commite for Traceability in Laboratory Medicine)⁹⁷ e incluyen métodos basados tanto en LC-MS o LC-MS-MS como en GC-MS. Los métodos basados en LC-MS o LC-MS-MS^{99,163} ofrecen un análisis rápido y sencillo por lo que podrían aplicarse en rutina, sin embargo la instrumentación tiene un alto coste y aún no se encuentra ampliamente disponible en los laboratorios de rutina. Sin embargo, los métodos basados en GC-MS^{98,164,165} serían los más susceptibles de poder ser aplicados en el análisis de rutina, debido a que dicha instrumentación está actualmente presente en la mayoría de los laboratorios clínicos. Sin embargo, el mayor y único hándicap que impide la aplicación de estos métodos en el análisis de rutina, es el largo procedimiento de tratamiento de muestra que incluye reacciones de derivatización demasiado largas.

A.2.7.3.6. Interconversión creatina-creatinina

El cuerpo humano es un conjunto de sistemas independientes que trabajan en simbiosis para mantener la vida. A lo largo de estos sistemas, existen muchos mecanismos para proporcionar y regenerar energía que se requiere para que el cuerpo funcione correctamente.

La reacción reversible creatina-creatinina (Figura 15) ha sido intensamente estudiada tanto desde el punto de vista biológico como químico. En el cuerpo humano esta reacción es parte de un sistema que sirve como almacenamiento de energía y juega un papel importante como indicador renal. Esta reacción ha sido de gran interés para los científicos desde principios del siglo XX debido a su gran importancia biológica¹⁶⁶.

El equilibrio de la reacción reversible y no enzimática de ciclación creatina-creatinina es dependiente tanto del pH como de la temperatura. Bajo condiciones ácidas y elevada temperatura la creatina es prácticamente convertida en creatinina de una manera cuantitativa, mientras que la creatinina es parcialmente convertida en creatina en condiciones alcalinas y a baja temperatura^{167,168}. Además se ha demostrado que esta reacción es esencialmente mono-molecular. Sin embargo, estudios realizados añadiendo creatina marcada en ¹⁵N¹⁶⁹ en ratas mostraron que la conversión de creatina en creatinina in vivo es un proceso irreversible, donde la creatina es únicamente el precursor de la creatinina.

A.3. Determinación de la composición isotópica en moléculas mediante espectrometría de masas

A.3.1. Cálculo de la composición isotópica teórica en moléculas de abundancia natural y en análogos enriquecidos: Distribución Binomial.

Los compuestos químicos y particularmente los compuestos orgánicos y biomoléculas contienen elementos de poli-isotópicos. Por lo tanto, la composición isotópica de un compuesto químico, será la combinación de la distribución isotópica de los átomos que constituyen el compuesto. La probabilidad de un cierto isótopo de un elemento de estar presente en un compuesto será función de dos parámetros: su abundancia isotópica natural y el número de elementos de ese mismo tipo presentes en la molécula. Por tanto, la composición isotópica de un compuesto químico y su espectro de masas dependerán de la estructura molecular del compuesto.

El cálculo de la composición isotópica teórica en moléculas está basada en una teoría de probabilidades, más concretamente en la distribución binomial de probabilidades¹⁷³. La distribución binomial^{174,175} es una función de probabilidad discreta que mide el número de éxitos o fracasos en una secuencia de m ensayos independientes. El ejemplo más típico es el de una moneda. Cuando tiramos al aire una moneda, solo puede tener 2 posibilidades cuando cae: cara o cruz. Y además esos dos valores se excluyen mutuamente ya que cuando tenemos “cara” no podemos tener “cruz” al mismo tiempo. La distribución binomial nos permitirá medir la probabilidad de cuantas “caras” o “cruz” podremos encontrar cuando el número de monedas es mayor de 1. La ecuación que nos permite este cálculo es:

$$(a + b)^m = a^m + \frac{m!}{(m-1)!(1)!} a^{m-1}b + \frac{m!}{(m-2)!(2)!} a^{m-2}b^2 + \dots + \frac{m!}{(m-i)!(i)!} a^{m-i}b^i + \dots + b^m = 1 \quad [16]$$

Donde a y b son las probabilidades de ocurrencia de uno u otro suceso (“cara” o “cruz”) y m el número de monedas consideradas. Trasladándonos al cálculo de las abundancias isotópicas, los dos posibles resultados son ^{12}C o ^{13}C ; ^1H o ^2H ; ^{14}N o ^{15}N ; ^{16}O o ^{18}Oetc.; a y b serían las abundancias isotópicas naturales de cada uno de los dos isótopos de elemento, y m el número de átomos de ese elemento en la molécula de interés.

El cálculo de la composición isotópica teórica en moléculas de abundancia natural es de una gran utilidad en el análisis por IDMS ya que nos permitirá seleccionar el mejor

marcaje isotópico y un mejor estudio de los patrones de fragmentación de los compuestos orgánicos en la fuente de ionización. Además el cálculo de las composiciones isotópicas teóricas permite comprobar el grado de concordancia entre la composición isotópica teórica y experimental.

A.3.2. Determinación de la composición isotópica experimental en moléculas

La medida de la composición isotópica o “perfil isotópico experimental” en los compuestos o moléculas se define como el conjunto de las abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un compuesto o molécula calculadas a partir de la medida de las intensidades de los distintos isotopólogos de un determinado ion. La mayoría de las aplicaciones del análisis por dilución isotópica en el análisis orgánico, emplean un espectrómetro de masas acoplado a una separación cromatográfica (GC-MS o HPLC-MS), por lo que la composición isotópica se mide en señales transientes midiendo las áreas de pico.

Por lo tanto, para ilustrar como se llevaría a cabo la medida de la composición isotópica experimental vamos a considerar un determinado ion de una molécula generado en la fuente de ionización cuyo perfil isotópico está formado por cinco isotopólogos (i_1 , i_2 , i_3 , i_4 , i_5). Una vez medida el área de pico proporcionada por cada isotopólogo, la abundancia de los mismos se calculará dividiendo cada área entre la suma total de las áreas. En la Figura 16 se muestra el procedimiento llevado a cabo para el cálculo del perfil isotópico experimental en moléculas mediante espectrometría de masas.

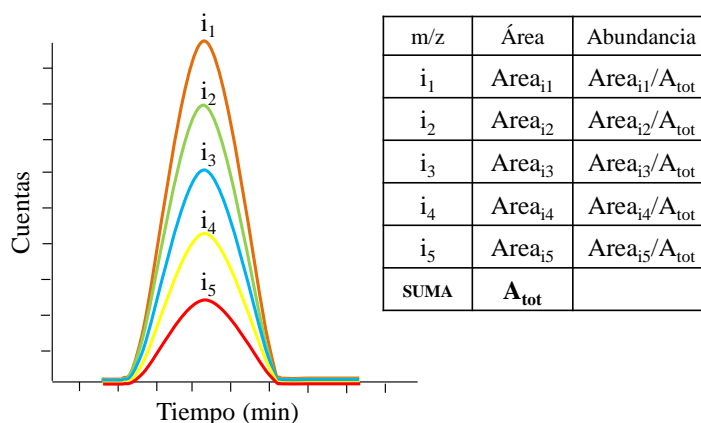


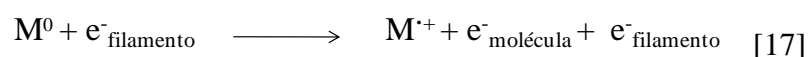
Figura 16: Esquema para el cálculo de las abundancias isotópicas de un compuesto o molécula mediante espectrometría de masas.

A.3.3. Fuentes de ionización moleculares

En las fuentes de ionización empleadas en el análisis de compuestos orgánicos, los analitos son ionizados antes de su determinación por espectrometría de masas. Existen varias técnicas de ionización usadas en MS. Las consideraciones más importantes a la hora de elegir una fuente son la transferencia interna de energía durante la ionización y las propiedades físico-químicas de los analitos a ionizar. Algunas técnicas de ionización son suaves y solo producen iones moleculares de los analitos como la fuente de electrospray (ESI) y otras son más energéticas y causan una extensa fragmentación como por ejemplo la fuente de ionización electrónica (EI). Estas 2 fuentes de ionización son las más utilizadas en el estudio de la composición isotópica en moléculas.

A.3.3.1. Fuente de ionización electrónica (EI)

La fuente de ionización electrónica (EI), comúnmente llamada fuente de impacto electrónico, fue ideada por Dempster y mejorada por Bleakney¹⁷⁶ y Nier¹⁷⁷. Esta técnica de ionización funciona muy bien para una gran cantidad de moléculas en fase gas por lo que se utiliza fundamentalmente en equipos GC-MS. Su gran inconveniente es que induce una extensa fragmentación en las moléculas, de modo que los iones moleculares no son siempre observados. Sin embargo esto tiene como ventaja que los fragmentos moleculares formados proporcionan información estructural adicional que se utiliza para confirmar la presencia de la molécula en estudio. Como se muestra en la Figura 17, esta fuente consiste en un filamento caliente de Re o W en forma de cable o bobina que emite electrones de alta energía, los cuales son acelerados hacia un ánodo y chocan con las moléculas de analito en fase gaseosa. Estos electrones son capaces de extraer un electrón de la molécula generando un ion radical según la ecuación [17].



Este ion radical, $M^{+\cdot}$, recibe el nombre de ion molecular y nos proporciona una información analítica muy importante debido a que tiene el mismo peso molecular que la molécula original. Estos iones moleculares pueden perder su exceso de energía conduciendo a una extensa fragmentación que depende y es específica de la molécula orgánica introducida en la fuente. Estas fragmentaciones pueden ocurrir mediante una

gran variedad de procesos, la mayoría de las cuales se puede clasificar dentro de los siguientes cuatro mecanismos: i) Ruptura de enlace sigma ii) Ruptura homolítica iii) Ruptura heterolítica iv) Procesos de reordenamiento, siendo de una gran utilidad ya que nos proporcionan una información estructural adicional para la elucidación de analitos desconocidos. Para la mayoría de las moléculas orgánicas, el rendimiento de ionización dentro de la fuente es máximo en la región de los 70 eV y la fragmentación producida es reproducible independientemente del espectrómetro de masas utilizado. Existen por tanto, bibliotecas universales de fragmentación que pueden ser utilizadas para realizar identificaciones rápidas y fiables de compuestos desconocidos.

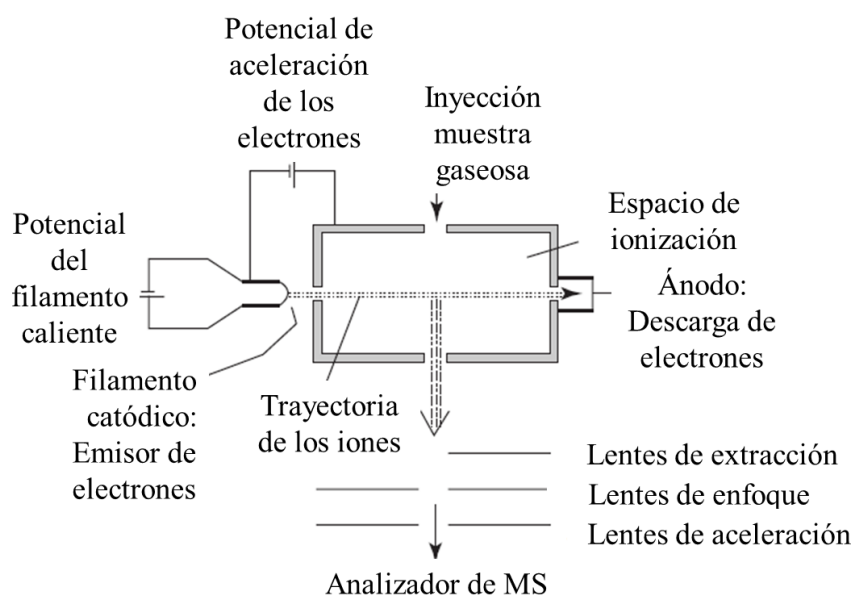


Figura 17: Diagrama de la fuente de ionización electrónica (EI)¹⁷⁸

Cuando se utiliza este tipo de fuente en equipos de GC-MS en la medida abundancias isotópicas se puede producir la formación de iones $M+nH^+$ o $M-nH^+$ junto con el ión mayoritario M^+ . En estos casos, habrá un solapamiento espectral entre estos iones que dificultará la medida de las abundancias isotópicas con exactitud. Por tanto siempre que se pretenda cuantificar compuesto organicos mediante IDMS es muy importante estudiar su patrón de fragmentación en la fuente de ionización de ionización electrónica. Existen numerosos procedimientos matemáticos para estudiar la fragmentación. Uno de ellos fue el desarrollado por Moraes¹⁷⁹, que estudiaba la fragmentación del diclorometano en la fuente de EI en dos clusters diferentes. Como se observa en la Tabla 4, en ambos clusters los autores observaron que la composición isotópica era consistente

con el solapamiento de iones que contienen diferente número de átomos de hidrógeno. En el cluster molecular de m/z 47 a 52 el espectro muestra una contribución de aproximadamente 78 % de CH_2Cl^+ , 8% de CHCl^+ y 14 % de CCl^+ . En el cluster de m/z 82 a 88 se observaron contribuciones de un 93.9 % de CH_2Cl_2^+ , 5.4 % de CHCl_2^+ y 0.7 % de CCl_2^+ .

Por otra parte Mejía y Caruso¹⁸⁰, estudiaron la fragmentación del dimetilseleniuro en la fuente de ionización electrónica (EI). El cluster molecular de m/z 88 a 98 mostró una contribución de 2% de CSe^+ , 19.7 % CH_2Se^+ , 22.7 % de CH_3Se^+ y 5.9 % de CH_4Se^+ . Estos autores propusieron un método basado en el cálculo de la contribución de cada uno de estos compuestos que se encuentran solapados en el espectro de masas basado en regresión lineal múltiple donde la señal experimental se expresa como una combinación lineal de los perfiles isotópicos teóricos de cada fragmento generado en la fuente por la pérdida o ganancia de H^+ :

$$A_m^j = \sum_{i=1}^n X_i A_i^j \quad [18]$$

Donde A_m^j es la abundancia observada del compuesto a la masa j ; X_i es la fracción del perfil isotópico del compuesto i y A_i^j es la abundancia teórica del compuesto i a la masa j . Este método basado en regresión lineal fue descrito por primera vez por Brauman¹⁸¹ aplicado al estudio del espectro de masas de compuestos organoclorados y compuestos que contienen Germanio en la fuente de EI. Otro estudio basado en este método fue el llevado a cabo por Lee¹⁸² en el estudio de la fragmentación del colesterol observando una contribución del 96.25 % para el ion $\text{C}_{27}\text{H}_{44}^+$ y 3.75 % para el ion $\text{C}_{27}\text{H}_{43}^+$.

Otro efecto que se observa en la fuente de ionización electrónica (EI) es el cambio en la composición isotópica experimental medida con la cantidad de compuesto inyectado. Este efecto se estudió por primera vez en ácidos grasos y ésteres metílicos¹⁸³ y se debe a una transferencia de un protón en fase gas entre un ion fragmento y una molécula neutra que distorsiona la composición isotópica medida cuando aumenta la concentración de analito. Por eso es de gran importancia el estudio de la fragmentación en la fuente de EI a diferentes niveles de concentración para poder descartar la presencia de este efecto.

Tabla 4: Comparación de las abundancias teóricas y experimentales obtenidas en la fuente de ionización electrónica EI por Moraes y colaboradores¹⁷⁹ para los dos clúster principales del diclorometano.

		Abundancias teóricas		
<i>m/z</i> clúster 1	Exp. Abundancias	CCl^+	$CHCl^+$	CH_2Cl^+
47	0.1001	0.74949	0.00000	0.00000
48	0.0603	0.00811	0.74941	0.00000
49	0.5959	0.23981	0.00819	0.74932
50	0.0290	0.00259	0.23978	0.00828
51	0.2131	0.00000	0.00262	0.23975
52	0.0017	0.00000	0.00000	0.00265
		Abundancias teóricas		
<i>m/z</i> clúster 2	Exp. Abundancias	CCl_2^+	$CHCl_2^+$	$CH_2Cl_2^+$
82	0.0045	0.56779	0.00000	0.00000
83	0.0315	0.00632	0.59771	0.00000
84	0.5353	0.36314	0.00640	0.56762
85	0.0277	0.00404	0.36309	0.00648
86	0.3439	0.05806	0.00409	0.36304
87	0.0058	0.00065	0.05806	0.00415
88	0.0513	0.00000	0.00065	0.05805

A.3.3.2. Fuente de electrospray (ESI)

La clave del gran éxito de la fuente de ionización de electrospray (ESI) comenzó cuando Fenn^{184,185} demostró que se podían obtener iones múltiplemente cargados en proteínas, permitiendo la determinación de su peso molecular en instrumentos cuyo rango de masas estaba limitado por debajo de 2000 Th. Aunque al principio, la fuente de ionización ESI se aplicó fundamentalmente al análisis de proteínas, su uso se extendió rápidamente no solo a otros polímeros o biopolímeros sino al análisis de pequeñas moléculas polares. La fuente de ionización de electrospray (ESI) permite alcanzar una alta sensibilidad, y es muy fácil de acoplar a la cromatografía de líquidos (HPLC), μ HPLC o electroforesis capilar.

El electrospray^{186,187} (Figura 18) se obtiene mediante la nebulización de disoluciones líquidas del analito a través de un capilar metálico en presencia de un fuerte campo eléctrico. La producción de iones mediante ESI se considera que es debido a tres etapas principales: (i) Producción de gotas cargadas en la región cercana a la salida del capilar (positivas o negativas dependiendo del potencial aplicado al capilar), (ii) Formación de gotas cargadas de reducidas dimensiones debido a un fenómeno de repulsión columbimétrica, (iii) Producción de iones en fase gas originados a partir de las pequeñas gotas cargadas.

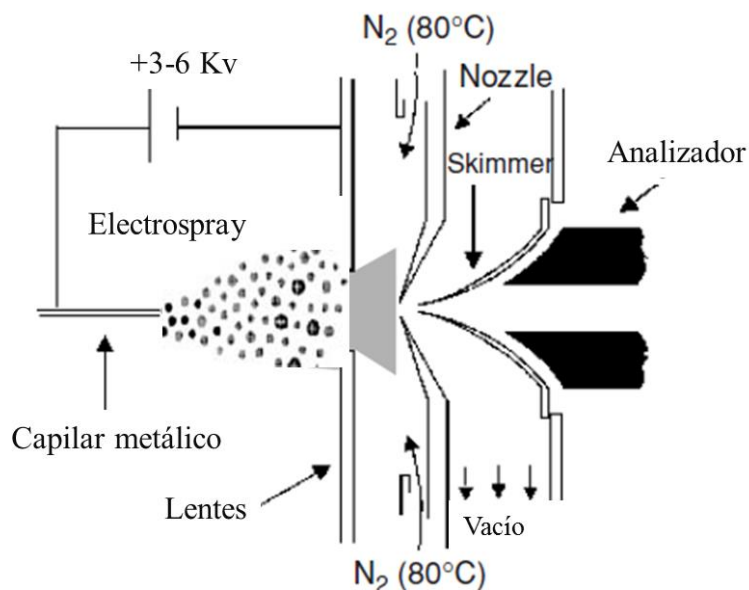


Figura 18: Esquema de la fuente de electrospray (ESI) y acoplamiento al analizador de masas¹⁷⁸.

Se han propuesto dos mecanismos para la formación de iones gaseosos a partir de las pequeñas gotas cargadas. El primero, denominado “*mecanismo de residuo cargado*” fue propuesto por Dole¹⁸⁸ en 1968 y describe el proceso como escisiones secuenciales que conducen a la producción de pequeñas gotitas que poseen una o más cargas pero solo una molécula de analito. Por último, cuando las gotas de disolvente se evaporan, la carga o cargas quedan depositadas sobre la estructura del analito, que da lugar al ion gaseoso más estable. Más recientemente, Iribarne y Thomsom¹⁸⁹ propusieron un nuevo mecanismo basado en la emisión directa de iones gaseosos desde las gotas, después de alcanzar unas ciertas dimensiones. Este proceso se conoce con el nombre de “*mecanismo de evaporación de iones*” y es predominante en gotas cuyo radio es menor de 10 μm .

La fuente de ionización de electrospray (ESI) se considera una fuente suave¹⁹⁰ desde el punto de vista de la fragmentación. En la mayoría de los casos, solo se forma el catión molecular protonado MH^+ (ionización positiva) o el anión molecular desprotonado ($\text{M}-\text{H}^+$). Es posible inducir fragmentación en la fuente cambiando el potencial aplicado a la fuente, pero en la mayoría de los casos la fragmentación inducida es muy pequeña. En ausencia de aductos que se puedan formar por la presencia de ciertos constituyentes en la fase móvil¹⁹¹, el perfil isotópico obtenido con esta fuente de ionización corresponde al compuesto puro sin ninguna otra contribución de ninguna otra forma molecular.

A.3.4. Analizadores de masas

Una vez que se han producido los iones en fase gaseosa, estos tienen que ser separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) que es la propiedad física de los iones, por la cual son separados en un analizador de masas. Existen diferentes tipos de analizadores de masas, cada uno de los cuales posee sus ventajas y sus limitaciones. Atendiendo al modo de adquisición, se pueden dividir en dos grandes clases: (i) Analizadores secuenciales, los cuales transmiten los iones de diferentes masas sucesivamente a lo largo de una escala de tiempo, como ocurre en los analizadores de tipo cuadrupolo. (ii) Analizadores simultáneos que permiten la transmisión simultánea de los iones, como es el caso de los analizadores de tiempo de vuelo.

Las cinco características principales para medir el rendimiento de un analizador son: el rango de masas, velocidad de análisis, transmisión, exactitud de masa y resolución.

* **Rango de masas:** Determina el límite de m/z sobre el cual el analizador de masas puede medir iones.

* **Velocidad de análisis:** Es la velocidad a la que mide el analizador más de un intervalo de masa. Se expresa en unidades de masa por segundo ($U\ s^{-1}$) o unidades de masa por milisegundo ($U\ ms^{-1}$).

* **Transmisión:** Es la relación entre los iones que entran en el analizador y los que llegan al detector. Está relacionada con la sensibilidad.

* **Exactitud de masa:** Es la exactitud de la relación m/z proporcionada por el analizador. Es la diferencia entre la m/z teórica y la medida por el analizador.

* **Resolución:** Es la característica más importante y se define como la capacidad de un analizador para separar iones de relación m/z muy próximas. Se calcula como $M/\Delta M$, donde M es la masa del pico y ΔM es la anchura del pico calculada 10% de su altura. Cuando el pico del compuesto es Gaussiano, la resolución del equipo se calcula fácilmente.

A.3.4.1. Analizador de masas de tipo cuadrupolo (Q)

Los analizadores de cuadrupolo¹⁹² (Q) se componen de cuatro barras de sección circular o idealmente hiperbólica, las cuales deben de ser perfectamente paralelas. A estas barras se les aplica una combinación de voltajes de corriente continua (DC) y radiofrecuencias (RF) (Figura 19). Cuando los iones positivos entran en el espacio entre las barras, el campo creado actúa de filtro seleccionando los iones que llegan al detector. El principio

del funcionamiento del cuadrupolo fue descrito por Paul y Steinwogen en la Universidad de Bonn en 1953. Desde entonces los cuadrupolos se han convertido en instrumentos disponibles en el mercado gracias al trabajo de Shoulders, Finnigan y Story¹⁹³.

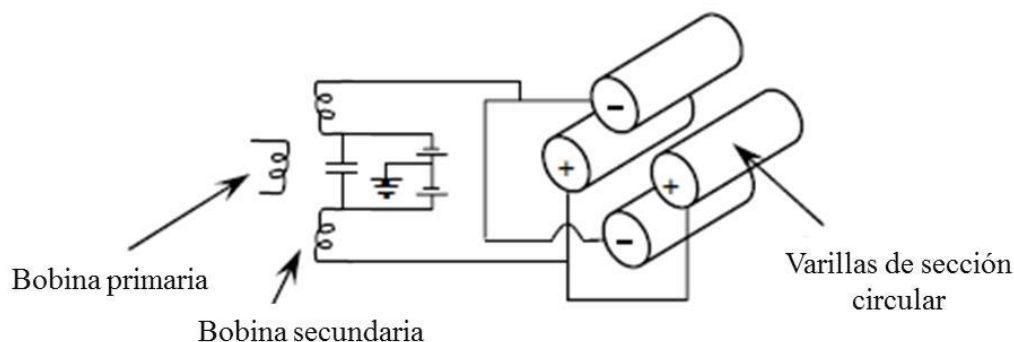


Figura 19: Ilustración del principio eléctrico de superposición de voltajes de corriente continua (DC) y radiofrecuencia (RF) en pares de varillas opuestas¹⁹².

Este tipo de analizador es el más utilizado en la actualidad, siendo instalado en la mayoría de equipos de GC-MS y LC-MS en el análisis de rutina. Sus características más importantes son su sencillez, reproducibilidad, rango de masas hasta aproximadamente m/z 400, buena transmisión de los iones (sensibilidad), mala exactitud de masa, baja resolución (resuelve picos separados una unidad de masa) y una muy buena velocidad de análisis permitiendo monitorizar señales transientes cortas como las obtenidas mediante cromatografía de gases o cromatografía de líquidos.

La capacidad de un analizador de masas de tipo cuadrupolo de medir de una manera exacta las distribuciones isotópicas puede ser evaluada de una manera sencilla mediante la medida de los perfiles isotópicos, y particularmente mediante la contribución de un pico de masa M , en las masas vecinas $M-1$ y $M+1$ ¹⁷³. Para este propósito necesitaremos escoger un compuesto que proporcione un único pico a masa M y con un patrón de fragmentación que asegure un clúster puro. En este sentido, los compuestos orgánicos perfluorinados son los más adecuados ya que no producen fragmentos $M-H$ debido a que no poseen hidrógenos en la molécula. Este es el caso de la perfluorotributilamina (PFTBA), compuesto que se usa tradicionalmente en equipos GC-MS para realizar la calibración de masas y el ajuste de la sensibilidad instrumental.

En la Tabla 5, se muestran la contribución de M a $M-1$ y $M+1$ en distintos iones de PFTBA originados en la fuente EI con diferentes valores de m/z (69, 131, 219, 414, 502)

obtenidos mediante infusión constante de PFTBA durante dos minutos. La contribución experimental a la masa M-1 es medida como la relación de señales (M-1/M) expresada como porcentaje¹⁷³. Como se puede observar se obtienen valores entre 0.39 y 0.68 % en el rango de masas medido, los cuales se pueden atribuir a la cola del pico M hacia la masa baja.

Tabla 5: Determinación de la contribución de la masa M en las masas M-1 y M+1 de la PFTBA usando un equipo GC-MS y la comparación de la contribución experimental en M+1 con los valores teóricos asumiendo solo la contribución natural de ¹³C en la molécula¹⁷³.

Fórmula	M-1/M (%) Experimental	M+1/M (%) Experimental	M+1/M (%) Teórica	M+1/M (%) Diferencia
69 (CF ₃ ⁺)	0.39	1.11	1.08	0.03
131 (C ₃ F ₅ ⁺)	0.49	3.28	3.24	0.04
219 (C ₄ F ₉ ⁺)	0.41	4.34	4.32	0.02
414 (C ₈ F ₁₆ N ⁺)	0.66	9.09	9.01	0.08
502 (C ₉ F ₂₀ N ⁺)	0.68	10.22	10.10	0.12

Por otra parte, el cálculo de la contribución en M+1 no resulta tan sencillo. Tenemos que tener en cuenta que habrá una contribución natural a la masa M+1 debido a la presencia natural de átomos de ¹³C en la molécula. Conociendo las abundancias isotópicas proporcionadas por la IUPAC se puede calcular el valor de esa contribución (Tabla 5). Las diferencias existentes entre los datos teóricos y experimentales son despreciables, por lo tanto no existe contribución de la cola de M en la masa M+1.

Otro efecto observado en los analizadores de cuadrupolo cuando se acoplan a una separación cromatográfica, es lo que se denomina desplazamiento espectral o “*spectral skew*”^{173,194}. Cuando el compuesto de interés eluye de la columna y el cuadrupolo “salta” entre las masas seleccionadas, existe un cierto tiempo requerido por el cuadrupolo para adquirir iones a un determinado valor m/z (tiempo de integración). Durante este tiempo, la señal de otro valor m/z varía según eluye el pico cromatográfico por lo que provoca se originan errores en la medida de la composición isotópica en cada punto del pico cromatográfico. Para evitar esta desviación es necesario seleccionar tiempos de integración pequeños, de aproximadamente 10 ms y utilizar las áreas de los picos cromatográficos para el cálculo de las distribuciones isotópicas.

A.3.4.2. Analizador de masas de sector magnético

El analizador de sector magnético de enfoque simple¹⁹⁵ fue desarrollado por Dempster en 1918. Más tarde, a finales de los años 20, Dempster y Bartky propusieron la

combinación de la dirección y la velocidad en el enfoque de los iones¹⁹⁶, siendo en el año 1934 cuando aparecieron los primeros analizadores de masas de doble enfoque basados en las geometrías de Dempster, Mattauch-Herzog y Bainbridge-Jordan.

En los analizadores de masas de enfoque simple (Figura 20), que solo contienen un sector magnético, el campo magnético separa los iones en función de su momento magnético, de manera que el haz de iones que entra al analizador se dispersa y hace que cada ion tenga una trayectoria circular que dependerá de su relación m/z y del campo magnético aplicado. Por lo tanto para un valor de campo magnético, únicamente los iones con una determinada m/z describirán una trayectoria estable en el sector magnético y llegarán al detector. Cuando se añade un sector electrostático, como ocurre en los analizadores de doble enfoque, este aplica un campo eléctrico perpendicular a la dirección del haz de los iones focalizándolos según su energía cinética.

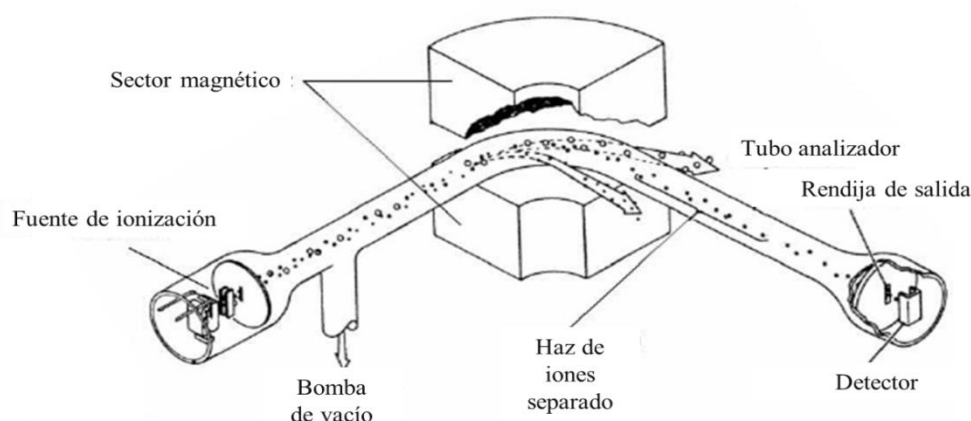


Figura 20: Diagrama esquemático de un analizador de masas de sector magnético¹⁹².

La principal ventaja de los analizadores de sector magnético es su capacidad para trabajar en tres tipos de resolución diferentes: baja ($R=400$), media ($R=4000$) y alta ($R=10000$). Tiene también una buena exactitud de masa, lo que permite que en baja resolución sea muy adecuado para la medida de relaciones isotópicas. Posee una buena transmisión de iones, especialmente en baja resolución proporcionándonos una muy buena sensibilidad.

Sus principales inconvenientes son, su baja velocidad de análisis, un límite de masa bajo que limita el análisis de compuestos de elevado peso molecular, su alto coste y su gran tamaño.

A.3.4.3. Analizadores de masas en tándem (MS/MS)

El primer uso del acrónimo MS/MS fue acuñado para “*mass spectrometry/mass spectrometry*) por William F. Haddon en un simposio organizado por M. L. Gross en Nebraska en 1976. Haddon usó ese término para describir la técnica que provoca la descomposición de un isótopo estable por colisión con moléculas neutras de gas. Otro sinónimo utilizado para MS/MS es espectrometría de masas en tándem..

La espectrometría de masas en tándem^{192, 197} está basada en el uso de un primer analizador que se emplea para seleccionar los iones de interés, una celda de colisión donde se fragmentan los iones seleccionados en el primer analizador, y a continuación un segundo analizador para el análisis de los productos de la fragmentación en la celda de colisión. El análisis por MS/MS se puede llevar a cabo de dos maneras distintas: (i) consecutivamente en el espacio utilizando dos espectrómetros diferentes (sectores magnéticos múltiples o cuadrupolos múltiples) o consecutivamente en el tiempo utilizando el mismo analizador dos veces (trampas iónicas). Los equipos de MS/MS más utilizados son los equipos de triple cuadrupolo (QQQ). En ellos, los iones de interés (M^+) producidos mediante un método de ionización adecuado, son seleccionados en el cuadrupolo Q1. El gas de colisión es inyectado en el cuadrupolo Q2 (celda de colisión) y produce la fragmentación de los iones M^+ . Los iones generados son analizados en el cuadrupolo Q3. Hay cuatro modos posibles en los que se puede utilizar la espectrometría de masas en tándem (Figura 21):

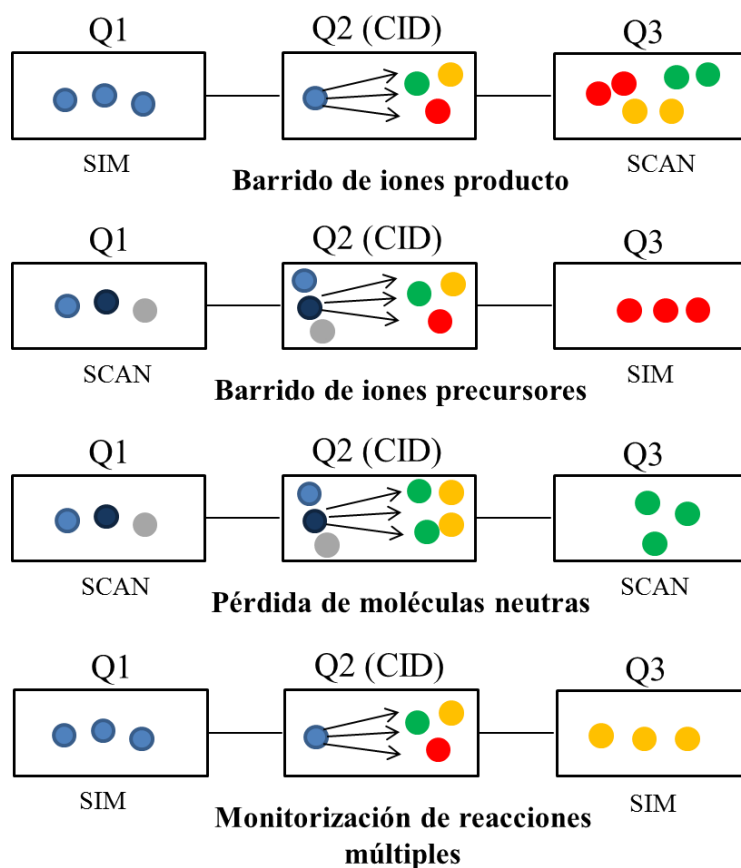


Figura 21: Esquema de los modos de adquisición en espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

* **Barrido de iones producto:** Consiste en la selección de unos iones determinados en el primer analizador de masas, se fragmentan en la celda de colisión y en el segundo analizador de masas se lleva a cabo un barrido de todos los iones resultantes de la fragmentación en la fuente.

* **Barrido de iones precursores:** Consiste en llevar a cabo en el primer analizador un barrido de todos los iones procedentes de la muestra. Todos ellos se fragmentan en la celda de colisión, y en el segundo analizador se seleccionan determinados iones procedentes de la fragmentación en la celda de colisión. Es un modo muy útil como método de diagnóstico cuando el ion producto seleccionado es común y específico para una familia de compuestos.

* **Pérdida de moléculas neutras:** Este método consiste en la selección de un fragmento neutro y detectar todas las fragmentaciones que conducen a la pérdida de ese fragmento. Este método requiere que ambos analizadores realicen un barrido de iones pero con un desplazamiento de masa constante entre los dos. Por ejemplo, para un desplazamiento

de masa a , cuando un ion de masa m pasa a través del primer analizador de masas, la detección ocurre si ese ion ha producido un ion producto de masa $(m-a)$ después de atravesar la celda de colisión.

***Monitorización de reacciones múltiples:** En este modo, en ambos analizadores de masas se seleccionan unos determinados iones. Por lo tanto, los iones seleccionados en el primer analizador solo pueden ser detectados si producen un fragmento determinado a través de una reacción previamente seleccionada. La ausencia de un barrido de iones, permite centrarse en la medida de los iones precursor y producto produciendo un incremento en la sensibilidad y un gran incremento de la selectividad lo que reduce drásticamente las interferencias.

A.3.5. Detectores

La función de un detector en Espectrometría de Masas es la de generar, a partir de los iones de los analitos, una corriente eléctrica que sea proporcional a su abundancia.

Actualmente existen muchos tipos de detectores¹⁹⁸ y su elección depende del diseño del instrumento y de las aplicaciones analíticas que se quieren desarrollar. Existen gran variedad de técnicas para detectar iones, sin embargo dicha detección siempre está basada en su carga, en su masa o en su velocidad. Algunos detectores (Copas de Faraday) están basados en la medición directa de la corriente que se produce cuando un ion golpea una superficie y se neutraliza. Otros, como es el caso del multiplicador de electrones se basan en la transferencia de energía cinética de los iones incidentes por la colisión con una superficie que a su vez genera electrones secundarios, que se amplifican aún más para dar una corriente electrónica. Debido que a la cantidad de iones que salen del analizador en un instante determinado es muy pequeña, es necesaria una amplificación significativa para poder obtener una señal útil. A excepción de la Copa de Faraday, el resto de detectores multiplican la señal mediante efectos cascada. A continuación se detallará el funcionamiento de los dos detectores de iones utilizados dentro de la instrumentación con la que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral.

A.3.5.1. Multiplicador de electrones

El multiplicador de electrones es el detector más utilizado en Espectrometría de Masas, existiendo dos versiones diferentes¹⁹²:

a) *Dinodo discreto*: El multiplicador de electrones utiliza el principio de la emisión secundaria de electrones como efecto de amplificación. Los iones que llegan al

analizador son focalizados al dinodo de conversión, el cual emite electrones en proporción directa con el número de iones con los que es bombardeado. Los electrones que se obtienen del dinodo de conversión son acelerados y focalizados en un segundo dinodo, que emite también electrones secundarios. Como el número de electrones expulsados desde la superficie de cada dinodo es mayor que el número de electrones que inciden en ella, la amplificación se produce a través de un efecto cascada de electrones secundarios de dinodo a dinodo¹⁹⁹ (Figura 22).

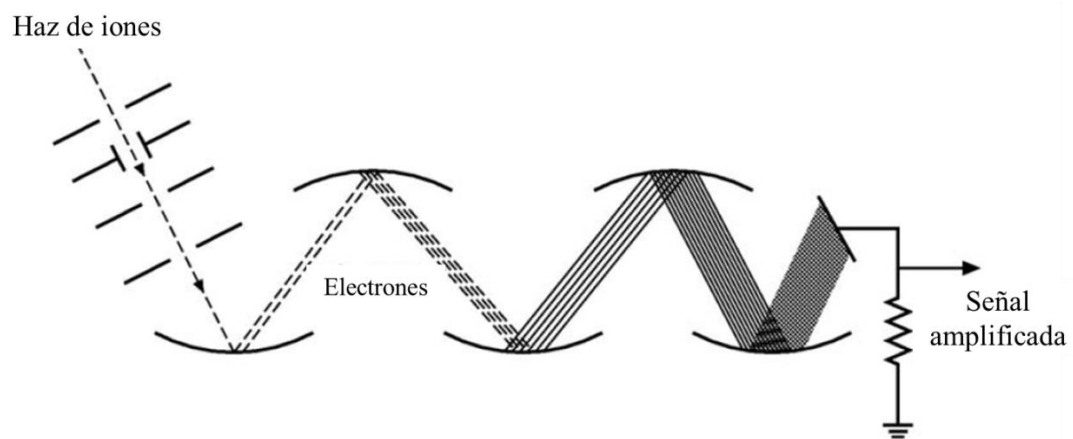


Figura 22: Diagrama conceptual de un multiplicador de electrones de dinodo discreto¹⁹².

b) *Dinodo continuo*: En esta versión se utiliza un dinodo continuo de vidrio dopado con plomo. Este vidrio es resistente eléctricamente, y por tanto proporciona un gradiente eléctrico cuando se conecta a una fuente de alimentación. El diseño que se muestra en la Figura 23 es el más popular para los multiplicadores de electrones modernos. El extremo ancho se ajusta a un ángulo que rápidamente capta el haz de iones en la pared interna y convierte los iones en electrones secundarios. Los electrones secundarios son atraídos hacia el interior por el gradiente positivo, haciendo que cada vez que chocan con la pared, los electrones secundarios adicionales son emitidos dando lugar a la amplificación.

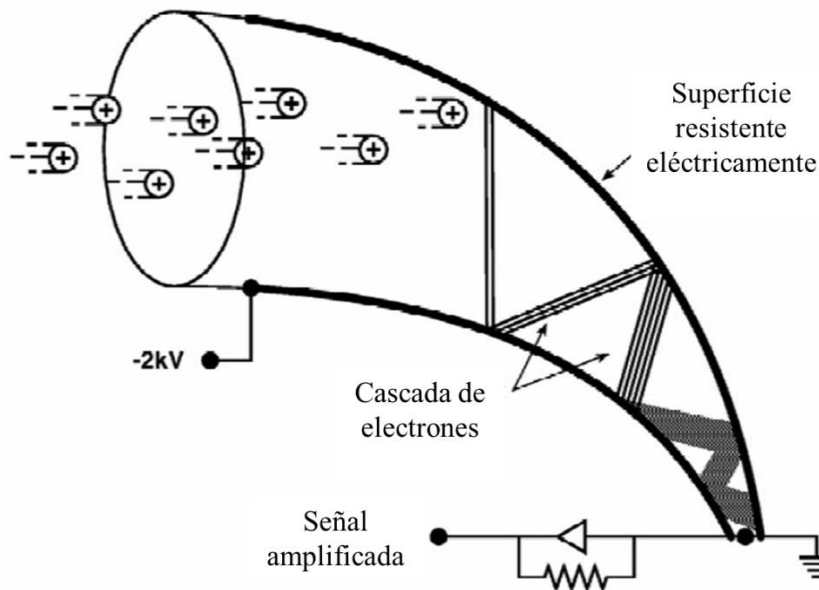


Figura 23: Multiplicador de electrones de dinodo continuo¹⁹².

La rápida respuesta que proporciona esta versión y su alta sensibilidad lo hace muy adecuado para equipos GC-MS y LC-MS. Sus desventajas más importantes son que la ganancia depende del uso y de las condiciones de operación, que la emisión de electrones secundarios en el dinodo depende de la masa, carga, velocidad y naturaleza de los iones, que presentan efectos de saturación y que tienen que estar colocados a 50 cm de un analizador de sector magnético debido a que son sensibles a los campos magnéticos.

A.3.5.2. Copas de Faraday

La Copa de Faraday^{200,201} (Figura 24) está hecha de un cilindro metálico con un pequeño orificio, conectado a tierra a través de un resistor. Los iones alcanzan el interior del cilindro y son neutralizados por electrones al chocar con las paredes, dando lugar a una corriente a través del resistor que se amplifica y se detecta. La respuesta de las Copas de Faraday es independiente de la energía, de la masa o de la naturaleza química de los iones. Son detectores simples, baratos, robustos y fiables. Además proporcionan una gran precisión, sensibilidad constante y bajo ruido eléctrico. Sin embargo, como desventajas destacan su baja sensibilidad y su tiempo de respuesta lento.

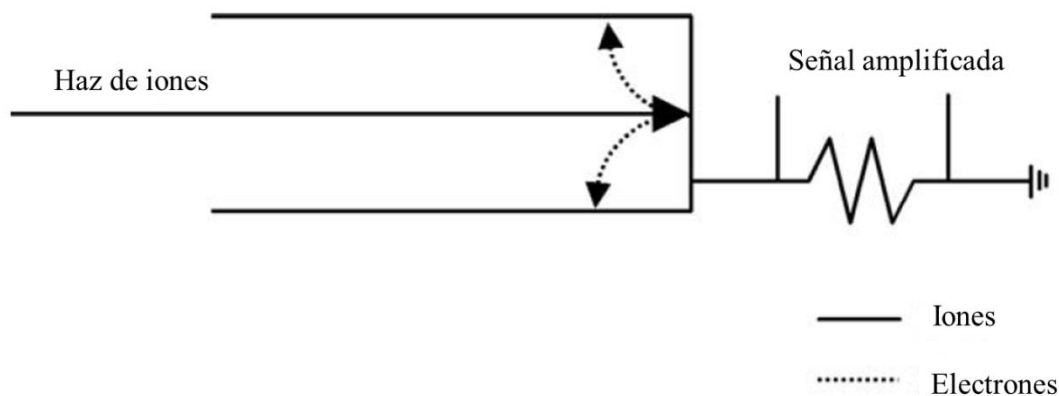


Figura 24: Diagrama esquemático de un detector de Copa de Faraday¹⁷⁸.

Las copas de Faraday han sido ampliamente utilizadas en los comienzos de la espectrometría de masas, pero en la actualidad debido a todas las características mencionadas, su campo de aplicación más importante es la medida de relaciones isotópicas altamente precisas en equipos de tipo multicolector.

A.3.6. Aplicaciones en Metabolómica

La metabolómica, en su forma más ambiciosa, pretende analizar de forma exhaustiva todos los metabolitos conocidos y desconocidos en una muestra dada²⁰². De esta manera se facilita el conocimiento de los mecanismos de los procesos biológicos y bioquímicos y además proporciona una gran ayuda para el estudio y diagnóstico de enfermedades²⁰³. Las investigaciones actuales en metabolómica se pueden dividir en dos enfoques complementarios: “dirigido” (*targeted*) y “no dirigido” (*untargeted*). (i) En el enfoque “dirigido” el estudio se centra en un grupo específico de metabolitos relacionados con una clase de compuestos o una cierta ruta metabólica. (ii) Por otra parte el enfoque “no dirigido” está relacionado con el análisis global de cambios metabólicos en respuesta a una enfermedad o perturbaciones genéticas o ambientales²⁰⁴. La metabolómica se ha aplicado a varias áreas de investigación: estudios ambientales y de estrés biológico²⁰⁵, así como el descubrimiento de nuevos biomarcadores en diversas enfermedades^{206,207}, derivados del estudio de las rutas metabólicas²⁰⁸.

A.3.6.1. Trazadores isotópicos en la investigación de las rutas metabólicas

El aislamiento de isótopos de interés biológico como ^2H , ^{15}N , ^{13}C , ^{18}O por Harold C. Urey^{22,209}, fue el punto de partida para el estudio de las rutas metabólicas llevadas a cabo en los años 30 por Schoenheimer y Rittenberg^{210,211} utilizando isótopos estables

como trazadores de las rutas metabólicas. Después de la II Guerra Mundial, gracias al descubrimiento en el año 1940 del ^{14}C por Rubín y Kamen²¹² y a la disponibilidad comercial de la instrumentación para medir radioactividad, los isótopos estables perdieron terreno en su uso como trazadores respecto a los isótopos radioactivos. El estudio de las rutas metabólicas con isótopos estables disminuyó notablemente durante las siguientes dos décadas debido a que los isótopos radioactivos tenían un bajo coste y una medida más sencilla en comparación con los isótopos estables²¹³. Los isótopos radioactivos se utilizaron en la investigación de rutas metabólicas, tanto en estudios del metabolismo de la glucosa²¹⁴, de los carbohidratos²¹⁵ o de diferentes aminoácidos²¹⁶. También en estudios en células cancerígenas²¹⁷, estudio de diferentes tipos de enfermedades^{218,219} e incluso en el impacto de algunos fármacos en el metabolismo²²⁰.

A partir de los años 70-80 y en las siguientes dos décadas los isótopos estables fueron progresivamente reemplazando a los isótopos radioactivos debido al auge de nuevas técnicas de espectrometría de masas (GC-MS/LC-MS) menos costosas y a la peligrosidad de trabajar con isótopos radioactivos. Los primeros estudios “in vivo” en humanos del metabolismo de la glucosa²²¹ demostraron el potencial del uso de isótopos estables y Espectrometría de Masas en metabolómica. Durante estos años los isótopos estables se aplicaron en el estudio de nuevas rutas metabólicas^{222, 223, 224}, diferentes tipos de metabolismo^{225,226}, efectos metabólicos del cáncer²²⁷, estudios farmacocinéticos²²⁸, así como en el estudio de los trastornos metabólicos hereditarios²²⁹.

Sin embargo, el gran auge del uso de isótopos estables en la investigación de rutas metabólicas se produjo a comienzos de este siglo XXI debido a la disponibilidad de una gran variedad de sustratos enriquecidos en ^{13}C o ^{15}N (Glucosa, Glutamina, aminoácidos, acetato, ácidos grasos...).

Los campos de aplicación de isótopos estables en estudios metabólicos son los siguientes:

a) Confirmar o descubrir nuevas rutas metabólicas^{230, 231, 232, 233}. Por ejemplo, se descubrió una nueva ruta metabólica, independiente de Treonina, en la síntesis de Isoleucina en cianobacterias utilizando 2- ^{13}C Glicerol y observando el marcaje producido en Treonina, Isoleucina y Leucina²³². Otro ejemplo es el descubrimiento de nuevas rutas metabólicas en el área del metabolismo del colesterol y los ácidos grasos que permiten entender la relación entre una determinada enfermedad y la dieta seguida por el paciente²³³.

b) Estudios en el campo de la ingeniería metabólica, donde el marcaje en ^{13}C puede determinar la contribución de una determinada ruta metabólica en la síntesis de un producto. Por ejemplo, un estudio reciente concluye que el marcaje en ^{13}C puede examinar un ciclo glucolítico no oxidativo en E.Coli, que descompone la glucosa en acetil-coA sin pérdida de carbono²³⁴.

c) Comprensión de las rutas metabólicas y sus regulaciones. Posee una gran importancia en biología y biomedicina^{235,236}. Un ejemplo muy destacado son las células cancerígenas, las cuales poseen diferencias metabólicas muy importantes respecto a las células sanas como por ejemplo la proliferación celular, un incremento en la invasión local, metástasis^{237,238} o lo que se conoce como efecto Warburg que ocurre en mucha clase de tumores cuando las células cancerígenas consumen un exceso de glucosa²³⁹. En ellas, el marcaje en ^{13}C puede identificar cambios en las rutas metabólicas que conducen a fenotipos metabólicos alterados en células cancerígenas de diferentes tipos de cáncer^{240,241,242}. Estas diferencias metabólicas en las células cancerígenas son las que permiten estudiar su respuesta a diferentes tipos de fármacos^{243,244,245,246} y obtener resultados prometedores para futuras terapias dirigidas en la lucha contra el cáncer.

A.3.6.2. Experimento de marcaje con isótopos estables (^{13}C) en el estudio de las rutas metabólicas

Se pueden llevar a cabo diferentes experimentos con isótopos estables²⁴⁷ (principalmente ^{13}C), para la detección de metabolitos que se utilicen para el establecimiento de flujos metabólicos intracelulares en diversos organismos o el estudio de nutrientes celulares, comunidades microbianas e investigación en sistemas huésped-patógeno²⁴⁸.

De todos ellos, el más importante es el que se conoce como "Huella dactilar de ^{13}C " (^{13}C -fingerprint)²⁴⁸: Esta técnica está basada en el uso de un substrato específico enriquecido en ^{13}C que se añade a un cultivo celular en crecimiento. A continuación, esa "etiqueta de ^{13}C " se transfiere a los metabolitos a través de las diferentes rutas metabólicas y como consecuencia algunos metabolitos presentarán una composición isotópica alterada a las diferentes posibles incorporaciones de ^{13}C . Mediante el análisis de la distribución isotópica en los metabolitos, se puede rastrear el camino desde el substrato a los diferentes productos revelando así la ruta metabólica seguida. Esta técnica se ha usado en el descubrimiento de nuevas rutas metabólicas que podrían estar mal trazadas en el pasado, dilucidar nuevas funciones enzimáticas, investigar el

metabolismo celular en las comunidades microbianas y en la identificación de cambios metabólicos en diferentes tipos de tumores²⁴⁸.

En la Figura 25 se muestra las distintas etapas del protocolo que describe este diseño de marcaje con ^{13}C en la investigación de rutas metabólicas y que se explican a continuación:

- 1) *Adición de un substrato marcado en ^{13}C a un cultivo celular en crecimiento*²⁴⁹.
- 2) *Extracción de los metabolitos intracelulares*²⁵⁰.
- 3) *Separación de los metabolitos intracelulares*: Se puede llevar a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC)²⁵¹ o mediante cromatografía de gases (GC)²⁵². La segunda es la más utilizada en estudios de metabolómica debido a su mayor poder de resolución cromatográfico.
- 4) *Medida de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C* : Existen actualmente dos técnicas para llevar a cabo esta medida. Por una parte la resonancia magnética nuclear (RMN)^{253,254}, sin embargo esta técnica es muy poco sensible, requiere grandes cantidades de muestra y un equipamiento caro. Por otro lado, la espectrometría de masas (MS)^{255,256} que es mucho más accesible, más barata y proporciona una mayor sensibilidad en la detección del marcaje en ^{13}C en los metabolitos intracelulares.
- 5) *Establecimiento de las rutas metabólicas a partir de la distribución isotópica medida mediante espectrometría de masas*. La etapa clave de este protocolo es la medida exacta y precisa de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C que nos permita el establecimiento de las rutas metabólicas con una gran precisión. Los diferentes métodos de medida de la distribución isotópica mediante espectrometría de masas se explicarán con detalle en el siguiente apartado.

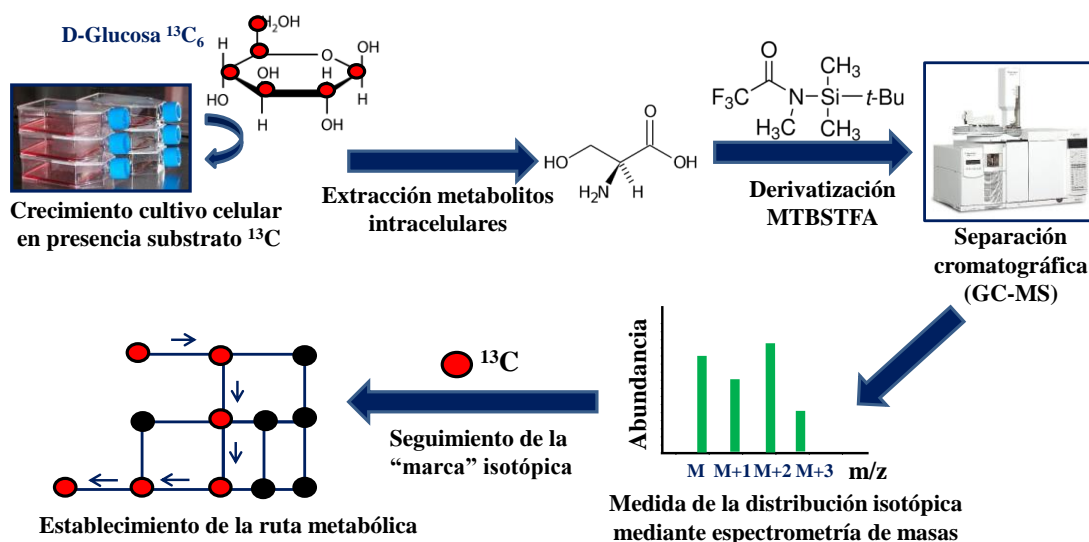


Figura 25: Protocolo del experimento de marcaje con ^{13}C (" ^{13}C -fingerprint") en la investigación de rutas metabólicas.

A.3.6.2.1. Medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares mediante espectrometría de masas.

Existen diferentes metodologías para la medida de la distribución isotópica mediante espectrometría de masas. La primera y la más utilizada se basa en obtener la distribución isotópica a partir de la integración de las áreas de pico de los iones cromatográficos correspondientes a los diferentes isotopólogos expresados como fracciones molares²⁵⁷. Sin embargo, en la mayoría de los casos^{240,253,258,259} las áreas de pico de los iones cromatográficos deben ser corregidas debido a la contribución natural del ^{13}C . La corrección clásica, desarrollada por Bienann²⁶⁰, asume que la contribución natural del ^{13}C en el isotopólogo natural del compuesto es la misma que en los diferentes isotopólogos marcados en ^{13}C , y únicamente requiere la medida de la composición isotópica del compuesto natural, sin embargo, esta corrección clásica sobreestima la contribución natural del ^{13}C en isotopólogos con un número alto de átomos marcados en ^{13}C , debido a que a medida que se añaden átomos de ^{13}C al compuesto la contribución de ^{13}C natural disminuye. Para resolver este problema, las correcciones que se usan en la actualidad están basadas en métodos computacionales o en matrices de corrección^{261,262,263,264}.

Otra metodología ampliamente utilizada en la medida de la distribución isotópica está basada en el concepto de regresión lineal múltiple desarrollado por Brauman¹⁸¹ en 1966. En estos métodos basados en regresión lineal múltiple^{182,265} se define un sistema lineal

de ecuaciones, en el cual las abundancias experimentales en la mezcla se relacionan con las abundancias teóricas y con las fracciones molares de cada uno de los diferentes isotopólogos presentes en la mezcla. En esta metodología solo se mide la abundancia isotópica teórica del isotopólogo natural, que las abundancias teóricas de los diferentes isotopólogos marcados en ^{13}C es la misma que la del isotopólogo natural únicamente incrementada en masa. Además, es necesario llevar a cabo una corrección matemática relacionada con la incorporación de átomos de ^{13}C a la molécula, ya que a medida que aumenta el número de átomos de ^{13}C en la molécula, la cantidad de ^{13}C de abundancia natural disminuye en la molécula, y por tanto esa contribución del ^{13}C natural a las masas M+1 y M+2 decrece en los diferentes isotopólogos marcados en ^{13}C .

Una última metodología está basada en el cálculo de la distribución isotópica completa incluidos los isotopómeros posicionales mediante GC-MS, GC-MS-MS y LC-MS-MS. Los métodos basados en GC-MS, conllevan importantes esfuerzos desde el punto de vista experimental, ya que se requiere la síntesis y el análisis de varios derivados diferentes de los compuestos a analizar^{266,267} o tediosos procedimientos experimentales basados en varias etapas de purificación y conversión química de los analitos^{268,269}. Mientras que los métodos basados en GC-MS-MS y LC-MS-MS requieren la utilización de complicados softwares matemáticos^{270,271,272}.

En un reciente estudio basado en la medida de la distribución isotópica completa en el aspartato²⁷³ mediante MS/MS y regresión lineal múltiple, las abundancias isotópicas teóricas de los isotopólogos natural y marcados en diferentes átomos de ^{13}C se calcularon utilizando una distribución binomial, teniendo en cuenta las abundancias isotópicas naturales de todos los elementos presentes en la molécula y asumiendo el enriquecimiento en ^{13}C proporcionado por el fabricante.

A.3.6.3. Trazadores isotópicos en el estudio de la biosíntesis de proteínas

Los primeros estudios de la biosíntesis de proteínas fueron llevados a cabo por Schoenheimer en los años 40 utilizando isótopos estables²⁷⁴. Para ello Schoenheimer inyectó Glicina y Leucina marcadas en ^{15}N en ratas adultas y observó como esos aminoácidos marcados se incorporaban rápidamente en las proteínas de gran cantidad de tejidos. Todos los estudios llevados a cabo por Schoenheimer fueron publicados por sus colaboradores en un pequeño libro en el año 1942 después de su repentina muerte²⁷⁵ (Figura 26). Estos estudios permitieron la aparición en las décadas siguientes de

numerosos estudios sobre la biosíntesis de proteínas tanto en células bacterianas²⁷⁶, células de mamíferos²⁷⁷ o en plantas²⁷⁸.

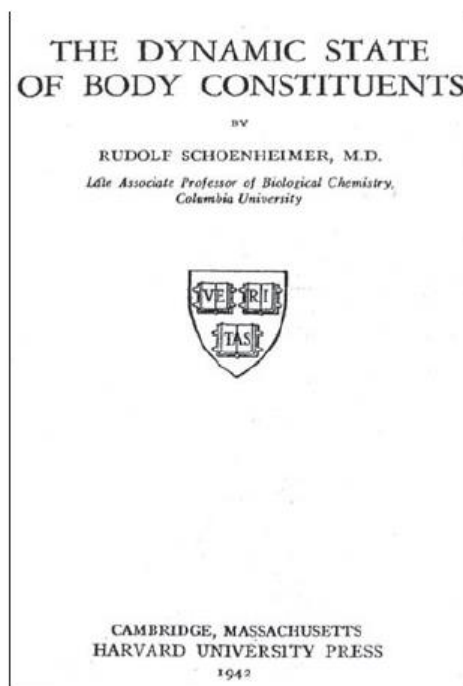


Figura 26: Portada del libro que recoge los estudios de Schoenheimer editada por sus colaboradores poco después de su prematura muerte²⁷⁵.

No sería hasta los años 80 cuando el estudio de la biosíntesis de proteínas comenzó a ser sumamente interesante para científicos de una gran variedad de disciplinas debido a que es clave para comprender la regulación de la expresión de las proteínas en las células²⁷⁹, ya que la expresión de una proteína está basada en la relación entre su síntesis y degradación. Por lo tanto la biosíntesis de proteínas es un indicador de su importancia funcional.

Existen métodos que utilizan isótopos radioactivos para la medida de la biosíntesis de proteínas. Por ejemplo, en el método desarrollado por Garlick y colaboradores en el que se utiliza ³H-Fenilalanina²⁸⁰ midiendo la radioactividad incorporada a la proteína. Otro método basado en el uso de isótopos radioactivos fue el llevado a cabo por Gerner y colaboradores en el cual usan ³⁵S-Metionina²⁸¹. Una combinación de la detección fluorescente de las proteínas marcadas radioactivamente y una auto-radiografía en dos dimensiones de los geles permiten cuantificar la incorporación de ³⁵S. Sin embargo, el uso de isótopos radioactivos ha sido gradualmente reemplazado por métodos que usan isótopos estables^{282,283,284,285}, en los cuales aminoácidos marcados en ²H, ¹³C o ¹⁵N son

los más utilizados como trazadores en combinación con una detección por espectrometría de masas.

El uso de isótopos estables es actualmente la estrategia más utilizada para la medida de la biosíntesis de proteínas y está basada en la comparación del marcaje incorporado a la proteína con el marcaje presente inicialmente en lo que se conoce como “pool” precursor. Generalmente se administran aminoácidos marcados (^2H , ^{13}C , ^{15}N) y se mide su incorporación a la proteína de interés²⁸⁶. La incorporación del marcaje a las proteínas es muy difícil de conocer debido a que el “pool” precursor a partir del cual se sintetizan las proteínas posee numerosas fuentes de aminoácidos naturales (intracelulares, extracelulares o libres), lo cual hace muy complicado conocer el porcentaje de aminoácido natural y marcado presente en el “pool precursor”²⁸⁷ por lo que la se requiere el desarrollo de metodologías específicas.

Los dos principales parámetros que se tienen que calcular en estos estudios son el enriquecimiento en el “pool precursor” y la cantidad de proteína formada durante el procedimiento de marcaje. En los primeros estudios basados en isótopos estables, el cálculo del enriquecimiento en el “pool” precursor se llevaba a cabo de una manera directa a través de medidas del aminoácido libre en sangre, las cuales no eran del todo fiables debido a que los “pools” de aminoácidos a partir de los cuales se sintetizan las proteínas no se encuentran normalmente en equilibrio isotópico con el plasma lo que dificulta su medida directa²⁸⁶. Por lo tanto, el cálculo fiable del enriquecimiento en el “pool” precursor se convirtió en el principal problema en estos estudios en las siguientes décadas.

Por lo tanto, el principal objetivo en los estudios de biosíntesis de proteínas utilizando isótopos estables es el cálculo exacto y fiable del enriquecimiento en el “pool” precursor (p). Para ello, se han desarrollado dos procedimientos para el estudio *in vivo* de la biosíntesis de proteínas:

1) *Métodos basados en la adición de agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$)*^{284,288,289}: En estos métodos después de administrar $^2\text{H}_2\text{O}$, ésta se equilibra con todo el agua presente en el cuerpo humano. A continuación los hidrógenos de la alanina son intercambiados por ^2H y el enriquecimiento en ^2H de la alanina en el plasma es usado como el enriquecimiento del “pool” precursor (p). La cantidad de proteína formada durante el procedimiento de marcaje se calcula a partir de la relación entre el enriquecimiento de la alanina en la proteína y el enriquecimiento de la alanina en el cuerpo humano.

2) “Mass isotopomer distribution analysis (MIDA)”. Este método se utilizó por primera vez en el estudio de la síntesis de ácidos grasos, colesterol o glucosa^{290, 291, 292}, empleándose posteriormente en investigaciones sobre la biosíntesis de proteínas, desarrollándose un gran número de aplicaciones^{283,293.294,295}.

“MIDA” es un método basado en el uso de la combinatoria de probabilidades, donde los aminoácidos presentes en el “pool” precursor se combinan para formar una proteína la cual contiene al menos tres subunidades del aminoácido que se añade marcado en ^{13}C o en ^{15}N . Debido a que el “pool” precursor está formado por una mezcla de aminoácido natural y aminoácido marcado que se ha administrado, la proteína que se forme será una mezcla de diferentes especies: especies con todos los aminoácidos naturales; especies con un aminoácido marcado; especies con dos aminoácidos marcados, etc... cuya probabilidad vendrá descrita por la distribución binomial de probabilidades en función del enriquecimiento en el “pool” precursor (Figura 27). La estrategia general para aplicar “MIDA” a proteínas es generar a partir de la proteína, un péptido que contenga al menos dos repeticiones del aminoácido administrado. Este péptido representará la síntesis de la proteína objeto de estudio.

El principal problema del procedimiento de MIDA reside en los complejos cálculos matemáticos que involucra^{283,294}. Para el cálculo del enriquecimiento en el “pool” precursor”, en primer lugar usando un algoritmo computacional se calculan las distribuciones isotópicas teóricas del péptido de estudio en un rango de enriquecimientos diferentes en el “pool” precursor. A continuación, se substraen la distribución isotópica del isotópulo natural con el objetivo de calcular lo que se conoce como *“abundancias por exceso”*. Finalmente, las abundancias por exceso se representan frente al enriquecimiento en el pool precursor, y los datos se ajustan a una ecuación polinómica.

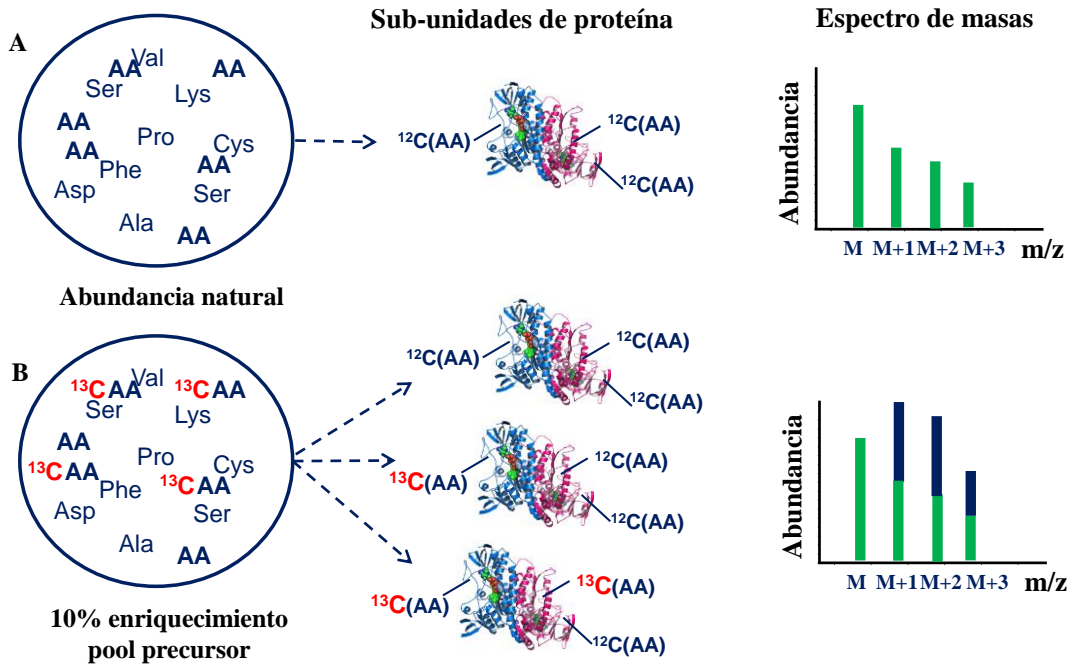


Figura 27: Ilustración del principio del MIDA (“mass isotopomer distribution analysis”). A) Proteína formada y su espectro de masas correspondiente cuando el pool precursor está formado por subunidades de abundancia natural. B) Diferentes especies de proteína formada con 0, 1, 2....subunidades marcadas cuando tenemos un 10% de enriquecimiento en el pool precursor, donde la probabilidad de encontrar cada una de ellas vendrá dada por la distribución binomial de probabilidades. Se observa como el espectro de masas de la proteína se modifica respecto al espectro de masas de la proteína de abundancia natural.

B. OBJETIVOS

El empleo de compuestos orgánicos enriquecidos y espectrometría de masas ha sido cada vez más frecuente durante los últimos tiempos debido a la gran popularidad y aceptación de las técnicas de espectrometría de masas y de la cada vez más frecuente oferta de compuestos orgánicos enriquecidos.

En la Química Clínica, el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS) es una técnica analítica ampliamente usada para la certificación de materiales de referencia y en ejercicios de intercomparación. Está basada en la utilización de calibrados metodológicos donde el trazador se adiciona en una cantidad constante de manera análoga a un patrón interno. Esto condiciona su aplicación al análisis de rutina debido a que implican procedimientos demasiados largos en el tiempo, imposibles de aplicar al análisis de rutina. Por tanto, se requieren procedimientos alternativos basados en IDMS que impliquen la eliminación del calibrado con el correspondiente ahorro de coste y tiempo, posibilitando su aplicación en los laboratorios clínicos de rutina y además en los que estén corregidas todas las posibles fuentes de error (como es el caso de posibles interconversiones a lo largo del procedimiento de tratamiento de muestra) de manera que puedan ser evaluados como nuevos métodos de referencia.

En Metabolómica, el estudio tanto de la regulación y comprensión de las rutas metabólicas, como de la biosíntesis de proteínas utilizando compuestos enriquecidos isotópicamente, una medida exacta y precisa de la distribución isotópica es esencial. La medida de la distribución isotópica en la investigación de las rutas metabólicas implica métodos basados en la integración de las áreas de pico de los diferentes isotopólogos o basadas en regresión lineal múltiple en los cuales se tienen que llevar a cabo complejos cálculos matemáticos para la corrección natural del ^{13}C , mientras que en la biosíntesis de proteínas los cálculos implican complejos y tediosos procedimientos matemáticos que requieren el uso de ajustes polinómicos. Por lo tanto se requiere también el desarrollo de metodologías alternativas simples, novedosas, rápidas, exactas y precisas para el campo de la Metabolómica en estudios basados en el empleo de compuestos enriquecidos isotópicamente.

Por todo ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en el **desarrollo de metodologías analíticas basadas en el uso de compuestos orgánicos enriquecidos isotópicamente para su aplicación en Química Clínica y la Metabolómica.**

Metodológicamente este objetivo general ha sido abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de una metodología para la determinación de creatinina en muestras de suero humano interferidas por bilirrubina mediante dilución isotópica y GC-EI-MS.
2. Determinación simultánea de creatina y creatinina en suero humano mediante HPLC-ESI-MS/MS utilizando doble trazador isotópico ($^{13}\text{C}_1$ -Creatinina y $^{13}\text{C}_2$ -Creatina) que permita corregir la posible interconversión creatina-creatinina.
3. Desarrollo y validación de una metodología para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares en líneas celulares normales y de cáncer de próstata mediante GC-MS y regresión lineal múltiple.
4. Desarrollo de una estrategia de cálculo novedosa, rápida y sencilla para la medida de la biosíntesis de proteínas mediante MIDA basada en regresión lineal múltiple.

C. EXPERIMENTAL

C.1. INSTRUMENTACIÓN

C.1.1. GC-MS y GC-MS/MS

A lo largo de la esta Tesis Doctoral se utilizaron los equipos GC-MS y GC-MS/MS que constan de un cromatógrafo de gases modelo 6890N y 7890A con un inyector Split/splitless (con o sin división de flujo), equipados ambos con una fuente de ionización electrónica (EI) y acoplados a un espectrómetro de masas 5975B y 7000, respectivamente.

Para las separaciones cromatográficas se utilizaron dos columnas de baja polaridad: Una columna HP5-MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase de estacionaria (5% fenil, 95% polidimetilxilosano) que se utilizó para el análisis de creatinina, y una columna DB5-MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase de estacionaria (5% fenil-metil, 95% polidimetilxilosano) utilizada para el análisis de los metabolitos intracelulares derivados del metabolismo de la glucosa). El cromatógrafo de gases se acopla a la fuente de ionización electrónica a través de una línea de transferencia a 280°C a través de la cual se hace pasar el capilar. La Figura 28 muestra el esquema del equipo GC-MS utilizado en esta Tesis Doctoral.

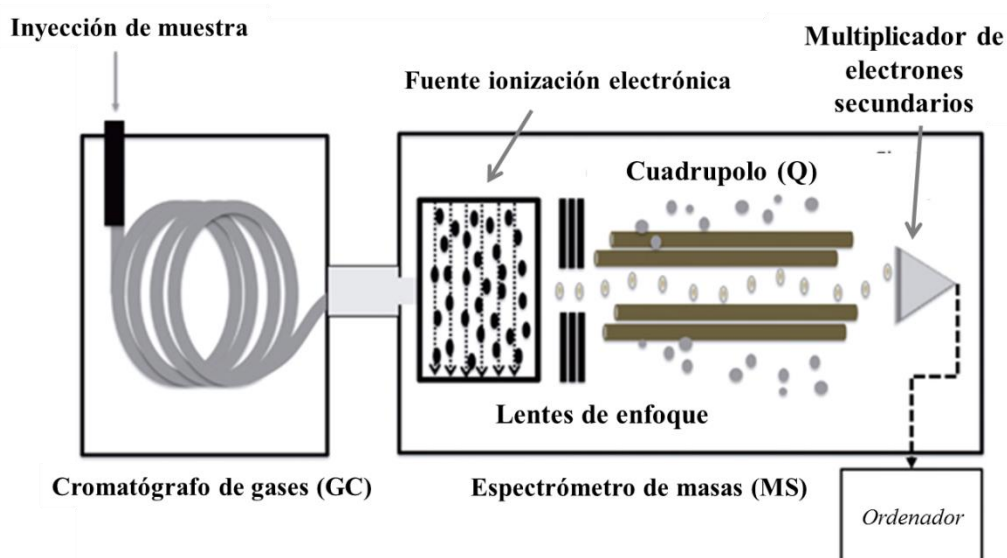


Figura 28: Esquema del equipo GC-MS de tipo cuadrupolo que consta de un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N y un espectrómetro de masas modelo Agilent 5975B.

Para la calibración del espectrómetro de masas se utiliza Perfluorobutilamina (PFTBA) que permite la calibración del equipo en un amplio intervalo de masas, siendo los picos más intensos los correspondientes a las masas 69, 218 y 502. Mediante el procedimiento "autotune" se ajustan automáticamente los parámetros relativos a la calibración de masas, extracción, enfoque, aceleración y detección de los iones, para que se obtenga la mayor sensibilidad y una adecuada resolución.

C.1.2. HPLC-ESI-MS/MS

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies). Para llevar cabo la separación de creatina y creatinina se utilizó una columna de intercambio catiónico Zorbax 300SCX (4.6 mm x 250 mm x 5 μ m), mientras que para el análisis de péptidos se utilizó una columna de fase reversa Aeris Peptide XB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.7 μ m). Las fases móviles utilizadas en el análisis de creatina y creatinina fueron agua con 20 % metanol y 0.1 % de ácido fórmico y acetonitrilo con un 20 % metanol, 0.1 % de ácido fórmico y 10 mM de acetato amónico. El cromatógrafo de líquidos se acopla a un analizador de masas de triple cuadrupolo 6460 (Agilent Technologies) con una fuente de ionización con tecnología "jet stream".

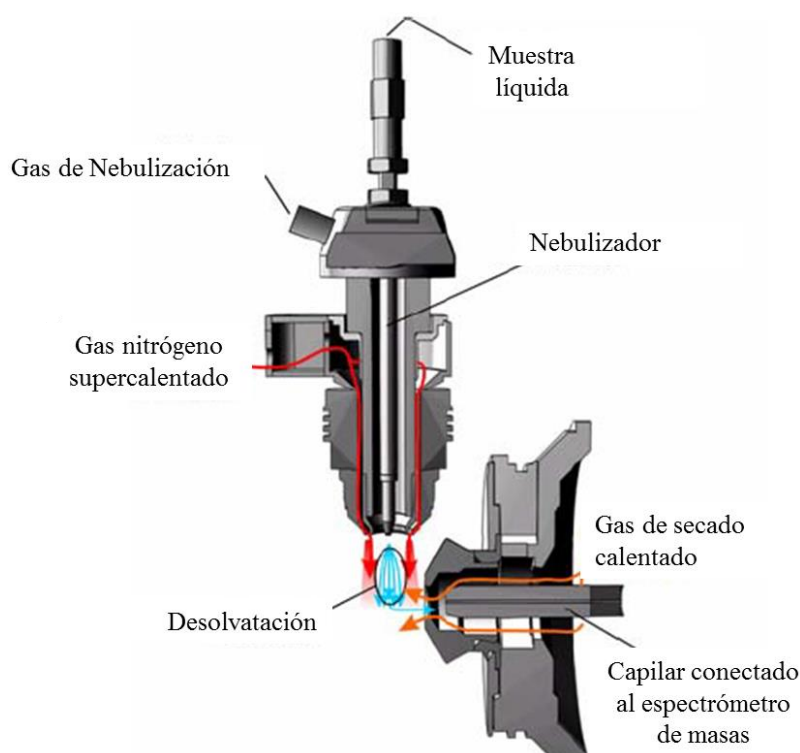


Figura 29: Esquema de la fuente de ionización de electrospray con tecnología "jet stream".

Como se observa en la Figura 29. En esta tecnología “*jet stream*” la adición de gas nitrógeno colineal, concéntrico y súper calentado a la entrada del inyector mejora significativamente la desolvatación de los iones del electrospray y conduce a un aumento de la relación señal/ruido proporcionando máxima sensibilidad del orden de los femtogramos para gran cantidad de compuestos.

En el analizador de masas (Figura 30), los iones pasan a través del primer cuadrupolo, los cuales son directamente enviados a la celda de colisión. Es llamada típicamente “segundo cuadrupolo”, pero en realidad es un hexapolo relleno de gas nitrógeno, la cual posee una aceleración axial que nos permite un análisis MS/MS de alta velocidad. Los iones fragmento formados en la celda de colisión son enviados al tercer cuadrupolo para una segunda etapa de filtrado que permite aislar y analizar los iones producto respecto a los iones precursores.

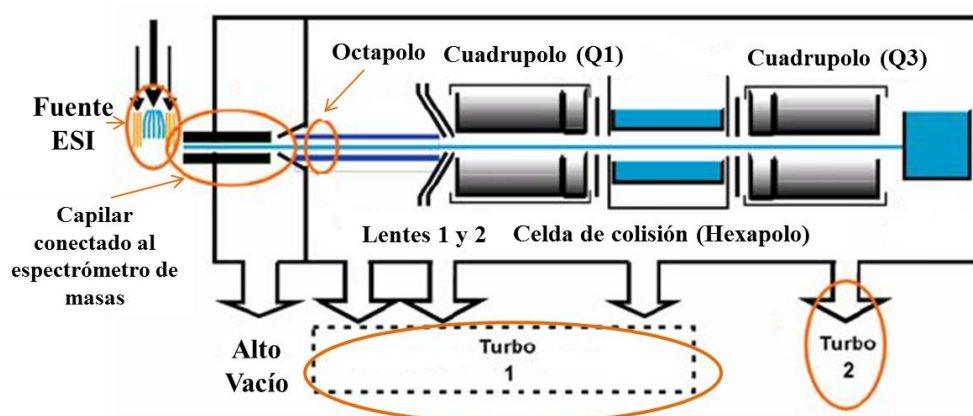


Figura 30: Diagrama esquemático del analizador de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460.

C.1.3. GC-C-IR/MS

El equipo GC-C-IR/MS utilizado en esta Tesis Doctoral, que se muestra en la Figura 31, está formado por un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo) equipado con un inyector Split/splitless, una interfase GC-Isolink y una interfase universal Conflo IV, con un reactor de combustión formado por Ni/CuO/Pt a 1000°C. Esta acoplado a un analizador de masas de sector magnético Delta V con el que se obtendrá una medida de las relaciones isotópicas con una alta sensibilidad y una excelente linealidad y estabilidad, además de permitir la posibilidad de un análisis on-line de H₂ (Figura 32).

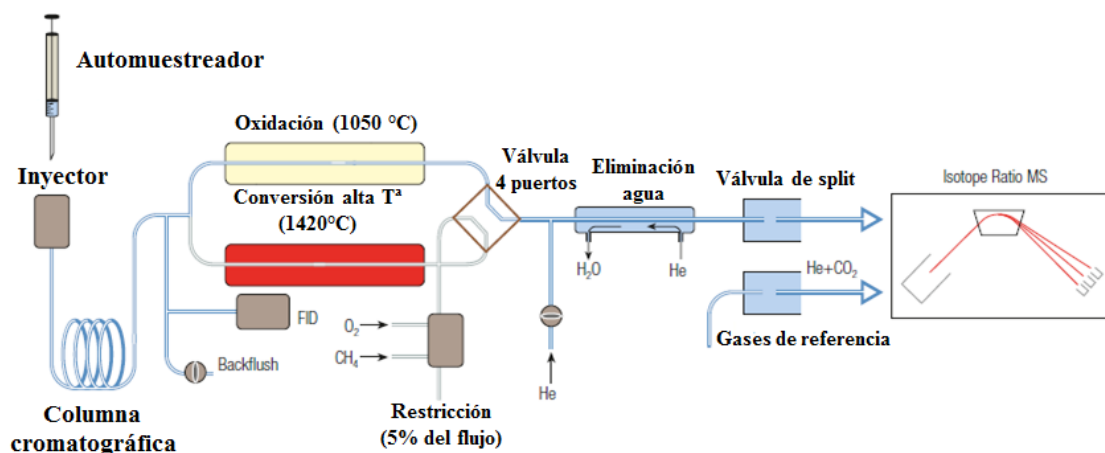


Figura 31: Esquema del equipo GC-C-IRMS (Thermo) utilizado en esta Tesis Doctoral.

La energía que se aplica a la fuente de ionización es de 124 eV, y utiliza dos copas de Faraday para la detección de CO₂ a las relaciones m/z 44 y 45. La señal de la relación m/z 45 se encuentra cien veces amplificada.

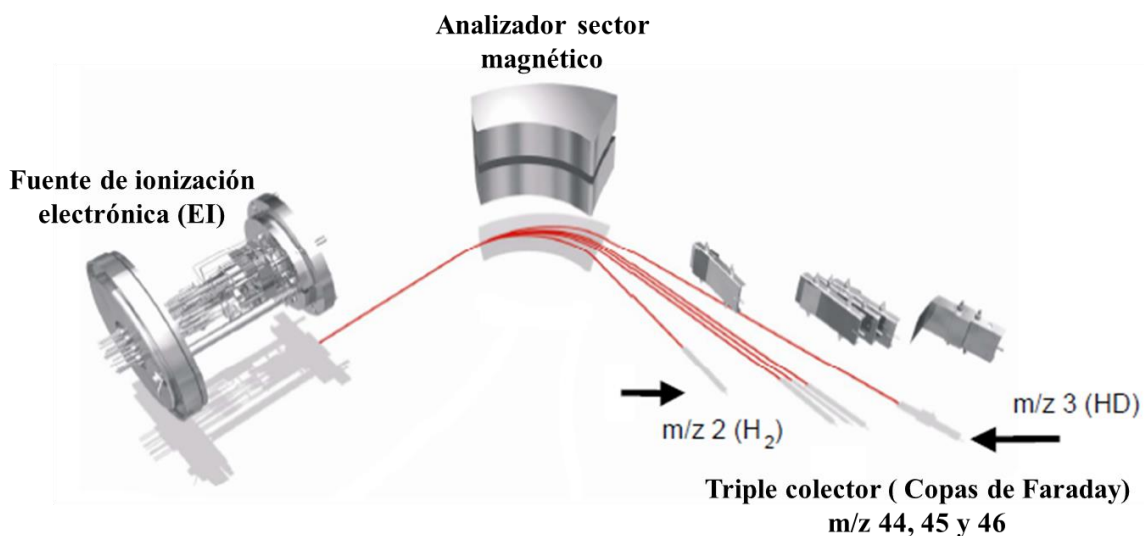


Figura 32: Analizador de masas de sector magnético Delta V que permite medir las relaciones isotópicas con alta sensibilidad y linealidad.

C.1.4. Analizador Roche Cobas C711

Para llevar a cabo la determinación de creatinina mediante los métodos de Jaffé y enzimático Creatinina Plus se utilizó un analizador modular Cobas C711. Consta de diferentes módulos: 1): Modulo Cobas ISE el cual está formado por un electrodo de referencia y tres electrodos ion-selectivos de flujo continuo para la determinación de

Na⁺, K⁺ y Cl⁻. Puede ofrecer un rendimiento de 1800 test por hora. 2): Un módulo Cobas C701 (Figura 33) que permite llevar a cabo determinaciones fotométricas de una amplia gama de analitos pudiendo tener un rendimiento de hasta 2000 test por hora. El módulo C701 está equipado con el sistema reagent manager y un sistema de carga/descarga para los pack de reactivos.

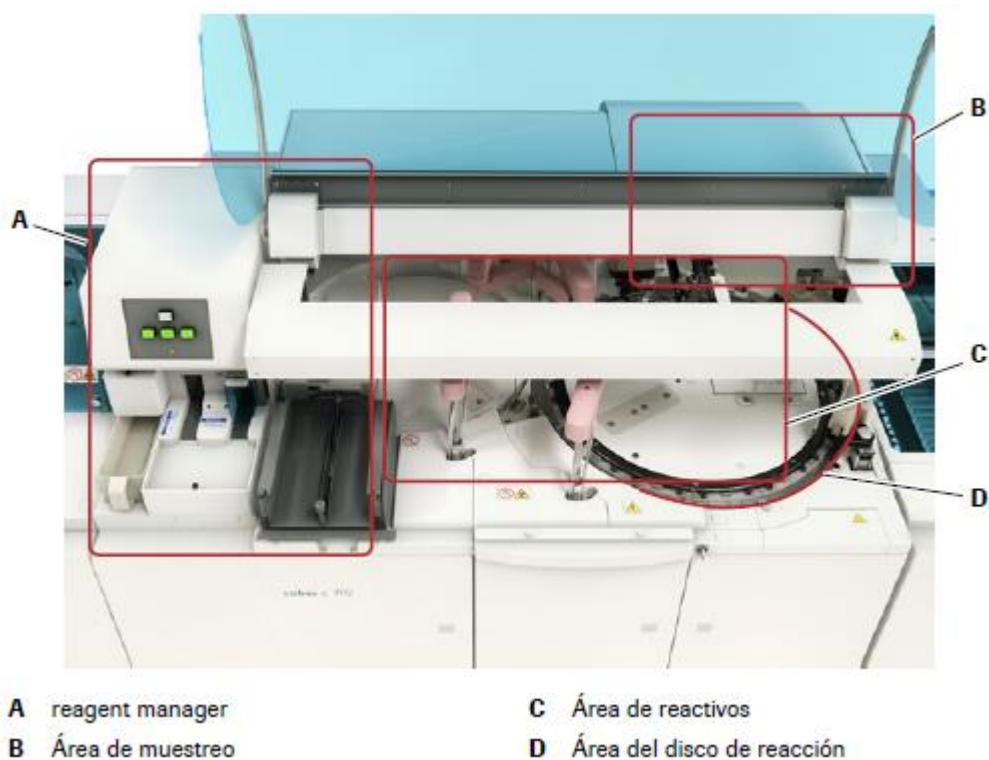


Figura 33: Vista superior del módulo Cobas C701 utilizado para llevar a cabo los análisis fotométricos de creatinina realizados en esta Tesis Doctoral.

C.1.5. Otra instrumentación

- Para llevar a cabo la reacción de derivatización de la creatinina previa a su inyección en el sistema GC-MS, se utilizó un microondas focalizado modelo “Explorer 12-Hybrid” (CEM Corporation, Mathews, EEUU).
- Para realizar la síntesis de los diferentes péptidos se utilizó un sintetizador de péptidos en fase sólida con tecnología microondas modelo “Liberty Blue” (CEM Corporation, Mathews, EEUU).
- Todas las pesadas se llevaron a cabo en una balanza analítica con una resolución de 0.1 mg: modelo AB204-S (Mettler-Toledo, España).

- Para la preconcentración/evaporación de las muestras se utilizó un sistema mini-vap de seis puertos (Supelco, St. Louis, EEUU).
- El ajuste del pH se llevó a cabo con un pH-metro modelo Basic 20 de Crison (España).
- Centrífuga 5810RD (Eppendorf) y Centrífuga Centro-8-BL (JPSelecta, Barcelona, España).
- Para llevar a cabo las reacciones de derivatización de los metabolitos intracelulares se utilizó un incubador con control de temperatura y agitación, Themomixer (Eppendorf).
- Para eliminar disolventes se utilizó un concentrador Genevac (Suffolk, Reino Unido).
- Agitador mecánico a vibración Vortex modelo Classic (Velp Scientific, Usmate, Italia).
- Agitador orbital modelo Fisher bioblock Scientific (Thermo, Bremen, Alemania).
- La liofilización de los péptidos sintetizados para su conservación se llevó a cabo utilizando un liofilizador modelo Heto Power Dry LC 3000 (Thermo, Bremen, Alemania).

C.2. Materiales y Reactivos

C.2.1. Patrones orgánicos de abundancia natural

- La Creatinina (99.0%) y Creatina (99.0%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).
- Los metabolitos intracelulares: D-Glucosa ($\geq 99.5\%$), L-Alanina ($\geq 98\%$), Glicina ($\geq 98.5\%$), β -Alanina ($\geq 99\%$), L-Valina ($\geq 98\%$), L-Leucina ($\geq 98\%$), L-Isoleucina ($\geq 98\%$), L-Prolina ($\geq 99\%$), L-Metionina ($\geq 98\%$), L-Serina ($\geq 99\%$), L-Treonina ($\geq 98\%$), L-Lisina ($\geq 98\%$), Tirosina ($\geq 98\%$), L-Fenilalanina ($\geq 98\%$), Cisteina ($\geq 97\%$), L-Ácido Aspártico ($\geq 98\%$), L-Ácido Glutámico ($\geq 99\%$), Fumarato de sodio dibásico ($\geq 99\%$), D-Ribulosa 5-fosfato ($\geq 96\%$), Citrato de sodio tribásico dehidratado ($\geq 99\%$), Urea (95%), Succinato de sodio dibásico ($\geq 98\%$), L-Lactato de sodio (98%), Ácido dodecanoico (98%), Ácido Mirístico (99%), Ácido Palmítico ($\geq 99\%$), Ácido Esteárico ($\geq 98.5\%$), Colesterol ($\geq 99\%$) fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) y DL-Malato disódico ($\geq 98\%$) fue proporcionado por Merck (Darmstadt, Alemania).

Las disoluciones patrón de Creatina y Creatinina y de los metabolitos intracelulares se prepararon por disolución de los correspondientes compuestos agua Milli-Q (Milli-Q system Millipore, Bedford, MA, EEUU) a excepción de los ácidos grasos y el Colesterol que se disolvieron en Hexano (Merck, Darmstadt, Alemania), y se almacenaron a 4 y/o -20°C A partir de estas se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con agua o hexano respectivamente. Todas las disoluciones se prepararon por pesada para una correcta corrección gravimétrica de las mismas utilizando una balanza de 0.1 mg de precisión.

- Los Fmoc aminoácidos: Fmoc- Glicina-OH ($\geq 98\%$), Fmoc-Leucina-OH ($\geq 97\%$) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) y el Fmoc- Arginina (Pbf) -OH se obtuvo de Novabiochem (Darmstadt, Alemania). La resina Wang Fmoc-Lisina (Boc) fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

Las disoluciones diarias de trabajo de los aminoácidos Fmoc y de la resina Wang fueron preparadas por disolución de los correspondientes compuestos en N,N-Dimetilformamida (DMF) (grado ACS) (VWR, Radnor, Pennsylvania, EEUU).

Las disoluciones patrón de abundancia natural de Creatina y Creatinina se utilizaron para determinar la concentración de los patrones enriquecidos isotópicamente por IDMS inversa.

C.2.2. Patrones orgánicos enriquecidos isotópicamente en ^{13}C

- El patrón de $^{13}\text{C}_1$ -Creatinina se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) mientras que la $^{13}\text{C}_2$ -Creatina fue sintetizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo. La creatinina está certificada en un 99% de enriquecimiento.

- Los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C : D-Glucosa-2- ^{13}C , D-Glucosa-1,2- $^{13}\text{C}_2$, D-Glucosa-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$, D-Glucosa- $^{13}\text{C}_6$, Glicina-2- ^{13}C y Glicina- $^{13}\text{C}_2$ fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Todos los compuestos están certificados en un 99% de enriquecimiento.

- El aminoácido Fmoc-Glicina enriquecido en los dos átomos de carbono de la Glicina, Glicina-N-Fmoc $^{13}\text{C}_2$ fue obtenido de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EEUU).

Las disoluciones patrón se prepararon de la misma manera que sus análogos de abundancia isotópica natural. Todos los patrones enriquecidos se caracterizaron en abundancia y concentración mediante GC-MS y/o LC-MS.

C.2.3. Muestras reales y Materiales de Referencia Certificados

- Las muestras reales de suero humano de pacientes sanos y enfermos renales utilizadas para la determinación de Creatinina mediante GC-MS y de Creatina y Creatinina mediante LC-MS/MS fueron suministradas por el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

- Las líneas celulares normales y de cáncer de próstata utilizadas en el estudio de las rutas metabólicas derivadas del metabolismo de la Glucosa: Línea celular normal humana PNT1A (Número de catálogo 95012614), Línea celular LNCaP andrógeno dependiente de cáncer de próstata (Número de catálogo CRL-1740), Línea celular PC3 andrógeno independiente de cáncer de próstata (Número de catálogo CRL-1435) se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, Wiltshire, Reino Unido) y de la Colección de cultivos celulares de tipo Americano (ATCC, Rockville, EEUU) mientras que las líneas celulares transfectadas LNCaP MOCK y LNCaP S12 fueron sintetizadas en la Unidad de Biotecnología y Terapia Experimental basada en Nutracéticos del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA).

* Para validar las metodologías desarrolladas en la determinación de creatinina tanto por GC-MS como por LC-MS/MS desarrolladas en la Tesis Doctoral se utilizaron:

- **Sueros control Liofilizados**: Precinorm, Precipath, Precicontrol ClinChem Multi 1, Precicontrol ClinChem Multi 2 y CREJ2 suministrados por Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

- **Materiales de referencia certificados**: ERM-DA252a y ERM-DA253a (Suero humano congelado) obtenidos del Laboratorio Químico de Gobierno (Laboratory of the Government Chemist, LGC, Reino Unido).

C.2.4. Reactivos Generales

Todos los reactivos utilizados han sido de grado “pureza analítica” y se han utilizado sin ningún procedimiento de purificación previa. En la preparación de disoluciones patrón y fases móviles se utilizó agua ultrapura destilada desionizada (Milli-Q) (Millipore, Bedford, EEUU) o Hexano (Merck) con una pureza >99%. Otros disolventes orgánicos utilizados en esa Tesis Doctoral fueron: Acetato de etilo, Metanol, Etanol, Acetonitrilo y Acetona todos ellos con una pureza del 99 % (Merck).

A continuación se detallan el resto de reactivos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

- Acetilacetona ($\geq 99\%$), Acetato de amonio ($\geq 98\%$), Ácido fórmico ($\geq 96\%$), Metoxiamina (98%), N-tertbutildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) con 1% de tertbutilmetilclorosilano ($\geq 95\%$), Piridina ($\geq 98\%$), Anhídrido Propiónico ($\geq 95\%$), N-N-diisopropilcarbodiimida (99%), Etil (hidroxiamino) cianoacetato (97%), Piperazina (99%), 1-metil-2-pirrolidona ($\geq 99\%$), Diclorometano ($\geq 99.5\%$), Ácido trifluoroacético (99%), Triisopropilsilano (98%), Dietiléter (99.9%), L-Glutamina ($\geq 99\%$), HEPES ($\geq 99.5\%$), Penicilina, Streptomina, Anfotericina B y un Buffer salino de fosfatos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).
- Ácido acético glacial ($\geq 99\%$), Ácido clorhídrico ($\geq 99\%$) y Amoníaco ($\geq 99\%$) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidroxilamina ($\geq 99\%$) fue suministrada por ACROS (Geel, Bélgica).
- Suero fetal bovino fue suministrado por Gibco Life Technologies (Waltham, EEUU).
- Medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM/F12 fueron suministrados por Lanza (Basilea, Suiza).
- Nitrógeno líquido (Air Liquide, Paris, Francia).

C.2.5. Material de laboratorio

El material de laboratorio usado en esta Tesis Doctoral se enumera a continuación:

- Vasos de precipitados de 40 y 100 mL (Deltalab, Barcelona, España).
- Viales de vidrio de 2 mL con septum de silicona/PFTE para autoinyector (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- Microinsertos de vidrio para viales de autoinyector (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

- Viales ámbar de vidrio con tapón recubierto de PFTE de 2, 7 y 15 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- Viales clear de vidrio con tapón recubierto de PFTE de 2, 7 y 15 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- Eppendorf 1.5 mL (Labbox, Mataró, España).
- Jeringa de gases de 10 mL (Hamilton, Bonaduz, Suiza).
- Micropipetas de volumen ajustable de 2-20 μ L, 20-200 μ L y de 100-1000 μ L (High Tech Lab, Polonia y Eppendorf, Alemania).
- Pipetas Pasteur de vidrio (Deltalab, Barcelona, España).
- Columnas de extracción en fase sólida (SPE) de intercambio catiónico débil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).
- Filtros PVDF 0.22 μ m (Tecnokroma, Barcelona, España).
- Frascos para el cultivo de tejidos T75 (Corning, Nueva York, EEUU).
- Platos de 60 mm (DB, Nueva Jersey, EEUU).
- Tubos de centrifuga 50 mL (VWR, Radnor, Pensilvania, EEUU).

C.3. PROCEDIMIENTOS

C.3.1. Regresión lineal múltiple

La regresión lineal múltiple²⁹⁶ es una herramienta matemática cuyo objetivo es conocer la contribución de los diferentes perfiles isotópicos que puedan existir en un espectro de masas experimental. Mediante esta metodología se asume que el perfil isotópico observado de una mezcla, es una combinación lineal de los distintos perfiles isotópicos presentes en la mezcla. Se entiende como perfil isotópico al conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un elemento. La suma de todas las abundancias isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico es, por definición 1. Este concepto puede aplicarse también a compuestos orgánicos siendo el perfil isotópico el conjunto de abundancias relativas de los distintos fragmentos moleculares que pueden formar un determinado compuesto en función de las abundancias isotópicas de sus elementos constituyentes.

El perfil isotópico de un elemento o compuesto que se encuentra en la naturaleza, y por tanto en la mayoría de las muestras a analizar, se denomina perfil isotópico natural. Cuando usamos un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente podemos hablar de un perfil isotópico alterado. En estos perfiles isotópicos alterados normalmente un

isótopo se encuentra en una abundancia isotópica relativa más elevada que en el correspondiente elemento natural mientras que el resto de isótopos tienen una abundancia menor. Cuando se realiza un análisis por dilución isotópica estamos preparando mezclas de dos perfiles isotópicos distintos: un perfil isotópico natural y un perfil isotópico alterado.

El cálculo matemático encaminado a determinar la contribución de cada perfil isotópico, natural o alterado, al perfil isotópico observado en la mezcla se denomina **regresión lineal múltiple**. El resultado de este proceso matemático es la fracción molar de cada uno de los perfiles isotópicos en la muestra. En la Figura 34 se muestra la aplicación del concepto de regresión lineal múltiple para una mezcla de dos compuestos A y B cuyo resultado es la contribución de cada uno de los dos perfiles isotópicos en la mezcla.

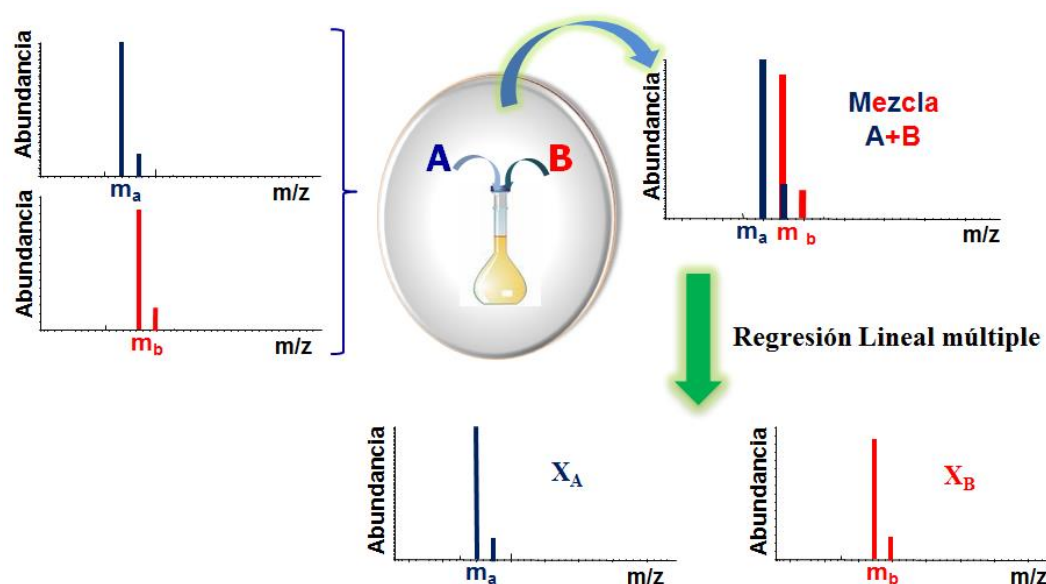


Figura 34: Ilustración del concepto de regresión lineal múltiple para una mezcla de compuestos A y B.

C.3.1.1. Determinación de la concentración de un compuesto mediante regresión lineal en espectrometría de masas orgánica.

El análisis por dilución isotópica orgánica requiere la preparación de mezclas que contengan el mismo compuesto con dos perfiles isotópicos distintos: un perfil isotópico natural y otro alterado. Es decir, a una muestra que contiene un compuesto con una abundancia isotópica natural se le añade una cantidad conocida del mismo compuesto con una abundancia isotópica alterada. En la dilución isotópica orgánica tradicional se mide la relación de intensidades entre una masa representativa del compuesto natural y

una masa representativa del trazador isotópico. Cabe resaltar que en la aproximación clásica es aconsejable que no exista solapamiento espectral entre los perfiles isotópicos del compuesto natural y el marcado para obtener una calibración lineal.

La aplicación de la regresión lineal múltiple en dilución isotópica orgánica está basada en las ecuaciones que se desarrollan a continuación tomadas de la dilución isotópica inorgánica¹⁷³. El balance de masas para el número de moles totales del compuesto en la muestra, N_{mix} , vendrá dado por:

$$N_{mix} = N_{nat} + N_{enr} \quad [19]$$

En la Ecuación [19]:

- ✓ N_{mix} es la cantidad total de compuesto en la mezcla.
- ✓ N_{nat} es la cantidad de compuesto con abundancia isotópica natural
- ✓ N_{enr} es la cantidad conocida de compuesto marcado o trazador añadido a la mezcla y que tiene la abundancia isotópica alterada.

Se pueden plantear balances de masa similares para todas las composiciones isotópicas del compuesto. Para un isotopólogo dado i tendremos:

$$N_{mix}^i = N_{nat}^i + N_{enr}^i \quad [20]$$

Cuando se utiliza Espectrometría de Masas de baja resolución, pueden coexistir distintas composiciones isotópicas de un mismo compuesto con la misma masa nominal. Por ejemplo, la presencia de un átomo de ^{13}C o un ^{15}N en su molécula proporcionará la misma masa nominal con diferente composición isotópica. En esta demostración utilizaremos el concepto de isotopómero por lo que todas esas posibles composiciones isotópicas se sumarán para cada masa nominal utilizando la distribución de isotopómeros de masa, A_i , en los correspondientes cálculos. De este modo, la Ecuación [20] se puede expresar como una combinación lineal de la cantidad total de cada compuesto (natural o marcado) y de su composición isotópica mediante la Ecuación [21]:

$$N_{mix} \cdot A_{mix}^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad [21]$$

En la Ecuación [21]:

- ✓ A_{mix}^i representa la abundancia relativa medida experimentalmente del compuesto para el isotopómero de masa nominal i en la mezcla.

- ✓ A_{nat}^i es la abundancia teórica relativa del compuesto natural a la misma masa nominal i .
- ✓ A_{lab}^i es la abundancia teórica relativa del compuesto isotópicamente enriquecido también a la masa nominal i .

Dividiendo la Ecuación [21] entre la [19] se obtiene:

$$A_{mix}^i = x_{nat} \cdot A_{nat}^i + x_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad [22]$$

dónde:

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad [23] \quad x_{enr} = \frac{N_{lab}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad [24]$$

En las ecuaciones [23] y [24] x_{nat} y x_{enr} indican las fracciones molares del compuesto en la mezcla procedentes de cada perfil isotópico. Si tenemos un compuesto que tiene distintas composiciones isotópicas y n isotómeros para n masas nominales distintas, podemos establecer una ecuación similar a la Ecuación [22] para cada masa nominal que se puede expresar en forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{enr}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{enr}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{enr}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{enr}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{enr}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{enr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [25]$$

Debido a la existencia de un número mayor de parámetros (masas nominales) que incógnitas (fracciones molares) tenemos un sistema sobredeterminado por lo que podremos obtener los valores de las fracciones molares mediante un ajuste por mínimos cuadrados del vector error e . Si llamamos:

- ✓ “ y ” al vector de las abundancias isotópicas en la mezcla.
- ✓ “ A ” a la matriz con las abundancias teóricas de los compuestos puros.
- ✓ “ X ” al vector de las fracciones molares desconocidas.

la solución del ajuste por mínimos cuadrados a este sistema de ecuaciones puede calcularse como:

$$X = (A' \times A)^{-1} \times (A' * y) \quad [26]$$

donde A' es la transpuesta de la matriz A y el superíndice -1 indica la inversa de la matriz resultante del producto.

Cuando tenemos más ecuaciones (mínimo de tres masas nominales) que incógnitas (fracciones molares) podemos calcular las incertidumbres de cada parámetro desconocido mediante la matriz Varianza-Covarianza, $V(x)$. Los elementos de la diagonal de la matriz $V(x)$ son las varianzas de las variables X_{nat} y de X_{enr} . Después de la regresión lineal multivariable esta matriz se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$V(x) = (A' \cdot A)^{-1} \cdot s_e^2 \quad [27]$$

Donde s_e^2 es la varianza de la regresión (suma cuadrática de los errores dividida entre los grados de libertad, $n-2$).

Todos los cálculos matriciales pueden resolverse por medio de hojas de cálculo utilizando la función de “Estimación Lineal” de Excel, que permite obtener las fracciones molares junto con sus incertidumbres. Finalmente, como la cantidad de compuesto marcado añadido es conocido, la cantidad (moles) de compuesto natural se puede calcular mediante la Ecuación [28]:

$$\frac{N_{nat}}{N_{lab}} = \frac{x_{nat}}{x_{enr}} = R \quad [28]$$

Obteniendo de esta forma la ecuación [29] que permite obtener la concentración en peso del compuesto de abundancia natural a partir de la relación R entre las fracciones molares X_{nat} y X_{enr} .

$$[Conc. natural] = (Concrazador) * \left(\frac{g_{trazador}}{g_{analito}} \right) * \left(\frac{Peso Molecular_{trazador}}{Peso Molecular_{analito}} \right) * R \quad [29]$$

Cabe resaltar que cuando se representa la relación de fracciones molares R (X_{nat}/X_{enr}) frente a la relación de moles (N_{nat}/N_{enr}) debería obtenerse una recta de pendiente 1 y ordenada en el origen 0 independientemente del marcaje del compuesto enriquecido si no existen efectos isotópicos durante la preparación de muestra. Esto permite eliminar la necesidad de realizar un calibrado y cuantificar de una manera análoga a como se realiza en la dilución isotópica inorgánica.

En la Figura 35 se muestra un ejemplo para llevar a cabo la cuantificación de creatinina en suero mediante regresión lineal múltiple utilizando la función

“ESTIMACIÓN.LINEAL” en Excel. Se puede observar la matriz “A” correspondiente a las abundancias teóricas de los compuestos natural y enriquecido y el vector “y” correspondiente a las abundancias experimentales en la mezcla muestra-trazador. Una vez calculadas la matriz “A” y el vector “y” seleccionamos el rango de celdas (F4:G8) e insertamos la función “ESTIMACIÓN.LINEAL” = ESTIMACIÓN LINEAL (B3:C7;D3:D7;0;1). A continuación, para resolver la ecuación matricial se pulsán simultáneamente las teclas “CONTROL+SHIFT+ENTER”. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Figura 35 . La primera línea proporciona las fracciones molares de creatinina de abundancia natural y enriquecida isotópicamente y en la segunda línea sus desviaciones estándar. También se proporcionan otros parámetros importantes como son: el coeficiente de regresión (r^2), los grados de libertad (n-2) y la suma cuadrática de residuales (SSr).

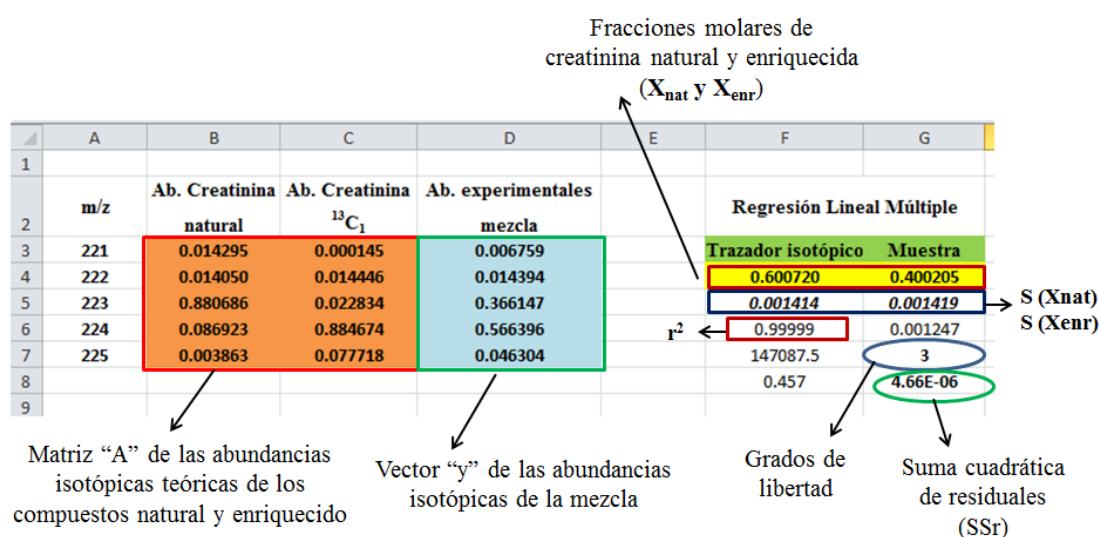


Figura 35: Ejemplo de la aplicación de los cálculos basados en regresión lineal múltiple en Excel.

C.3.1.2. Determinación de las posibles interconversión entre especies mediante el uso de trazadores isotópicos múltiples y regresión lineal múltiples.

Para poder ilustrar el uso de trazadores isotópicos múltiples y regresión lineal múltiple en la determinación de las posibles interconversiones existentes entre compuestos orgánicos, vamos a considerar un sistema con dos compuestos A y B los cuales son susceptibles de interconversión durante la extracción de muestra, derivatización, separación y/o medida. A la muestra (s), que contiene compuesto A y B de abundancia isotópica natural, se le añaden cantidades conocidas de compuesto A y B enriquecidos

en un número diferente de átomos de ^{13}C , por ejemplo el compuesto A enriquecido en un átomo de ^{13}C (trazador t1) y el compuesto B enriquecido en dos átomos de ^{13}C (trazador t2). Idealmente, el trazador enriquecido de A no debería contener ninguna impureza de B y viceversa. Sin embargo, desde un punto de vista práctico es posible la existencia de esas impurezas en las disoluciones de trazador y tiene que ser tenidas en cuenta en los cálculos generales. Para los compuestos A y B podemos establecer dos balances de masa en los que no se tiene en cuenta ninguna interconversión entre los mismos:

$$N_m^A = N_s^A + N_{t1}^A + N_{t2}^A \quad [30]$$

$$N_m^B = N_s^B + N_{t1}^B + N_{t2}^B \quad [31]$$

donde el superíndice nos indica el compuesto (A o B) y el subíndice nos indica el perfil isotópico (s, t1,t2). Para el compuesto A, la contribución de N_{t2}^A debería de ser muy pequeña y se correspondería con las impurezas de A en el trazador isotópico (t2) del compuesto B. Lo mismo ocurre con N_{t1}^B en el compuesto B. Los valores de $N_{t1}^A, N_{t1}^B, N_{t2}^A, N_{t2}^B$ deben de ser conocidos o estar certificados.

Los balances de masa dados en las ecuaciones [30] y [31] pueden ser calculados similares para todas las composiciones isotópicas del compuesto asumiendo que las medidas se llevan a cabo mediante espectrometría de masas de baja resolución. Por lo tanto, aplicando la demostración dada en la sección C.3.1.1 podremos obtener dos ecuaciones matriciales similares a la ecuación [25] para los compuestos interconvertibles A y B:

$$\begin{bmatrix} A_{m,A}^1 \\ A_{m,A}^2 \\ A_{m,A}^3 \\ \dots \\ A_{m,A}^{n-1} \\ A_{m,A}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{s,A}^1 & A_{t1,A}^1 & A_{t2,A}^1 \\ A_{s,A}^2 & A_{t1,A}^2 & A_{t2,A}^2 \\ A_{s,A}^3 & A_{t1,A}^3 & A_{t2,A}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{s,A}^{n-1} & A_{t1,A}^{n-1} & A_{t2,A}^{n-1} \\ A_{s,A}^n & A_{t1,A}^n & A_{t2,A}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^A \\ x_{t1}^A \\ x_{t2}^A \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [32]$$

$$\begin{bmatrix} A_{m,B}^1 \\ A_{m,B}^2 \\ A_{m,B}^3 \\ \dots \\ A_{m,B}^{n-1} \\ A_{m,B}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{s,B}^1 & A_{t1,B}^1 & A_{t2,B}^1 \\ A_{s,B}^2 & A_{t1,B}^2 & A_{t2,B}^2 \\ A_{s,B}^3 & A_{t1,B}^3 & A_{t2,B}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{s,B}^{n-1} & A_{t1,B}^{n-1} & A_{t2,B}^{n-1} \\ A_{s,B}^n & A_{t1,B}^n & A_{t2,B}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^B \\ x_{t1}^B \\ x_{t2}^B \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [33]$$

Después de la adición de los trazadores isotópicos (t1 y t2) y homogenización con la muestra, una fracción de compuesto A puede convertirse en compuesto B y viceversa y además, ambos procesos pueden ocurrir en la misma o en diferentes etapas de la preparación de muestra. Si se asume que el equilibrio isotópico se ha alcanzado antes de que ninguna reacción de interconversión haya tenido lugar, la reacción de transformación de A en B o la reacción de transformación de B en A modifica los balances de masa ya que se tiene que tener en cuenta la fracción de A que se pierde y la de B que se forma y viceversa. Los nuevos balances de masa para los compuestos A y B serán:

$$N_m^A = (N_s^A + N_{t1}^A + N_{t2}^A) \times (1 - F1) + (N_s^B + N_{t1}^B + N_{t2}^B) \times F2 \quad [34]$$

$$N_m^B = (N_s^B + N_{t1}^B + N_{t2}^B) \times (1 - F2) + (N_s^A + N_{t1}^A + N_{t2}^A) \times F1 \quad [35]$$

donde F1 es la fracción de A transformado en B y F2 es la fracción de B transformado en A. Estos balances de masa cumplen con la ley de conservación de la materia que es requerida para proporcionar factores de transformación exactos²⁹⁷. Como se observa, al final del proceso analítico ambos compuestos pueden tener contribución de tres perfiles isotópicos diferentes (natural, ¹³C₁ y ¹³C₂), debido a la presencia de impurezas en los trazadores, a reacciones de interconversión o a ambas.

La aplicación de las ecuaciones [32] y [33] a los picos cromatográficos de ambos compuestos A y B nos proporciona las fracciones molares de cada uno de los diferentes perfiles isotópicos en ambos compuestos. Para el compuesto A se obtendrán las fracciones molares x_s^A , x_{t1}^A , x_{t2}^A y para el compuesto B se obtendrán las fracciones molares x_s^B , x_{t1}^B , x_{t2}^B . Estas fracciones molares se corresponden con los balances de masa parciales en las ecuaciones [34] y [35]:

$$x_s^A = \frac{N_s^A(1-F1) + N_s^B F2}{N_m^A} \quad [36]$$

$$x_{t1}^A = \frac{N_{t1}^A(1-F1) + N_{t1}^B F2}{N_m^A} \quad [37]$$

$$x_{t2}^A = \frac{N_{t2}^A(1-F1) + N_{t2}^B F2}{N_m^A} \quad [38]$$

$$x_s^B = \frac{N_s^B(1-F2) + N_s^A F1}{N_m^B} \quad [39]$$

$$x_{t1}^B = \frac{N_{t1}^B(1-F2) + N_{t1}^A F1}{N_m^B} \quad [40]$$

$$x_{t2}^B = \frac{N_{t2}^B(1-F2) + N_{t2}^A F1}{N_m^B} \quad [41]$$

Los factores de interconversión F1 y F2 se obtendrán dividiendo la ecuación [37] entre la [38] para el compuesto A y dividiendo la ecuación [40] entre la [41] para B. Se obtienen dos ecuaciones con dos incógnitas cuya resolución nos proporcionará los factores de interconversión F1 y F2:

$$F1(x_{t2}^A N_{t1}^A - x_{t1}^A N_{t2}^A) + F2(x_{t1}^A N_{t2}^B - x_{t2}^A N_{t1}^B) = (x_{t2}^A N_{t1}^A - x_{t1}^A N_{t2}^A) \quad [42]$$

$$F1(x_{t2}^B N_{t1}^A - x_{t1}^B N_{t2}^A) + F2(x_{t1}^B N_{t2}^B - x_{t2}^B N_{t1}^B) = (x_{t1}^B N_{t2}^B - x_{t2}^B N_{t1}^B) \quad [43]$$

Las ecuaciones generales [42] y [43] se reducen a las ecuaciones más comunes cuando los trazadores isotópicos son puros ($N_{t2}^A=0$ y $N_{t1}^B=0$). Una vez que los factores de interconversión F1 y F2 son calculados, las concentraciones de los compuestos A y B corregidas de posibles reacciones de interconversión, N_s^A y N_s^B , son calculadas de la relación entre la ecuación [36] y [37] para el compuesto A y las ecuaciones [39] y [40] para el compuesto B.

Las ecuaciones finales son:

$$N_s^A(1-F1) + N_s^B F2 = \frac{x_s^A}{x_{t2}^A} \times [N_{t2}^A(1-F1) + N_{t2}^B F2] \quad [44]$$

$$N_s^A F1 + N_s^B(1-F2) = \frac{x_s^B}{x_{t1}^B} \times [N_{t1}^B(1-F2) + N_{t1}^A F1] \quad [45]$$

Por lo tanto, las cantidades originales en la muestra de los compuestos A y B, N_s^A y N_s^B , se pueden calcular resolviendo este sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas.

C.3.1.3. Determinación de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares mediante regresión lineal múltiple.

En los estudios de investigación de las rutas metabólicas utilizando isótopos estables, un substrato específico enriquecido en ^{13}C se adiciona a un cultivo celular en crecimiento. Esa “etiqueta” (^{13}C) es transferida a los diferentes metabolitos intracelulares a través de las rutas metabólicas. Por lo tanto, los diferentes metabolitos intracelulares serán una mezcla de todas las posibles incorporaciones de ^{13}C a los mismos. Podremos, por lo tanto establecer un balance de masas para el número de moles totales de cada compuesto (a) en la muestra, ${}^a N_m$, vendrá dado por:

$${}^a N_m = {}^a N_{nat} + {}^a N_{^{13}\text{C}1} + {}^a N_{^{13}\text{C}2} + {}^a N_{^{13}\text{C}3} + {}^a N_{^{13}\text{C}4} \dots \dots \dots {}^a N_{^{13}\text{C}n} \quad [46]$$

donde: ${}^a N_m$ es la cantidad total de compuesto en la muestra; ${}^a N_{nat}$ es la cantidad de compuesto con abundancia isotópica natural y ${}^a N_{^{13}\text{C}1} - {}^a N_{^{13}\text{C}n}$ son las cantidades de compuesto al que se ha incorporado 1, 2, 3, 4.....o **n** átomos de ^{13}C , siendo **n** el número de átomos de carbono del compuesto.

Se pueden establecer balances de masa similares a la Ecuación [46] para todas las composiciones isotópicas del compuesto asumiendo que las medidas se realizan mediante espectrometría de masas de baja resolución. Aplicando la demostración dada en la sección C.3.1.1 podremos obtener la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{pmatrix} {}^a A_{muestra}^1 \\ {}^a A_{muestra}^2 \\ {}^a A_{muestra}^3 \\ \vdots \\ {}^a A_{muestra}^m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} {}^a A_{nat}^1 & {}^a A_{13C1}^1 & {}^a A_{13C2}^1 & {}^a A_{13C3}^1 & {}^a A_{13C4}^1 & \cdots & {}^a A_{13Cn}^1 \\ {}^a A_{nat}^2 & {}^a A_{13C1}^2 & {}^a A_{13C2}^2 & {}^a A_{13C3}^2 & {}^a A_{13C4}^2 & \cdots & {}^a A_{13Cn}^2 \\ {}^a A_{nat}^3 & {}^a A_{13C1}^3 & {}^a A_{13C2}^3 & {}^a A_{13C3}^3 & {}^a A_{13C4}^3 & \cdots & {}^a A_{13Cn}^3 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ {}^a A_{nat}^m & {}^a A_{13C1}^m & {}^a A_{13C2}^m & {}^a A_{13C3}^m & {}^a A_{13C4}^m & \cdots & {}^a A_{13Cn}^m \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} {}^a x_{nat} \\ {}^a x_{13C1} \\ {}^a x_{13C2} \\ {}^a x_{13C3} \\ {}^a x_{13C4} \\ \vdots \\ {}^a x_{13Cn} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} {}^a e^1 \\ {}^a e^2 \\ {}^a e^3 \\ \vdots \\ {}^a e^m \end{pmatrix} \quad [47]$$

donde: ${}^a A_{muestra}^m$ son las abundancias del compuesto en la muestra medidas mediante espectrometría de masas; ${}^a A_{nat}^m$ son las abundancias teóricas del compuesto natural; ${}^a A_{13C1}^m - {}^a A_{13Cn}^m$ son las abundancias teóricas del compuesto para las posibles diferentes incorporaciones de ^{13}C al mismo y ${}^a x_{nat} - {}^a x_{13Cn}$ son las fracciones molares del compuesto natural y de todas sus posibles incorporaciones de ^{13}C .

Las abundancias isotópicas teóricas se obtuvieron mediante un programa computacional que calcula las composiciones isotópicas junto con las incertidumbres utilizando un programa desarrollado en *Visual Basic*^{298,299}, basado en el algoritmo de Kubinyi³⁰⁰. En el archivo de Excel se incluyen las masas exactas de los elementos, las abundancias de los isótopos estables y la abundancia exacta de los isótopos enriquecidos calculadas experimentalmente mediante un procedimiento que se explicará con detalle más adelante.

Debido a la existencia de un mayor número de masas nominales que incógnitas (fracciones molares) da lugar a un sistema indeterminado y podremos obtener las fracciones molares mediante un ajuste de mínimos cuadrados del vector e . Este cálculo matricial se puede resolver utilizando la función “ESTIMACIÓN LINEAL” en Excel, de manera análoga a lo mostrado en la Figura 35.

Una vez calculadas las diferentes fracciones molares (*distribución isotópica*) para cada metabolito intracelular, nos permitirá el establecimiento de las rutas metabólicas con una gran exactitud y precisión.

C.3.1.4. Medida de la biosíntesis de proteínas mediante distribución binomial y regresión lineal múltiple.

La estrategia general utilizada en el estudio de la biosíntesis de proteínas utilizando isótopos estables, es generar a partir de la proteína a estudiar, un péptido característico de la misma, que contenga al menos tres repeticiones del aminoácido seleccionado (el aminoácido enriquecido isotópicamente en ^2H , ^{13}C o ^{15}N que se añadirá al comienzo del estudio).

Para ilustrar este procedimiento, vamos a considerar como ejemplo el péptido de estructura SVVLLLR, el cual se puede generar por digestión trípica de la proteína albúmina de suero humano. Cuando se añade, por ejemplo, $5,5,5\text{-}^2\text{H}_3\text{-Leucina}$ para llevar a cabo el estudio, el pool precursor a partir del cual se sintetiza el péptido tendrá una proporción de Leucinas enriquecidas isotópicamente. Como el péptido de interés SVVLLLR contiene 3 repeticiones de Leucina, el péptido formado tendrá un número variable de Leucinas enriquecidas isotópicamente (1, 2 o 3) que dependerá de la proporción de Leucina enriquecida isotópicamente en el pool precursor (lo que se conoce como “*precursor pool enrichment*” (p)).

La probabilidad de encontrar cada una de las posibles subunidades marcadas isotópicamente ($i= 0$ a 3) en el péptido SVVLLLR, X^i , vendrá dada por la distribución binomial en función del enriquecimiento en el pool precursor (p) como se describe en la Ecuación [48]:

$$X^i = \frac{3!}{(3-i)!(i)!} (1-p)^{3-i} p^i \quad [48]$$

donde p es el enriquecimiento en el pool precursor a partir del cual se sintetiza el péptido e (i) son las subunidades de Leucina marcadas isotópicamente en el péptido SVVLLLR (0,1,2 o 3). Recordar que $\sum_{i=0}^3 x^i = 1$. Las probabilidades (X^i) calculadas usando la ecuación [48], son además las fracciones molares de cada tipo de péptido en la mezcla para un enriquecimiento en el pool precursor (p).

En la Figura 36 se pueden observar las probabilidades de encontrar (i) subunidades de Leucina marcadas isotópicamente en el péptido SVVLLLR utilizando la distribución binomial para diferentes valores de enriquecimiento del “pool precursor”.

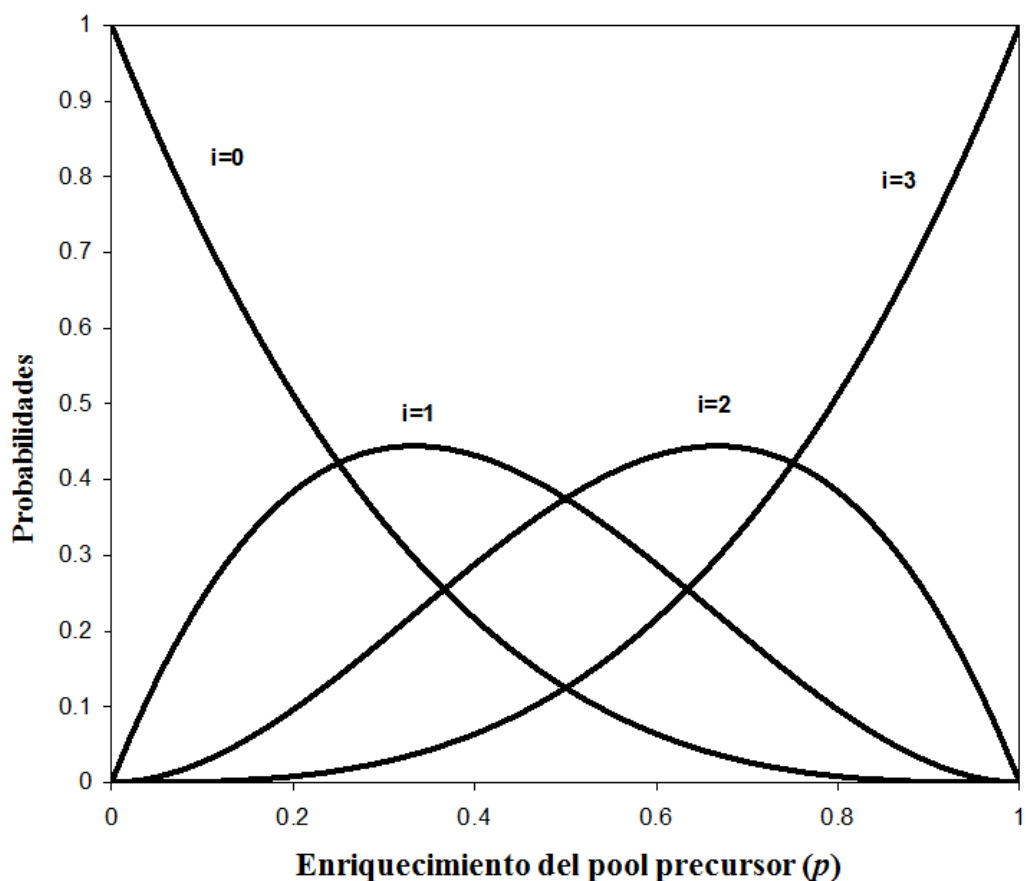


Figura 36: Probabilidad de encontrar (*i*) subunidades de Leucina marcadas en el péptido SVVLLLR en función del enriquecimiento en el pool precursor (*p*)

Por lo tanto de manera análoga a la llevada a cabo en las anteriores secciones, podremos establecer balances de masas para el número de moles totales de péptido, así como para todas las composiciones isotópicas del péptido asumiendo que las medidas se realizan mediante espectrometría de masas de baja resolución. Aplicando la demostración llevada a cabo en la sección C.3.1.1, la distribución isotópica del péptido marcado (A_t^j) será una combinación lineal de la distribución isotópica de cada tipo de péptido (con 0, 1, 2 o 3 subunidades de Leucina) y de la fracción molar de cada tipo de péptido en la mezcla. Esta combinación lineal vendrá dada por la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} A_t^0 \\ A_t^1 \\ A_t^2 \\ \dots \\ A_t^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_0^0 & A_1^0 & A_2^0 & A_3^0 \\ A_0^1 & A_1^1 & A_2^1 & A_3^1 \\ A_0^2 & A_1^2 & A_2^2 & A_3^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_0^m & A_1^m & A_2^m & A_3^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_p^0 \\ X_p^1 \\ X_p^2 \\ \dots \\ X_p^3 \end{bmatrix} \quad [49]$$

donde X_p^i son las probabilidades de encontrar cada una de las posibles subunidades de péptido marcadas isotópicamente dadas por la ecuación [48] y A_i^j son las abundancias teóricas calculadas para cada una de las posible subunidades de péptido con 0, 1, 2 o 3 Leucinas marcadas isotópicamente. Estas abundancias teóricas se obtuvieron de manera análoga a lo descrito en la sección C.3.1.3.

Sin embargo, el nuevo péptido SVVLLLR sintetizado en el sistema biológico se encuentra mezclado con péptido de abundancia isotópica natural existente previamente. Por lo tanto, después de la digestión trípica de la muestra biológica, el péptido de interés es una mezcla de péptido de abundancia isotópica natural y marcado isotópicamente y la distribución isotópica del péptido medida experimentalmente (A_s^m) se puede asumir como una combinación lineal de péptido natural y marcado isotópicamente y vendrá descrito por la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} A_s^0 \\ A_s^1 \\ A_s^2 \\ \dots \\ A_s^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_n^0 & A_t^0 \\ A_n^1 & A_t^0 \\ A_n^2 & A_t^2 \\ \dots & \dots \\ A_n^m & A_t^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_n \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^0 \\ e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^m \end{bmatrix} \quad [50]$$

Donde X_n y X_t son las fracciones molares desconocidas de péptido de abundancia natural y de péptido marcado isotópicamente, que contribuyen a la composición isotópica final de péptido en la muestra. Destacar que $X_n + X_t = 1$, y que debido a que la Ecuación [50] contiene más ecuaciones que incógnitas es necesario introducir el vector error en la Ecuación. Por lo tanto, los valores de X_n y X_t que mejor se ajustan a la Ecuación [50] pueden obtenerse mediante regresión lineal múltiple.

Obviamente, la composición isotópica del péptido marcado incluida en la Ecuación [50] será función del enriquecimiento en el pool precursor como se mostró en las ecuaciones [48] y [49]. Por lo tanto la Ecuación [50] se expresa mejor de la siguiente forma:

$$\begin{bmatrix} A_s^0 \\ A_s^1 \\ A_s^2 \\ \dots \\ A_s^m \end{bmatrix} = x_n \times \begin{bmatrix} A_n^0 \\ A_n^1 \\ A_n^2 \\ \dots \\ A_n^m \end{bmatrix} + x_t \times \begin{bmatrix} A_0^0 & A_1^0 & A_2^0 & A_3^0 \\ A_0^1 & A_1^1 & A_2^1 & A_3^1 \\ A_0^2 & A_1^2 & A_2^2 & A_3^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_0^m & A_1^m & A_2^m & A_3^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_p^0 \\ x_p^1 \\ x_p^2 \\ x_p^3 \\ \dots \\ x_p^m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^0 \\ e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^m \end{bmatrix} \quad [51]$$

donde A_n^j es la composición isotópica de péptido de abundancia natural y será la misma que la teórica calculada para la subunidad de péptido con 0 Leucinas marcadas isotópicamente.

El cálculo final es encontrar los valores óptimos de p y X_t que mejor se ajusten a la distribución isotópica experimental en la muestra. Para ello, la distribución isotópica experimental se compara con las distribuciones isotópicas calculadas en la Ecuación [51] dando valores a p y X_t . Los valores óptimos de p y X_t se calcularon usando la función **SOLVER** en Microsoft Excel, y serán aquellos que proporcionen el mínimo en la suma de residuales (SSr) entre la distribución isotópica experimental y las calculadas según la Ecuación [51].

C.3.1.5. Determinación de las interferencias isobáricas de un compuesto en la fuente de ionización electrónica mediante regresión lineal múltiple

En un principio, la regresión lineal múltiple se empleó como herramienta matemática para el estudio de interferencias isobáricas³⁰¹. Estas son muy comunes en fuentes de ionización moleculares como la fuente de ionización electrónica (EI). En Espectrometría de Masas molecular se generan fragmentos moleculares que pueden estar interferidos por la ganancia o pérdida de átomos de hidrógeno en la fuente de ionización. La posible formación de iones MH_n^+ o $M-nH^+$, junto con el ion mayoritario M^+ .

Por tanto, será necesario cuantificar el efecto de la pureza del cluster molecular sobre el que se realizan las medidas de las abundancias isotópicas antes de aplicar la regresión lineal múltiple en la cuantificación de la cuantificación de un compuesto como es el caso de la Creatinina o en la medida de la distribución isotópica en los diferentes metabolitos intracelulares como se ha demostrado en las secciones C.3.1.1 y C.3.1.3. Para ello se puede utilizar el procedimiento descrito en la sección C.3.1.1, donde en la matriz A se introducen las abundancias isotópicas teóricas de las distintas formas químicas del compuesto, MH_n^+ o $M-nH^+$, que forman el perfil isotópico.

Esta estrategia se puede resumir en la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{exp}}^1 \\ A_{\text{exp}}^2 \\ A_{\text{exp}}^3 \\ \dots \\ A_{\text{exp}}^{n-1} \\ A_{\text{exp}}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_a^1 & A_{a-H}^1 & A_{a+H}^1 & A_{a-2H}^1 \\ A_a^2 & A_{a-H}^2 & A_{a+H}^2 & A_{a-2H}^2 \\ A_a^3 & A_{a-H}^3 & A_{a+H}^3 & A_{a-2H}^3 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_a^{n-1} & A_{a-H}^{n-1} & A_{a+H}^{n-1} & A_{a-2H}^{n-1} \\ A_a^n & A_{a-H}^n & A_{a+H}^n & A_{a-2H}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_a \\ x_{a-H} \\ x_{a+H} \\ x_{a-2H} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [52]$$

dónde:

- a , a_{-H} , a_{+H} y a_{-2H} son las diferentes formas químicas del compuesto que se forman en la fuente de ionización electrónica debido a la pérdida o ganancia de átomos de hidrógeno.
- X_a , X_{a+H} , X_{a-H} y X_{a-2H} son las fracciones molares de las distintas formas químicas del compuesto que se han formado en la fuente de ionización electrónica a causa de la pérdida o ganancia de átomos de hidrógeno.

Una vez obtenidas las contribuciones (fracciones molares) de las diferentes formas químicas del compuesto, se tiene que calcular la “*abundancia isotópica teórica corregida*” del compuesto. La abundancia isotópica de cada isotópologo i del compuesto vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$A_{\text{nat}}^i = A_a^i \cdot x_a + A_{a-H}^i \cdot x_{a-H} + A_{a+H}^i \cdot x_{a+H} + A_{a-2H}^i \cdot x_{a-2H} \quad [53]$$

Los valores de x_a , x_{a+H} , x_{a-H} y x_{a-2H} tienen que ser independientes de las condiciones de ionización en la fuente de ionización electrónica y de la concentración de compuesto inyectado en el sistema cromatográfico.

C.3.1.6. Determinación del enriquecimiento isotópico de un compuesto mediante regresión lineal múltiple

La distribución isotópica de un compuesto orgánico es función del enriquecimiento isotópico de sus elementos constituyentes y del número de isótopos enriquecidos usados

para el marcaje. La forma más sencilla para llevar a cabo el cálculo es mediante comparación de las abundancias experimentales del compuesto y las abundancias teóricas calculadas para diferentes enriquecimientos isotópicos, donde el óptimo enriquecimiento isotópico será aquel que minimiza la suma de residuales entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas.

Sin embargo, esa comparación resulta complicada cuando otros efectos cromatográficos o espectrométricos influyen en la medida de la distribución isotópica, como es la contribución a la masa M-1 debido a la formación de iones M-H⁺ o la falta de resolución espectral en los equipos con analizadores de tipo cuadrupolo. En estos casos es necesario evaluar la pureza espectral del fragmento molecular objeto de estudio en el compuesto de abundancia isotópica natural mediante el procedimiento explicado en la sección anterior utilizando la Ecuación [52]. A continuación, se calculan las abundancias isotópicas del ion M y M-H del trazador con diferentes enriquecimientos y posteriormente se calcula la distribución isotópica “corregida” para el trazador teniendo en cuenta la pureza espectral del fragmento molecular a estudiar. Por último se comparan la distribución isotópica experimental del trazador, con las calculadas “corregidas” para diferentes enriquecimientos isotópicos utilizando regresión lineal. El enriquecimiento isotópico “óptimo” será aquel que nos proporcione el mínimo en la suma cuadrática de residuales (SSr) entre las distribuciones isotópicas teóricas y experimentales.

En la Figura 37 se puede observar el cálculo del enriquecimiento isotópico para la ¹³C₆-Glucosa donde el enriquecimiento isotópico óptimo es 0.9936.

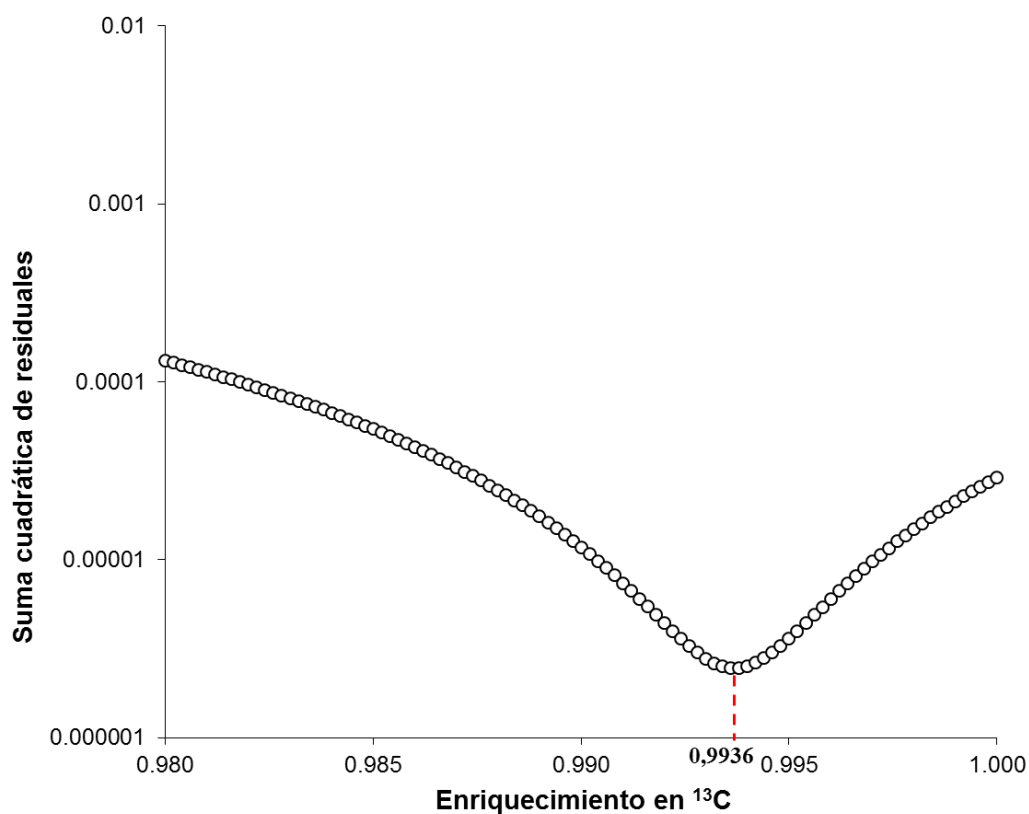


Figura 37: Determinación del enriquecimiento isotópico en la $^{13}\text{C}_6$ -Glucosa mediante regresión lineal múltiple.

C.3.2. Medida de la composición isotópica mediante Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS).

La medida de la composición isotópica de un compuesto mediante espectrometría de masas en tándem en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM) el primer y segundo cuadrupolo (Q1 y Q3) operan a una resolución de 0.7 unidades de masa (correspondiente a la anchura a la mitad de la altura del máximo del pico (*Full Width at half maximum, FWHM*)). En este modo en el primer cuadrupolo (Q1) se seleccionan los iones que forman el cluster isotópico objeto de estudio, el cual se fragmentará en la celda de colisión (CID), dando lugar a los diferentes iones producto los cuales serán seleccionados en el segundo cuadrupolo. En la Figura 38 se muestran los iones seleccionados del cluster objeto de estudio para la determinación de Creatinina en el primer cuadrupolo operando a resolución convencional (0.7 FWHM). La relación m/z de los iones precursores son: 114, 115, 116 y 117. Estos iones se fragmentarán en la celda de colisión y en el segundo cuadrupolo se miden los iones producto con relación

m/z: 86, 87, 88 y 89. De esta manera las transiciones SRM medidas serían: 114→86, 115→87, 116→88 y 117→89.

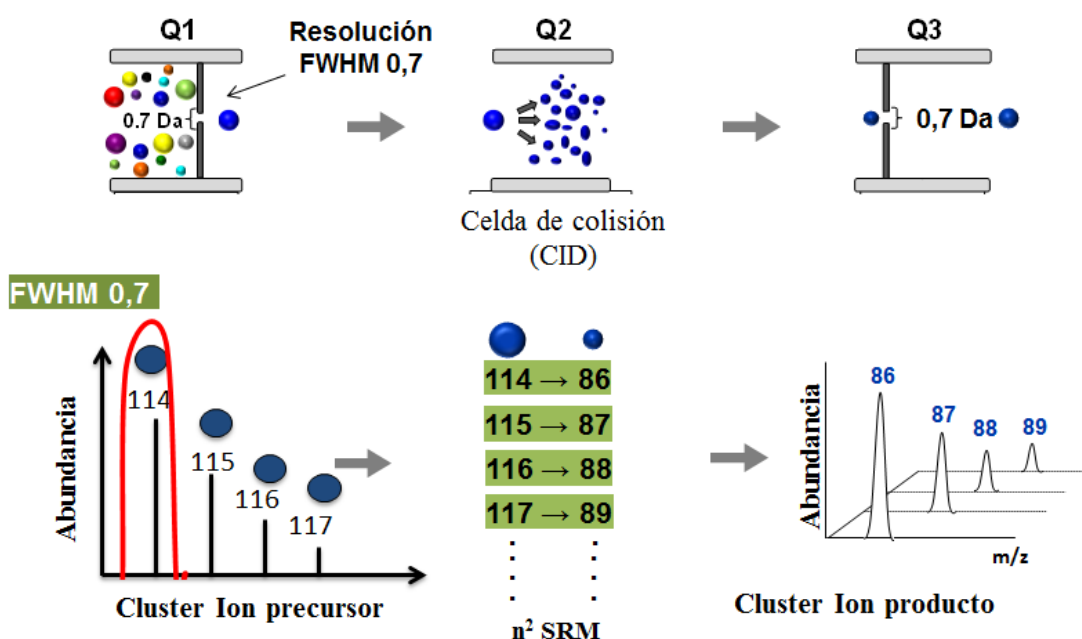


Figura 38: Medida de la composición isotópica de un compuesto en modo SRM utilizando resolución de 0.7 FWHM en el primer cuadrupolo.

Sin embargo, aplicando este modo SRM, no se consigue una medida real de la composición isotópica en el cluster del ion producto, ya que cada uno de los iones precursores puede generar varios iones producto. Por lo tanto, para medir la composición isotópica real sería necesario medir varias transiciones para cada ion precursor, pudiendo llegar a tener que medir n^2 transiciones, siendo n el número de iones precursores. Este modo de medida no sería “viable” desde un punto de vista experimental ya que el tratamiento de datos sería muy complejo y daría lugar a una gran disminución de la sensibilidad.

Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado un procedimiento que nos permite medir la composición isotópica real en el cluster del ion producto. Para ello, como se observa en la Figura 39 se disminuye la resolución en el primer cuadrupolo en el rango de valores de FWHM~11 unidades de masa, de manera que se pueda transmitir completamente el cluster del ion precursor a la celda de colisión (CID). De esta manera, cuando se mide la composición isotópica en el cluster del ion producto se tienen en cuenta todas las posibles contribuciones de todos los iones precursores al mismo. Podremos entonces medir la composición isotópica utilizando únicamente tantas

transiciones como isotópologos posee el cluster del ion producto, seleccionando un centro de masa que nos permita una completa transmisión del cluster del ion precursor a la celda de colisión. Esta estrategia fue utilizada para la cuantificación de creatina y creatinina mediante HPLC-MS/MS.

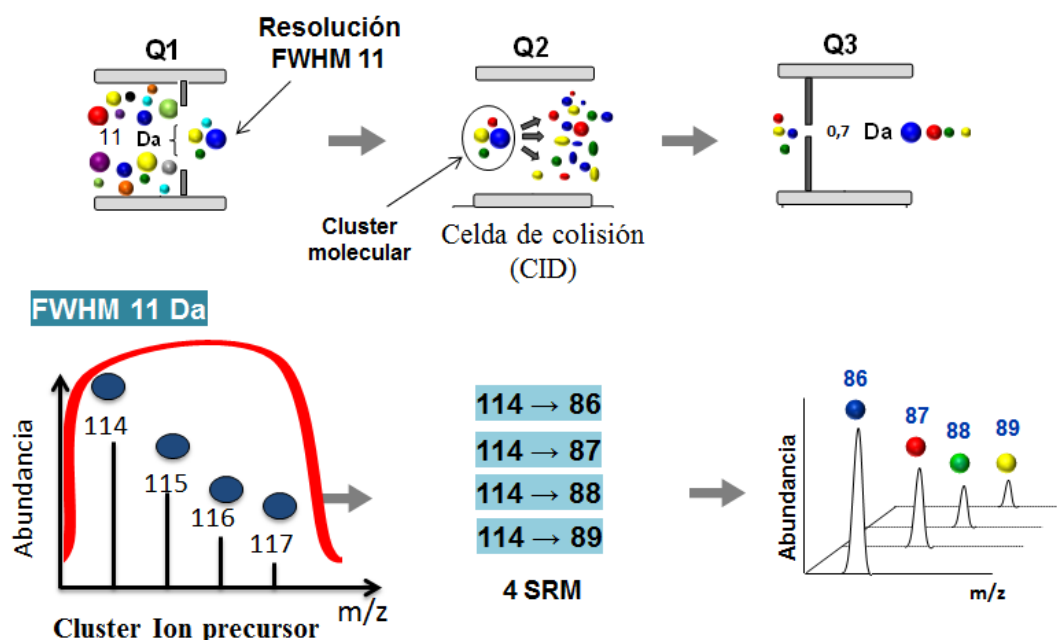


Figura 39: Medida de la composición isotópica de un compuesto en modo SRM modificando la resolución del primer cuadrupolo a 11 FWHM.

C.3.3. Conversión de los resultados de fracciones molares obtenidos mediante regresión lineal múltiple en relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Para llevar a cabo la validación de los resultados de la medida de la distribución isotópica de los metabolitos intracelulares mediante GC-MS y regresión lineal múltiple, con los valores obtenidos en el GC-C-IRMS, es necesario convertir los resultados de fracciones molares en resultados de relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, para poder compararlos con la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ obtenida en el GC-C-IRMS directamente de la medida de las áreas de las masas m/z 44 y m/z 45 resultantes de la oxidación de nuestros compuestos a CO_2 . La conversión de fracciones molares a relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se calcula usando la Ecuación [54].

$$\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} = \frac{(1 \cdot Ab_{lab}^{13\text{C}} + (n-1) \cdot Ab_{nat}^{13\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}1} + (2 \cdot Ab_{lab}^{13\text{C}} + (n-2) \cdot Ab_{nat}^{13\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}2} + (m \cdot Ab_{lab}^{13\text{C}} + (n-m) \cdot Ab_{nat}^{13\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}m} + n \cdot Ab_{nat}^{13\text{C}} \cdot X_{nat}}{(1 \cdot Ab_{lab}^{12\text{C}} + (n-1) \cdot Ab_{nat}^{12\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}1} + (2 \cdot Ab_{lab}^{12\text{C}} + (n-2) \cdot Ab_{nat}^{12\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}2} + (m \cdot Ab_{lab}^{12\text{C}} + (n-m) \cdot Ab_{nat}^{12\text{C}}) \cdot X_{13\text{C}m} + n \cdot Ab_{nat}^{12\text{C}} \cdot X_{nat}} \quad [54]$$

donde m es el número de carbonos del compuesto; n es el número de carbonos del compuesto derivatizado; Ab_{lab}^{13C} es la abundancia del ^{13}C en el átomo marcado en ^{13}C ; Ab_{nat}^{13C} es la abundancia natural del ^{13}C ; Ab_{lab}^{12C} es la abundancia del ^{12}C en el átomo marcado en ^{13}C ; Ab_{nat}^{12C} es la abundancia natural del ^{12}C y X_{13cm} son las fracciones molares, que proporcionan la contribución de cada una de las posibles incorporaciones de ^{13}C al compuesto. A continuación, la relación $^{13}C/^{12}C$ obtenida se compara con la relación $^{13}C/^{12}C$ calculada en el GC-C-IRMS. De esta manera, se puede validar el procedimiento descrito para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares con una gran exactitud y precisión.

C.3.4. Cálculo de la incertidumbre asociada a una medida mediante el método de Kragten.

En 1994, Kragten³⁰² diseñó un método de cálculo que permite determinar de forma simplificada la incertidumbre combinada de una medida, tanto si las variables son independientes como si no, utilizando una sencilla hoja de cálculo de Microsoft Excel. Al simplificar enormemente los cálculos, se minimizan los riesgos de error y se facilita la comprensión del proceso.

Para un resultado y que depende de una serie de parámetros a, b, c, \dots la expresión para la incertidumbre de y viene dada por:

$$u_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 u_a^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)^2 u_b^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c}\right)^2 u_c^2 + \dots \quad [55]$$

En los casos en que $y(a, b, c, \dots)$ es lineal en a, b, c, \dots o cuando el valor de $u(a), u(b), u(c), \dots$ es pequeño en comparación con a, b, c respectivamente, las derivadas parciales se pueden aproximar a:

$$\frac{\partial y}{\partial a} = \frac{y(a+u(a)) - y(a, b, c, \dots)}{u(a)} \quad [56]$$

La incertidumbre en y debida a la incertidumbre en a se obtiene mediante la diferencia de los valores de y calculados para $[a+u(a)]$ y a respectivamente:

$$u(y, a) = y \left((a + u(a)), b, c \dots \right) - y(a, b, c \dots) \quad [57]$$

Por lo tanto la Ecuación [55] se puede transformar en:

$$u(y(a, b, c, \dots)) = \sqrt{u(y, a)^2 + u(y, b)^2 + u(y, c)^2 + \dots} \quad [58]$$

La construcción de una hoja de cálculo se muestra en la Figura 40 para el caso de un resultado que es función de cuatro parámetros p , q , r y s . En la Figura 40A, que se corresponde con el primer paso, en la columna A se disponen los valores de los cuatro parámetros de los que depende y , así como la fórmula que permite el cálculo de y a partir de los valores de p , q , r y s . Además en la primera fila de cada columna se introduce la incertidumbre de cada uno de los parámetros $u(p)$, $u(q)$...etc. A continuación, el valor de la incertidumbre de cada variable se suma al valor de p , q , r y s en esa misma columna (Figura 40B),. y se vuelve a calcular de nuevo mediante la fórmula el valor de y . De esta manera, en el caso de la variable p , la incertidumbre en y debido a la incertidumbre de p ($u(p)$) se obtiene:

$$u(y, p) = f(p + u(p), q, r \dots) - f(p, q, r \dots) \quad [59]$$

Por último, la incertidumbre combinada de y se calcula con la Ecuación [58] como se puede observar en la Figura 40C. Además según este procedimiento se puede calcular la contribución de cada una de las posibles fuentes de incertidumbre en el resultado final.

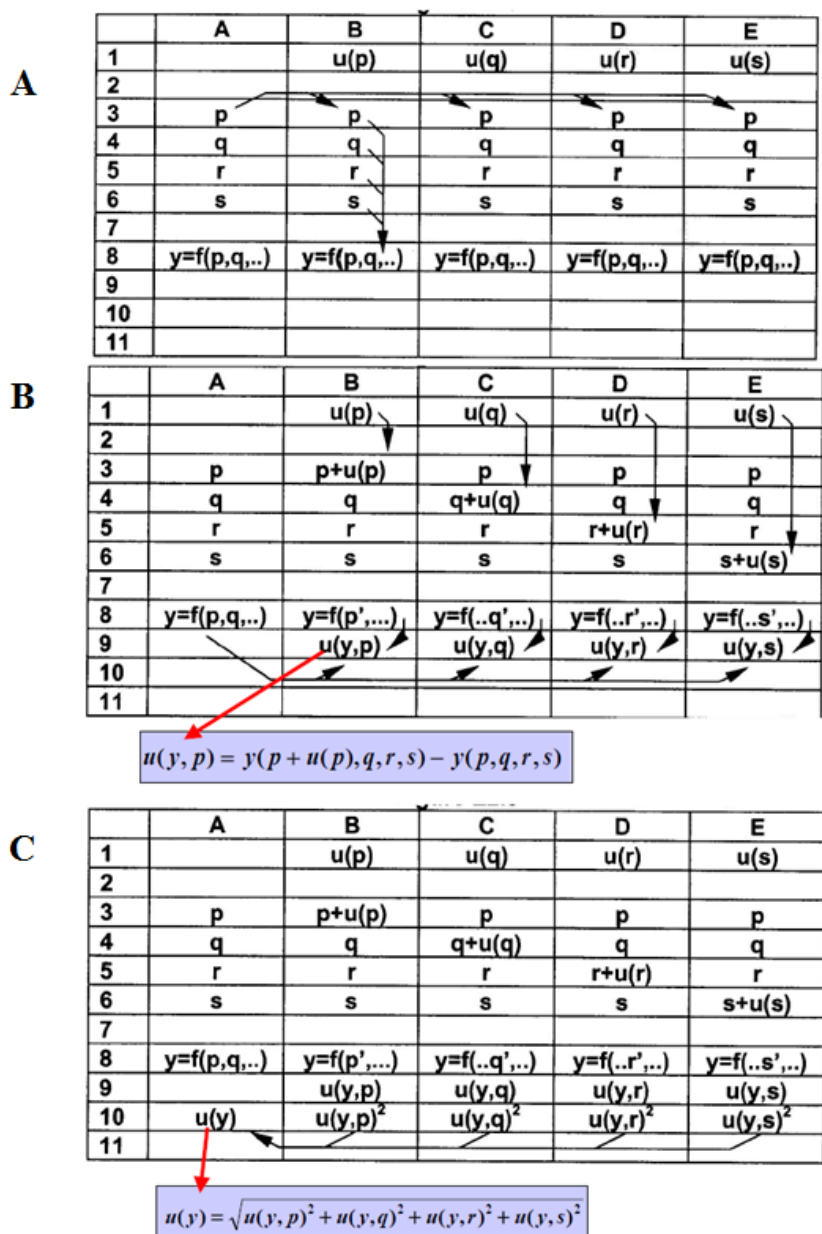


Figura 40: Hoja de cálculo de Microsoft Excel para el cálculo de la incertidumbre combinada de un resultado según el método de Kragten.

D. RESULTADOS

D.1. Desarrollo de una metodología para la determinación de creatinina en muestras de suero humano interferidas por bilirrubina mediante dilución isotópica y GC-EI-MS.

Artículo científico I: *Clinica Chimica Acta*, 2014, 431, 96-102

Título: “Development of an isotope dilution GC–MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples”



Autores: Mario Fernández-Fernández, Ana González-Antuña, Pablo Rodríguez-González, M. Elena Añón Álvarez, Francisco V. Álvarez, J. Ignacio García Alonso

Clinica Chimica Acta 431 (2014) 96–102

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

CrossMark

Development of an isotope dilution GC–MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples

Mario Fernández-Fernández^a, Ana González-Antuña^a, Pablo Rodríguez-González^{a,*}, M. Elena Añón Álvarez^b, Francisco V. Álvarez^b, J. Ignacio García Alonso^a

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain
^b Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 10 October 2013
 Received in revised form 4 December 2013
 Accepted 9 January 2014
 Available online 5 February 2014

Keywords:
 Serum creatinine
 Focused microwave
 Isotope dilution mass spectrometry

ABSTRACT

The accurate determination of creatinine in serum is essential for the diagnosis and treatment of kidney diseases. The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out by the Jaffe method or by enzymatic methods that may suffer from interferences. So, the development of reliable, fast and interference-free routine methods for complex serum samples is required. A fast method using isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) was developed using minimally ¹³C labeled creatinine analogs, multiple linear regression and rapid derivatization of creatinine with acetylacetone in 2 min by using focused microwave technology. The proposed method was validated with the analyses of two Certified Reference Materials (ERM-DA252a and ERM-DA253a) and compared with the Jaffe and enzymatic methods when analyzing real serum samples containing variable levels of bilirubin. The proposed method is capable of providing accurate serum creatinine concentrations in less than 45 min from sample arrival to full data treatment and can be an alternative routine procedure for creatinine determination in complex serum samples.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Serum creatinine concentration is used to calculate the glomerular filtration rate for the diagnosis of chronic kidney disease [1]. Due to the increasing incidence of diabetes and hypertension chronic kidney diseases is a worldwide health problem affecting 5–10% of the world population [2]. The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out using alkaline picrate methods like the Jaffe method, which is based on the colorimetric determination of the derivative obtained after the reaction of creatinine with picric acid in an alkaline medium [3]. The main limitation of this method is the well-documented interference by other chromogens such as bilirubin, proteins and ketones [4]. For example, the presence of high concentrations of bilirubin has been reported to produce a negative interference in the Jaffe method [5–8]. Two main alternative routine methodologies were developed to overcome such interferences: compensated Jaffe assays and enzymatic assays which are specific to creatinine. Compensated Jaffe methods are based on the subtraction of a constant value

for the result to compensate for non-specific chromogens. However, this strategy assumes that the non-creatinine chromogen interference is constant among samples [9]. Enzymatic assays are mostly based on a series of sequential enzyme-mediated steps which result in the formation of hydrogen peroxide [10]. They are not widely acceptable due to cost constraints but are routinely used and are currently considered as the most accurate for the routine determination of serum creatinine [11]. However, the influence of interfering substrates is still a problem for both Jaffe and enzymatic approaches [12]. Therefore, there is still a need of new reliable routine methods ensuring accurate and precise creatinine determinations in every kind of serum samples [13].

In Clinical Chemistry, and particularly in the determination of serum creatinine, IDMS is employed as a reference procedure to evaluate the accuracy of routine methods, to assign target values for reference serum pools, or to guide the development of new methods [14]. Reference procedures based on IDMS for the determination of creatinine can be found in the JCTM database [15] and include both GC–MS and LC–MS methods. Reference GC–MS procedures require several steps including long derivatization reactions [16–19]. Direct quantification of serum creatinine by isotope dilution LC–MS or LC–MS/MS offers more rapid and simple analysis than GC–MS procedures [20–22] but the instrumentation is more expensive and not so widely available.

IDMS is still not routinely employed in clinical laboratories as it is the case in environmental and food laboratories [23]. Although GC–MS instrumentation is present in most clinical laboratories the main problem for the routine application of GC–MS procedures is the long sample

^a Abbreviations: IDMS, isotope dilution mass spectrometry; GC, gas chromatography; GC–MS, gas chromatography mass spectrometry; LC, liquid chromatography; LC–MS, liquid chromatography mass spectrometry; LC–MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; EI, electron ionization; SPE, solid phase extraction; SIM, selected ion monitoring; RSD, relative standard deviation; CV, coefficient of variation; JCTM, Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine.

* Corresponding author.
 E-mail address: msd@quimica.uo.edu (P. Rodríguez-González).

0009-8981/\$ – see front matter © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.011>

D.1.1. Introducción

La Creatinina es un producto del deshecho metabólico formado a partir de la conversión no enzimática de creatina y fosfocreatina, la cual es excretada por los riñones a la orina¹¹¹. La determinación de creatinina en suero es una prueba muy común que se realiza en los análisis rutinarios de sangre, ya que cuando los niveles de creatinina en suero aumentan por encima de 10 mg/dL nos indica la existencia de una enfermedad renal crónica (CKD). Sin embargo esta prueba no sería de utilidad en la detección precoz de la misma.

La enfermedad renal crónica (CKD) se ha convertido en los últimos años en un problema de salud mundial (afecta a entre un 5-10% de la población)¹¹⁷ siendo cada vez mayor el número de afectados que se encuentran en fase avanzada de la enfermedad (necesitando diálisis e incluso trasplante¹¹³). Para poder llevar a cabo una detección precoz de la misma, en el año 2002 la *Fundación para la iniciativa de la calidad de los resultados de la enfermedad renal (K/DOQI)* recomienda la medida del índice de filtrado glomerular (GFR) para una detección precoz de la enfermedad¹¹⁴. Dentro de esta medida, una determinación exacta y precisa de la concentración de creatinina en suero se antoja fundamental.

En el análisis de rutina la determinación de creatinina en suero humano se lleva a cabo con el conocido como método de Jaffé¹²¹, basado en una detección colorimétrica del derivado formado al reaccionar la creatinina con ácido pícrico. Sin embargo, este método posee una gran limitación ya que se encuentra interferido por una gran variedad de cromógenos como son la glucosa, acetona, compuestos carbonilos y especialmente la bilirrubina, ya que su presencia en altas concentraciones da lugar a valores falsamente disminuidos en la concentración de creatinina^{135,137}, provocando un grave problema en la determinación exacta y precisa de la misma.

Existen dos alternativas metodológicas para solucionar este problema: Por una parte los métodos de Jaffé compensados, que están basados en la substracción de un valor constante de cromógeno interferente al valor final. Y por otra parte, los métodos enzimáticos basados en una serie de reacciones enzimáticas consecutivas cuyo producto final es generalmente peróxido de hidrógeno. Estos métodos están considerados en la actualidad los menos interferidos en el análisis de rutina de creatinina siendo cada vez

más recomendado su uso¹⁶⁰, aunque no están siendo del todo aceptados por los laboratorios de rutina debido a sus altos costes¹⁵⁹.

Debido a todo ello, surge la necesidad del desarrollo de nuevos métodos que proporcionen una determinación exacta y precisa de creatinina en el análisis de rutina. En este sentido, los métodos basados en dilución isotópica y espectrometría de masas (ID-MS) van a jugar un papel crucial. En la actualidad ya existen varios métodos de referencia basados en ID-MS para la determinación de creatinina, los cuales se encuentran incluidos en la base de datos de la *Comisión conjunta para la trazabilidad en la medicina de laboratorio (JCTLM)*⁹⁷, basados tanto en LC-MS como en GC-MS. Estos métodos utilizan trazadores isotópicos de creatinina enriquecidos en varios átomos de ¹³C o ¹⁵N como patrones internos, donde la determinación de creatinina se lleva a cabo a partir de curvas de calibrado. Esta estrategia posee dos inconvenientes principales: 1) La existencia de efectos isotópicos entre analito y trazador. 2) La necesidad de construir un calibrado metodológico para la determinación de creatinina. Dentro de estos métodos, los basados en LC-MS ofrecen un análisis más rápido que los basados en GC-MS^{98,163}, sin embargo la instrumentación es demasiado cara y poco accesible. A pesar de que la instrumentación de los métodos basados en GC-MS se encuentra disponible en la mayor parte de los laboratorios de rutina, el largo procedimiento de tratamiento de muestra que conlleva que incluye reacciones de derivatización muy largas imposibilita su aplicación en el análisis de rutina.

En este capítulo se presenta una alternativa para la determinación de creatinina mediante ID-MS y GC-MS, la cual reduce el tiempo de derivatización a únicamente dos minutos, elimina la necesidad de realización de una curva de calibrado y podría ser aplicado al análisis de rutina de creatinina en muestras interferidas.

La metodología propuesta está basada en el uso de creatinina marcada en un solo átomo de ¹³C con el objetivo de minimizar los efectos isotópicos a lo largo del análisis combinada con la regresión lineal múltiple que nos permite resolver el solapamiento espectral entre muestra y trazador, proporcionando directamente y a partir del espectro de masas experimental muestra-trazador las fracciones molares de analito (X_{nat}) y trazador (X_{enr}) y evitando como se ha demostrado anteriormente^{173,303} la realización de una curva de calibrado y por tanto, cuantificar la concentración de creatinina a partir de una solo medida.

Esta metodología involucra además una etapa de derivatización basada en el uso de radiación microondas focalizada lo cual reduce esta etapa a un tiempo de dos minutos permitiendo llevar a cabo una determinación de creatinina exacta, precisa y libre de interferencias en menos de cuarenta y cinco minutos, pudiendo así aplicarse en el análisis de rutina.

D.1.2. Objetivos

El objetivo principal del capítulo fue el desarrollo de una metodología para la determinación de creatinina en muestras de suero humano interferidas por bilirrubina mediante dilución isotópica y GC-EI-MS. Este objetivo se desarrolló a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de las condiciones de la separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE).
2. Optimización de las condiciones de la reacción de derivatización de creatinina con acetilacetona para su análisis mediante GC-EI-MS.
3. Medida de la composición isotópica de creatinina mediante GC-EI-MS.
4. Caracterización de la $^{13}\text{C}_1$ -Creatinina en abundancia isotópica y en concentración mediante GC-EI-MS.
5. Validación de la metodología desarrollada mediante el análisis de un suero control liofilizado y con dos materiales de referencia de suero humano congelado certificados en creatinina (ERM-DA252a y ERM-DA253a).
6. Comparación de la metodología desarrollada con otros métodos de determinación de creatinina en análisis de rutina en muestras de suero humano no interferidas con bilirrubina.
7. Comparación de la metodología desarrollada con otros métodos de determinación de creatinina en análisis de rutina en muestras de suero humano interferidas con bilirrubina

D.1.3. Artículo científico I

Development of an Isotope Dilution GC-MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples

Mario Fernández-Fernández^a, Ana González-Antuña^a, Pablo Rodríguez-González^{a*}, M^a Elena Añón Álvarez^b, Francisco V. Álvarez Menéndez^b, J. Ignacio García Alonso^a.

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

^b*Clinical Biochemistry Service of the Central University Hospital of Asturias. Oviedo, Spain*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

The accurate determination of creatinine in serum is essential for the diagnosis and treatment of kidney diseases. The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out by the Jaffe method or by enzymatic methods that may suffer from interferences. So, the development of reliable, fast and interference-free routine methods for complex serum samples is required. A fast method using Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) was developed using minimally ¹³C labeled creatinine analogues, multiple linear regression and rapid derivatization of creatinine with acetylacetone in 2 minutes by using focused microwave technology. The proposed method was validated with the analysis of two certified reference materials (ERM-DA252a and ERM-DA253a) and compared with the Jaffe and enzymatic methods when analyzing real serum samples containing variable levels of bilirubin. The proposed method is capable of providing accurate serum creatinine concentrations in less than 45

minutes from sample arrival to full data treatment and can be an alternative routine procedure for creatinine determinations in complex serum samples.

HIGHLIGHTS

Isotope Dilution GC-MS procedure for routine determination of serum creatinine.

Application of microwave radiation decrease sample preparation time.

Minimally labeled analogue and multiple linear regression avoid calibration graph.

Method provides serum creatinine concentrations in less than 45 minutes.

Comparison with Jaffé and enzymatic methods in interfered serum samples analyses.

KEYWORDS: Serum creatinine; Focused microwaves; Isotope dilution mass spectrometry.

LIST OF ABBREVIATIONS

IDMS: Isotope dilution mass spectrometry

GC: Gas chromatography

GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry

LC: Liquid chromatography

LC-MS: Liquid chromatography mass spectrometry

LC-MSMS: Liquid chromatography tandem mass spectrometry

EI: Electron ionization

SPE: Solid phase extraction

SIM: Selected ion monitoring

RSD: Relative standard deviation

CV: Coefficient of variation

JCTLM: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine

1. INTRODUCTION

Serum creatinine concentration is used to calculate the Glomerular filtration rate for the diagnosis of chronic kidney disease [1]. Due to the increasing incidence of diabetes and hypertension chronic kidney diseases is a worldwide health problem affecting 5-10% of the world population [2]. The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out using alkaline picrate methods like the Jaffe method, which is based on the colorimetric determination of the derivative obtained after the reaction of creatinine with picric acid in an alkaline medium [3]. The main limitation of this method is the well-documented interference by other chromogens such as bilirubin, proteins or ketones [4]. For example, the presence of high concentrations of bilirubin has been reported to produce a negative interference in the Jaffe method [5-8]. Two main alternative routine methodologies were developed to overcome such interferences: compensated Jaffe assays and enzymatic assays which are specific to creatinine. Compensated Jaffe methods are based on the subtraction of a constant value for the result to compensate for non-specific chromogens. However, this strategy assumes that the non-creatinine chromogen interference is constant among samples [9]. Enzymatic assays are mostly based on a series of sequential enzyme-mediated steps which result in the formation of hydrogen peroxide [10]. They are not widely acceptable due to cost constraints but are routinely used and are currently considered as the most accurate for the routine determination of serum creatinine [11]. However, the influence of interfering substances is still a problem for both Jaffe and enzymatic approaches [12]. Therefore, there is still a need of new reliable routine methods ensuring accurate and precise creatinine determinations in every kind of serum samples [13].

In Clinical Chemistry, and particularly in the determination of serum creatinine, IDMS is employed as a reference procedure to evaluate the accuracy of routine methods, to

assign target values for reference serum pools, or to guide the development of new methods [14]. Reference procedures based on IDMS for the determination of creatinine can be found in the JCTLM database [15] and include both GC-MS and LC-MS methods. Reference GC-MS procedures require several steps including long derivatization reactions [16-19]. Direct quantification of serum creatinine by Isotope Dilution LC-MS or LC-MSMS offers more rapid and simple analysis than GC-MS procedures [20-22] but the instrumentation is more expensive and not so widely available.

IDMS is still not routinely employed in clinical laboratories as it is the case in environmental and food laboratories [23]. Although GC-MS instrumentation is present in most clinical laboratories the main problem for the routine application of GC-MS procedures is the long sample preparation time required. We present here a fast Isotope Dilution GC-MS method which reduces the derivatization time down to only 2 minutes, eliminates the calibration graph and could be eventually used for the routine determination of serum creatinine in interfered samples. The proposed method combines the use of minimally ^{13}C labeled creatinine with a short derivatization step based on the application of focused microwave radiation. Minimal ^{13}C labeling and multiple linear regression is employed to avoid the calibration graph as described previously [23, 24]. The method provides interference-free determinations of serum creatinine in less than 45 minutes which is a significant decrease of the analysis time compared to more classical isotope dilution GC-MS methods. Thus, the total analysis time of the method is even lower than that of current LC-MS and LC-MSMS procedures.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and materials

Creatinine labeled in one ^{13}C atom ($^{13}\text{C}_1$ -creatinine) with a 99 % enrichment was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A certified natural abundance creatinine standard was obtained from Sigma-Aldrich. Acetylacetone was purchased by Sigma-Aldrich. Precinorm and Precipath lyophilized serum based controls were provided by Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Frozen human serum samples were provided by the Clinical Biochemistry Service of the Central University Hospital of Asturias. The certified reference materials ERM-DA252a and ERM-DA253a (frozen human serum) were purchased from the Laboratory of the Government Chemist (LGC, United Kingdom). Weak cation exchange solid phase extraction tubes were purchased from Sigma-Aldrich. HCl and NH_3 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents-hexane, methanol, ethanol and glacial acetic acid were supplied by Merck.

2.2 Instrumentation

A mass spectrometric detector 5975B (Agilent technologies, Tokyo, Japan) with an EI source coupled to a 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies) was employed. The GC was fitted with a split/splitless injector and a HP-5 MS capillary column (crosslinked 5% phenylmethylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm coating). An Explorer 12-Hybrid focused microwave (CEM corporation, Matthews, NC, USA) was used to carry out the derivatization of creatinine with acetylacetone. An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions and a mini-vap evaporator/concentrator (Supelco, St. Louis, MO, USA) was used for the evaporation of the samples. A Jaffe rate blanked and compensated method and a Roche Creatinine Plus enzymatic assay

(creatininase, creatinase, sarcosine oxidase) both on a Roche Cobas C711 analyzer were employed.

2.3 Procedures

2.3.1 Addition of isotopically labeled analogue and creatinine isolation by SPE

An approximate 0.4 g of a 10 ppm solution of $^{13}\text{C}_1$ -Creatinine previously certified in concentration by reverse IDMS was added to ca. 0.4 g of serum sample and the mixture was manually shaken for 1 minute for homogenization. The amounts of sample and labeled standard added were controlled gravimetrically with an analytical balance. Creatinine and creatine contained in the mixture were separated by SPE using weak cation exchange cartridges. The separation of both compounds required the following steps: i) activation with 2 ml of MeOH and 2 mL of Milli-Q water, ii) conditioning with 3 ml of 1 M ammonium hydroxide, 5 ml of Milli-Q water, 3 ml of 1M hydrochloric acid and 5 ml of Milli-Q water, iii) application of the sample to the cartridge, iv) wash with 3mL of Milli-Q water to remove creatine and v) elution of creatinine with 1 mL of 1 M ammonium hydroxide.

2.3.2 Derivatization and extraction of creatinine

The creatinine eluted from the SPE cartridge was transferred to a 10 ml test tube in which 40 μL of glacial acetic acid, 100 μL of acetylacetone and 800 μL of ethanol were subsequently added. Then, the test tube was capped and introduced into the focused microwave instrument to perform the derivatization reaction at 170°C for 2 minutes. After the derivatization reaction, 1 ml of hexane was added and the reaction tube was briefly shaken for 1 minute. Finally, the organic layer was transferred to a chromatographic vial with a Pasteur pipette, and the solvent was evaporated under a

gentle stream of nitrogen until approximately a volume of 40 μ L. The sample was stored at -18°C until injection into the GC-MS system.

2.3.3 GC-MS experimental conditions

The column temperature was initially held at 70°C for 1 minute, and then a temperature ramp of 12°C/min was applied until 202°C. A second temperature ramp of 60°C/min was applied until 300°C for 2 minutes. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 2 ml/min. The injector temperature was kept at 220°C while the interface temperature and the ion source were 280°C and 230°C respectively. A sample volume of 2 μ l was injected in splitless mode with 1 minute of purge time. The electron ionization source was run at 70 eV. The creatinine quantification was performed measuring the m/z range 221-225 using a 10 ms dwell time per mass in the SIM mode.

3 Calculation

The Isotope Dilution calculation methodology applied in this work is based on the combination of multiple linear regression and minimally labeled ^{13}C compounds to avoid isotopic effects [23, 24]. Briefly, the isotope distribution measured in the blend of natural abundance and labeled creatinine, A_{mix} , can be assumed to be a linear combination of the isotope distribution of natural abundance creatinine, A_{nat} , and that of the labeled analogue, A_{lab} . The relative contribution of both isotope patterns in the experimental mass spectrum of the mixture, the molar fractions, can be calculated by multiple linear regression [23]. This is better described in equation (1) in matrix notation for the measurement of a given number n of masses.

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{lab}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{lab}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{lab}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{lab}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{lab}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (1)$$

When $n > 2$ and error vector needs to be included in the calculations as the solution is obtained by least squares. The solutions to equation (1), the molar fractions of natural and labeled creatinine in the mixture, x_{nat} and x_{lab} , can be obtained using conventional spreadsheet software (e.g. LINEST function of Microsoft Excel). Then, the amount of natural abundance compound, N_{nat} , can be directly calculated using equation (2) because the added amount of labeled standard (N_{lab}) is known.

$$\frac{N_{nat}}{N_{lab}} = \frac{x_{nat}}{x_{lab}} \quad (2)$$

According to equation (2) this procedure does not require the preparation of a methodological calibration graph as the ratio of molar fractions measured in the sample is equal to the ratio of moles. In addition, the occurrence of isotopic effects between natural and labeled analogues during sample preparation and determination by GC-MS is minimized by the use of minimally ^{13}C labeled compounds in comparison with multiply labeled standards [25].

4. RESULTS

4.1 Derivatization of creatinine in human serum samples using focused microwave radiation.

Creatinine is a non-volatile and polar compound, thus chemical derivatization is required for its determination by GC-MS. In an initial comparison of different derivatization reagents (trifluoroacetic anhydride [26]), methylchloroformate [27] and

acetylacetone [18]) we observed that the highest sensitivity was obtained with acetylacetone. However, the quantitative derivatization with acetylacetone required heating of the sample at 85°C during 66 hours [18]. We evaluated the use of focused microwave radiation from a commercial microwave reactor employed in chemical synthesis to obtain a significant decrease of the total analysis time. The microwave unit employed in this work incorporates a circular cavity and a wave guide that is capable of self-tuning. The temperature control system is based on a non-contact infrared sensor which monitors and controls the temperature conditions of the reaction vessel located in the instrument cavity without introducing a temperature probe inside of the sample. The achievement of quantitative derivatization yields was not required thanks to the use of the minimally labeled analogue ($^{13}\text{C}_1$ -creatinine) which minimizes the occurrence of isotope effects during derivatization. Different derivatization temperatures (120, 170 and 200 °C) and derivatization times (2, 4, 10 and 15 min) were tested. The highest absolute yield was obtained at 170 °C with 15 minutes reaction time. However similar sensitivities were obtained at the other reaction times so, we selected 170 °C and 2 minutes for further experiments.

4.2 Measurement of the isotopic composition of creatinine by GC-MS

The mass spectra of the creatinine derivative (ethyl ester of N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-N-methylglycine) acquired from m/z 50 to 400 in the scan mode is shown in Figure 1. The mass spectra includes two main clusters at m/z 223 ($\text{C}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{H}_{17}$) and at m/z 150 ($\text{C}_8\text{N}_3\text{H}_{12}$). In the EI source, different fragmentation mechanisms may occur simultaneously and fragment ions containing different number of hydrogen atoms can overlap in the mass spectrum [28] so the purity of the resulting mass clusters was studied to select the most suitable to carry out accurate measurements of creatinine

isotope abundances. The results obtained using the method described previously [23,24] are given in Table 1. The major contribution for both clusters in both the natural and labeled analogues arises from the M^+ ion and that the contributions due to the loss of hydrogen atoms, $M-H^+$ and $M-2H^+$, are very small particularly for the cluster at masses 221-225. Overall, the cluster at nominal masses 221-225, presents a higher molar fraction of the molecular ion M^+ (0.997 ± 0.002 for natural abundance creatinine and 0.996 ± 0.002 for the ^{13}C labeled analogue) and can be considered pure. As it will be seen below, this cluster was selected for IDMS measurements in spite of its lower sensitivity. Figure 2 shows the corresponding mass spectra of the natural abundance creatinine, ^{13}C labelled creatinine and a mixture of both in the m/z range 220-230.

4.3 Concentration and isotope composition of the $^{13}\text{C}_1$ -creatinine standard.

The proposed IDMS method requires the accurate knowledge of the amount of $^{13}\text{C}_1$ -creatinine added to the sample as is shown in equation (2). For that purpose a certified natural abundance creatinine standard was employed in the reverse IDMS mode to calculate the concentration of the $^{13}\text{C}_1$ -creatinine. The concentration of the labeled standard stock solution employed was $98.75 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$. The isotopic enrichment of ^{13}C was found to be 98.9% calculated according to the method described elsewhere [29] in agreement with the nominal enrichment provided by the manufacturer (99%).

4.4 Validation of the methodology

First, the precision of the proposed IDMS method was evaluated analyzing $n=8$ independent aliquots of a pooled serum sample not interfered by bilirubin. When comparing the results obtained for both clusters, a better intra-assay precision or repeatability expressed as the relative standard deviation (%RSD) was obtained using

the molecular ion cluster at $m/z=223$ (1.1 %) than when using the major ion cluster at $m/z=150$ (2.6 %). This can be attributed to the lower occurrence of spectral interferences in this region of the mass spectra and to the higher purity of the mass cluster. In both cases the intra-assay precision was significantly better than the requirements regarding minimum and desirable biological variation (4.5 and 3%) [30]. Secondly, the inter-assay precision or reproducibility of the method was estimated from the analysis of $n=6$ independent replicates of the control lyophilized serum Precinorm U, carried out in six different measurement sessions over a period of 20 days. The obtained inter-assay precision obtained was 1.0 % which was of the same order than the intra-assay precision obtained for the pooled serum at a similar concentration level. These results are summarized in Table 2.

The accuracy of the method was evaluated by analyzing two different certified reference materials: ERM-DA252a and ERM-DA253a (frozen human serum). The results for ERM-DA252a were obtained in three measurement days analyzing two replicates each day whereas the results of ERM-DA253a were obtained in two measurement days analyzing two independent replicates each day. Table 3 shows that the concentrations obtained by the proposed method were in good agreement with the certified values for both materials. The combined uncertainty u_i for each replicate was calculated following the procedure proposed by Kragten [31]. Then, the total combined uncertainty, u , was calculated using equation (3):

$$u = \sqrt{s(\bar{x})^2 + \frac{1}{n} \sum u_i^2} \quad (3)$$

Where $s(\bar{x})$ is the standard deviation and n the number of replicates.

Unfortunately, there are no reference materials containing high concentrations of bilirubin which can be used for the validation of our procedure in complex serum samples.

4.5 Comparison with other routine procedures for human non-icteric serum samples

Ten serum samples not interfered by bilirubin were analyzed by both the Jaffe colorimetric method and the proposed GC-MS method. All samples were analyzed by triplicate in a range of creatinine concentration from 0.37 mg/dL to 14.8 mg/dL (33 $\mu\text{mol/L}$ and 1308 $\mu\text{mol/L}$). Quality control serum samples (Precinorm and Precipath) were analyzed before and after the measurement of the samples by both methods with satisfactory results. Figure 3A shows that there is not a statistical difference between the Jaffe method and the GC-MS procedure for samples presenting a creatinine concentration level lower than 4 mg/dL (353 $\mu\text{mol/L}$). The calculated mean relative bias for these samples was -0.036 mg/dL (3 $\mu\text{mol/L}$) with 95% confidence intervals of -0.076 and 0.04 mg/dL. However, for samples with creatinine levels from 5.6 up to 14.8 mg/dL (495-1308 $\mu\text{mol/L}$), the Jaffe method presents a significant negative bias of -0.46 mg/dL (-41 $\mu\text{mol/L}$) with 95% confidence intervals of -0.683 and -0.241 mg/dL. According to paired t-test, the Jaffe method provides significantly different creatinine concentrations than the proposed GC-MS procedure at concentrations higher than 5.6 mg/dL.

4.6 Analysis of human icteric serum samples

Nineteen icteric serum samples interfered by bilirubin were analyzed by the proposed GC-MS method and the Jaffe method. Also, twelve of these samples were analyzed by the enzymatic method for comparison purposes. The serum creatinine concentration

range of the samples was from 0.5 to 3.7 mg/dL (44 and 327 $\mu\text{mol/L}$) whereas the total bilirubin concentration range in these samples was from 6 to 49 mg/dL (105 and 857 $\mu\text{mol/L}$). Quality control serum samples (Precinorm and Precipath) were analyzed before and after the measurement of the samples by all methods with satisfactory results. Figure4 shows the Bland-Altman plots showing the relative difference between the Jaffe method and the proposed GC-MS method. The calculated mean relative bias was -0.028 mg/dL (2.5 $\mu\text{mol/L}$) with 95% confidence intervals of -0.087 and 0.031 mg/dL. According to paired t-test at the 95% confidence interval the Jaffe method (in the concentration range assayed) does not present a significant interference by bilirubin regardless its concentration. This is in agreement with the results obtained for the non-interfered samples with concentrations lower than 4 mg/dL (353 $\mu\text{mol/L}$).

Finally, the enzymatic assay was compared with the proposed GC-MS method in twelve of the previous samples from 0.5 to 3.7 mg/dL. Figure5 shows the Bland-Altman plot showing the relative difference between the enzymatic method and the proposed GC-MS method. The calculated mean relative bias was -0.16 mg/dL (-14.1 $\mu\text{mol/L}$) which is almost a 6 times higher negative bias than that obtained with the Jaffe method. The obtained 95% confidence intervals were -0.224 and -0.088 mg/dL. According to paired t-test the enzymatic method provides different creatinine concentrations than the GC-MS method at the 95% confidence interval.

5. DISCUSSION

We are proposing an additional procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples which could be implemented in the clinical laboratory as the total analysis time is less than 45 minutes. The method is based on the following steps:

- 1) Addition of a known amount of $^{13}\text{C}_1$ -labelled creatinine to the serum sample on a

weight basis and homogenization of the mixture. 2) Separation of creatinine and creatine by weak cation exchange. 3) Derivatisation of creatinine with acetylacetone using a focused microwave reactor. 4). Injection in the GC-MS instrument and 5) Calculation of the concentration of creatinine in the sample by IDMS using multiple linear regression.

We have calculated the imprecision and bias for the proposed method using the model that relates analytical performance to the intra- and inter-individual biological variation of creatinine [32] following the specifications recommended by Stöckl et al [33]. The allowable bias and CV for routine measurement procedures were calculated as $CV_{rou} = 0.52 \cdot CV_g$ and $B_{rou} = 0.25 \cdot CV_g$ [33]. Using the CV_g value of 14.7 the limit for routine imprecision is set in $CV_{rou} = 7.64\%$ and the limit for routine bias in $B_{rou} = 3.67\%$. From the results obtained in the analysis of ERM-DA252a using the combined uncertainty we obtained $CV = 5.92\%$ and $B = 2.04\%$ whereas in the analysis of ERM-DA253a we obtained $CV = 1.08\%$ and $B = 3.44\%$. According to these values the method meets the specifications for a routine method in both materials.

When comparing the proposed GC-MS method with the Jaffe and the enzymatic methods in non-icteric samples our results show that the Jaffe method correlates well with the proposed GC-MS method in a serum creatinine concentration range from 0.37 to 3.2 mg/dL (33 and 283 $\mu\text{mol/L}$). When analyzing icteric samples in a similar concentration range from 0.5 to 3.7 mg/dL (44 and 327 $\mu\text{mol/L}$) the Jaffe method also correlated with our proposed GC-MS method. However, a significant negative bias of the Jaffe method was obtained in non-icteric samples in a higher concentration range from 5.6 to 14.81 mg/dL (496 and 1309 $\mu\text{mol/L}$). Significant bias of Jaffe methods versus IDMS procedures has been already reported in previous works [11, 34-37] and

the use of enzymatic methods for the routine determination of serum creatinine is currently more and more recommended [11, 36-37].

However, the comparison of the enzymatic method with the proposed GC-MS procedure showed a significant negative bias in the same icteric samples analyzed by Jaffe regardless the bilirubin concentration. This bias was almost six times higher than that obtained by the Jaffe method. Although more expensive than Jaffe methods, the enzymatic methods are often claimed to be less affected by interferences [11]. However our results show the opposite for the bilirubin interference and are in agreement with previous findings by Owen and Keevil [38] who studied the compensated Jaffe and the enzymatic Roche methods in serum samples with bilirubin concentrations from 5.8 to 56 mg/dL (99-985 $\mu\text{mol/L}$). Except for one sample, their compensated Jaffe method did not show a significant interference. However, using the enzymatic method 49% of the samples showed a negative bias higher than -10%. Ji and Meng [39] also reported a negative interference by bilirubin using enzymatic Roche Cobas 6000. Also, Greenberg et al [12] compared several commercial enzymatic and Jaffe procedures with a LC-IDMS procedure in 20 samples with a creatinine concentration range from 0.47 to 3 mg/dL and bilirubin concentration range from 9 to 38 mg/dL (154-650 $\mu\text{mol/L}$). They found that in 3 out of 4 enzymatic procedures and in 1 out of 3 Jaffe procedures a large portion of the samples were negatively biased showing a more robust behavior of the Jaffe methods in icteric samples. In agreement with these works, our results also shows that the influence of bilirubin concentration is complex, not correlated with the observed bias and dependent on the technical implementation of the measurement procedure. For example, Dimeski et al [40] observed that two Jaffe methods using the same instrumentation (Beckman platforms) provided a different correlation between bias and bilirubin concentrations, the only difference between the methods being the temperature

and time employed in the incubation. Cobbaert et al [41] evaluated several enzymatic, compensated and uncompensated Jaffe methods in serum samples spiked with 100 $\mu\text{mol/L}$ of bilirubin finding comparable negative interferences by bilirubin in the enzymatic and most Jaffe methods. Srisawasdi et al [4] found clinically significant interferences from bilirubin in both Jaffe and enzymatic methods.

6. CONCLUSIONS

The contradictory results reported in the literature on the determination of serum creatinine in interfered samples reflect the current real need of reliable and accurate alternative routine methods. In this context, rapid IDMS procedures could be employed in the clinical laboratories for complex samples in routine assays. We have shown in this work that focused microwaves accelerates the derivatization reaction of creatinine with acetylacetone resulting in a time reduction from the 66 hours reported by Welch et al [18] to only 2 minutes. The use of Creatinine labeled in one ^{13}C has and multiple linear regression the advantage that the construction of a methodological calibration graphs is no longer needed because the molar fractions of labeled and unlabeled analogues are directly obtained from the experimental mass spectra of the sample. In this way, the creatinine concentration is directly obtained from the known amount of labeled analogue added and from a single GC-MS injection. The proposed Isotope Dilution GC-MS provides interference-free determinations in less than 45 minutes using conventional GC-MS instrumentation. The total analysis time of the method is even lower than that of current LC-MS and LC-MSMS approaches facilitating its implementation as an additional routine method in clinical laboratories. Obviously, this method should not be applied for the routine analysis of all serum samples in a clinical laboratory but may find application when analyzing complex serum samples for which

the effect of the possible interferences on the Jaffe and enzymatic assays is still controversial.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for financial support from FICYT (Asturias) in the frame of the PCTI and FEDER programs through project IB09-125. The Spanish Ministry of Science and Innovation through Project Ref. CTQ2009-12814 is also acknowledged. M.F.F. and A.G.-A. acknowledge their doctoral grant to FICYT (Asturias). P.R.-G. acknowledges his research contract RYC-2010-06644 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal Program.

REFERENCES

1. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G et al. Reference intervals for serum creatinine concentrations: Assessment of available data for global application. *Clin Chem* 2008;54:559-66.
2. National Kidney Disease Education Program. Available at: www.nkdep.nih.gov. Accessed: 16 April 2013.
3. Delanghe JR, Speeckaert M. Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? *NDT Plus* 2011;0:1-4.
4. Srisawasdi P, Chaichanajareernkul U, Teerakanjana N, Vanavanan S, Kroll MH. Exogenous interferences with Jaffe Creatinine Assays: Addition of Sodium Dodecyl Sulfate to reagent eliminates bilirubin and total protein interference with Jaffe methods. *J Clin Lab Anal* 2010;24:123-33.
5. Soldin L, Henderson L, Hill JG. The effect of bilirubin on reaction rate methods for the measurement of creatinine. *Clin Chem* 1977;23:1141.

6. Watkins RE, Feldkamp CS, Thibert RJ, Zak B. Interesting interferences in a direct serum creatinine reaction. *Microchem J* 1976;21:370-84.
7. Daugherty NA, Hammond KB, Osberg IM. Bilirubin interference with the kinetic Jaffe method for serum creatinine. *Clin Chem* 1978;24:392-3.
8. Knapp ML, Hadid O. Investigation into negative interference by jaundiced plasma in kinetic Jaffe methods for plasma creatinine determination. *Ann Clin Biochem* 1987;24:85-97.
9. Kuster N, Bargnoux AS, Pageaux GP, Cristol JP. Limitations of compensated Jaffe creatinine assays in cirrhotic patients. *Clinical Biochemistry* 2012;45:320-5.
10. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 1983;29:1494-6.
11. Panteghini M. Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:567-72.
12. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM et al. Specificity Characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012;58:391-401.
13. Myers GL, Miller WG, Coresh J et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006;52:5–18.
14. Camara J, Lippa KA, Duewer DL, Gasca-Aragon H, Toman B. An international assessment of the metrological equivalence of higher-order measurement services for creatinine in serum. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:527-35.
15. Bureau International des Poids et Mesures, Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/> Accessed: April 1st 2013.

16. Björkhem I, Blomstrand R, Öhman G. Mass fragmentography of creatinine proposed as a reference method. *Clin Chem* 1977;23:2114-21.
17. Siekmann L. Measurement of creatinine in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *J Clin Chem Biochem* 1985;23:137-44.
18. Welch MJ, Cohen A, Hertz HS et al. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method. *Anal Chem* 1986;58:1681–1865.
19. Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method Setup. *Clin Chem* 1993;39:993-1000.
20. Stokes P, O'Connor G. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum. *J Chromatogr B* 2003;794:125-36.
21. Dodder NG, Tai SSC, Sniegowski LT, Zhang NF, Welch MJ. Certification of creatinine in a human serum reference material by GC-MS and LC-MS. *Clin Chem* 2007;53:1694-9.
22. Héту PO, Gingras ME, Vinet B. Development and validation of a rapid liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry (LC-IDMS/MS) method for serum creatinine. *Clin Biochem* 2010;43:1158-62.
23. Garcia Alonso JI, Rodriguez-Gonzalez P, Isotope Dilution Mass Spectrometry, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.
24. González-Antuña A, Rodríguez-González P, Centineo G, García Alonso JI. Evaluation of minimal labelling for stable isotope dilution in organic analysis. *Analyst* 2010;135:953–64.

25. González-Antuña A, Rodríguez-González P, Lavandera I, Centineo G, Gotor V, García Alonso JI. Development of a routine method for the simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labeling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:1879-88.
26. MacNeil L, Hill L, MacDonald D et al. Analysis of creatine, creatinine, creatine-d3 and creatinine-d3 in urine, plasma, and red blood cells by HPLC and GC-MS to follow the fate of ingested creatine-d3. *J Chromatogr B* 2005;827:210-5.
27. Whitehead TL, Holmes WE, Flores BJ, Leidensdorf JW. Using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection to analyze fluorescent derivatives of the biogenic amines creatine and creatinine. *Spectroscopy Letters* 2004;37:95-103.
28. Mejia J, Caruso JA. Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* 2004;15:654-8.
29. González Gago A, Marchante Gayón JM, García Alonso JI. Determination of priority polybrominated diphenyl ethers by isotope dilution gas chromatography (electron ionization) MS using ⁸¹Br-labeled standards. *Anal Chem* 2011;83:3024-32.
30. Spanish Society of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology. http://www.seqc.es/es/Sociedad/7/51/102/Base_de_datos_de_Variacion_biologica_Base_s_de_datos_y_documentos_del_Comite_de_Garantia_de_la_Calidad_y_Acreditacion_Comite_de_Garantia_de_la_Calidad_y_Acreditacion/. Accessed: 4 June 2013.
31. Kragten J. Calculating Standard Deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* 1994; 119: 2161-2165.
32. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabase1.html>. Accessed: 4 June 2013.

33. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clinica Chimica Acta* 2009; 408: 8–13
34. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. *Ann Clin Biochem* 2006;43:118-23.
35. Vickery S, Stevens PE, Dalton RN, Van Lente F, Lamb EJ. Does the ID-MS traceable MDRD equation work and is it suitable for use with compensated Jaffe and enzymatic creatinine assays? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2439-45.
36. Boutten A, Bargnoux AS, Carlier MC et al. Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation. *Clin Chim Acta* 2013;419:123-35.
37. Drion I, Cobbaert CF, Groenier KH et al. Clinical evaluation of analytical variations in serum creatinine measurements: why laboratories should abandon Jaffe techniques. *Nephrology* 2012;13:133-40.
38. Owen LJ, Keevil BG. Does Bilirubin cause interference in Roche creatinine methods? [Letter]. *Clin Chem* 2007;53:370-1.
39. Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of haemoglobin, bilirubin and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta* 2011;412:1550-3.
40. Dimeski G, McWhinney B, Jones B, Mason R, Carter A. Extent of bilirubin interference with Beckman creatinine methods. *Annals Clin Biochem* 2008;45:91-2.
41. Cobbaert CM, Baadenhuijsen H, Weykamp CW. Prime time for enzymatic creatinine methods in paediatrics. *Clin Chem* 2009;55:549-58.

TABLES

Table 1. Spectral purity of the clusters at m/z 150 and m/z 223 obtained for natural abundance and labeled creatinine in the electron ionization source (EI).

Mass Range of Molecular Cluster	Compound	Fragment	M	M-H	M-2H
$m/z = 148-152$	Natural Creatinine	$C_8N_3H_{12}^+$ ($m/z=150$)	0.972 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001
	$^{13}C_1$ -Creatinine	$C_8N_3H_{12}^+$ ($m/z=151$)	0.971 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001
$m/z = 221-225$	Natural Creatinine	$C_{11}N_3O_2H_{17}^+$ ($m/z=223$)	0.997 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.001 ± 0.001
	$^{13}C_1$ -Creatinine	$C_{11}N_3O_2H_{17}^+$ ($m/z=224$)	0.996 ± 0.02	0.007 ± 0.001	0.001 ± 0.001

Table 2. Creatinine concentrations (mg/dL) obtained in: a) a pooled serum sample by GC-ID-MS method using the molecular fragment clusters at m/z 223 and at m/z 150; b) in the quality control serum Precinorm U in $n=6$ independent replicates measure over a period of 20 days using the GC-MS procedure.

	<i>GC-IDMS</i> (cluster at $m/z=150$)	<i>GC-IDMS</i> (cluster at $m/z=223$)
Pooled serum ($n=8$, same day)	0.810 ± 0.021 (2.6 % RSD)	0.783 ± 0.009 (1.1 % RSD)
Serum control Precinorm U ($n=6$, over 20 days)	-----	1.205 ± 0.012 (1.0 % RSD)

Table 3. Creatinine concentrations (mg/dL) obtained in the Certified Reference Materials ERM-DA-252a and ERM-DA-253a using the proposed GC-MS method

		<i>Certified value</i> 0.310 ± 0.050		<i>Certified value:</i> 5.000 ± 0.200	
		ERM DA-252a		ERM DA-253a	
		mg dL ⁻¹	u_i	mg dL ⁻¹	u_i
DAY 1	1	0.292	0.006	5.182	0.053
	2	0.303	0.005	5.156	0.054
DAY 2	3	0.293	0.005	5.174	0.057
	4	0.323	0.014	5.176	0.055
DAY 3	5	0.322	0.010		
	6	0.290	0.012		
Average		0.304		5.172	
Standard deviation (<i>Is</i>)		0.015		0.011	
Total combined uncertainty (<i>u</i>)		0.018		0.056	

FIGURES

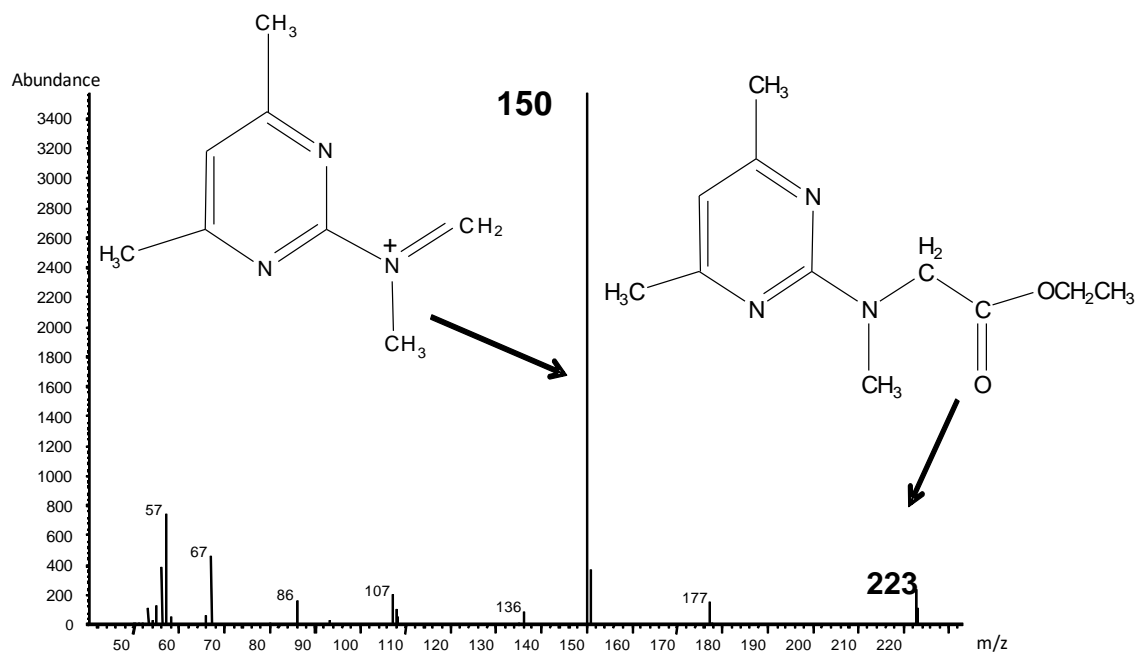


Figure 1. GC-MS spectrum (m/z range 50-400) of a creatinine standard derivatised with acetylacetone (Ethyl ester of N-(4,6 dimethyl-2 pirimidinyl)-N-mehyilglicine).

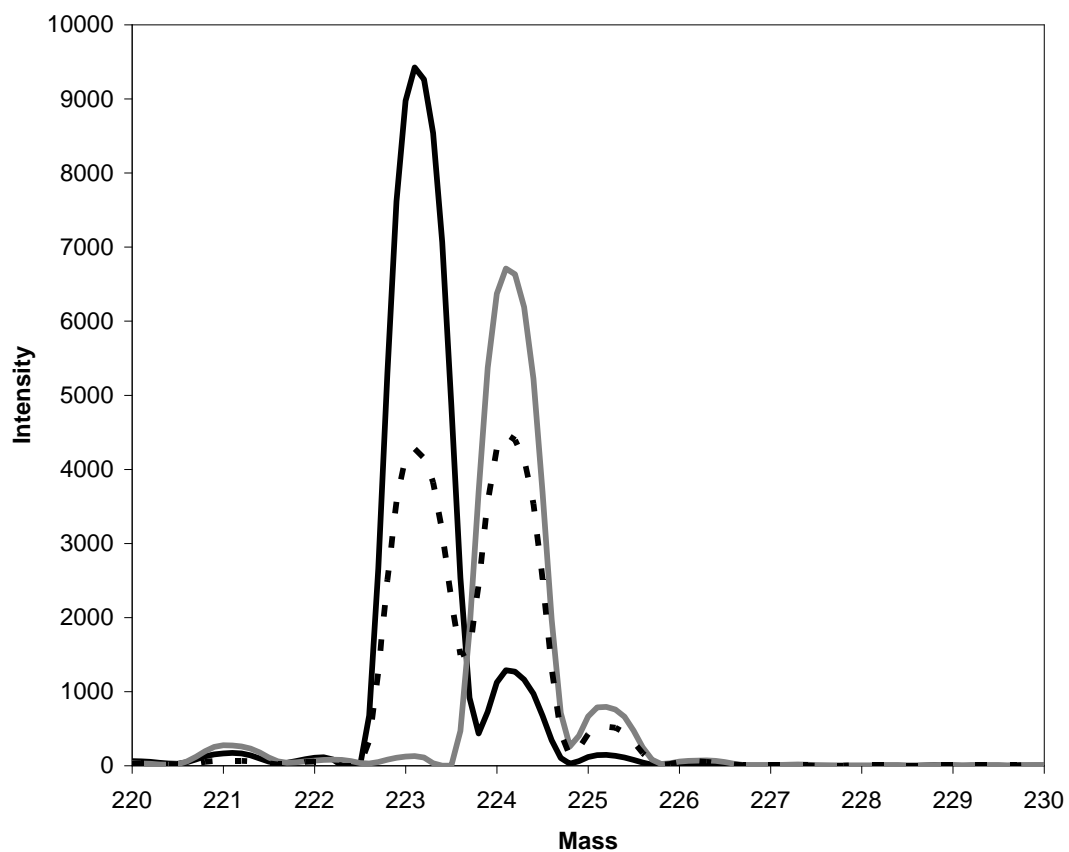


Figure 2. GC-MS spectra obtained in SCAN mode of the derivatised natural abundance creatinine (black line), ^{13}C labelled creatinine (grey line) and a mixture of natural abundance and labelled creatinine (dotted line) in the m/z range 221-230.

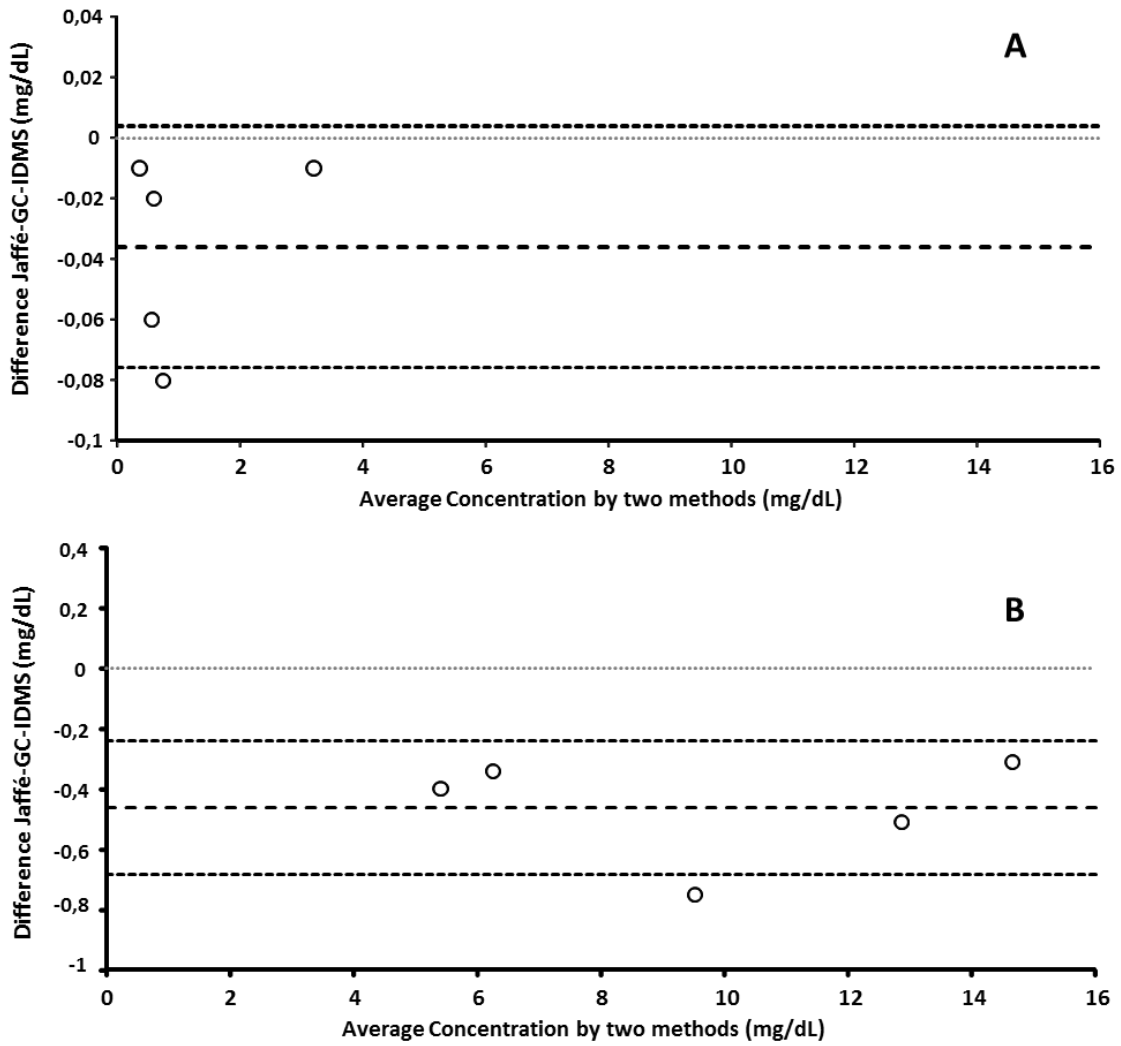


Figure 3. Bland-Altman plot showing the relative difference between the Jaffe method and the proposed GC-MS method with the mean relative bias and the corresponding 95% confidence interval represented by dotted lines in samples not interfered by bilirubin in A) a concentration range from 0.37 to 3.2 mg/dL and B) a concentration range from 5.6 to 14.8 mg/dL.

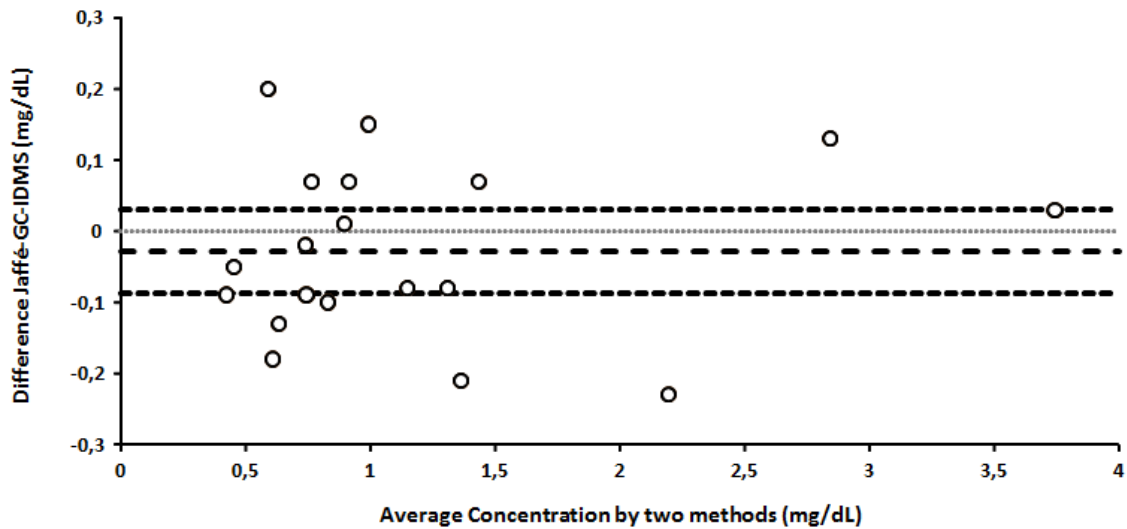


Figure 4. Bland-Altman plot showing the relative difference between the Jaffe method and the proposed GC-MS method in samples interfered by bilirubin, with the mean relative bias and the corresponding 95% confidence interval represented by dotted lines.

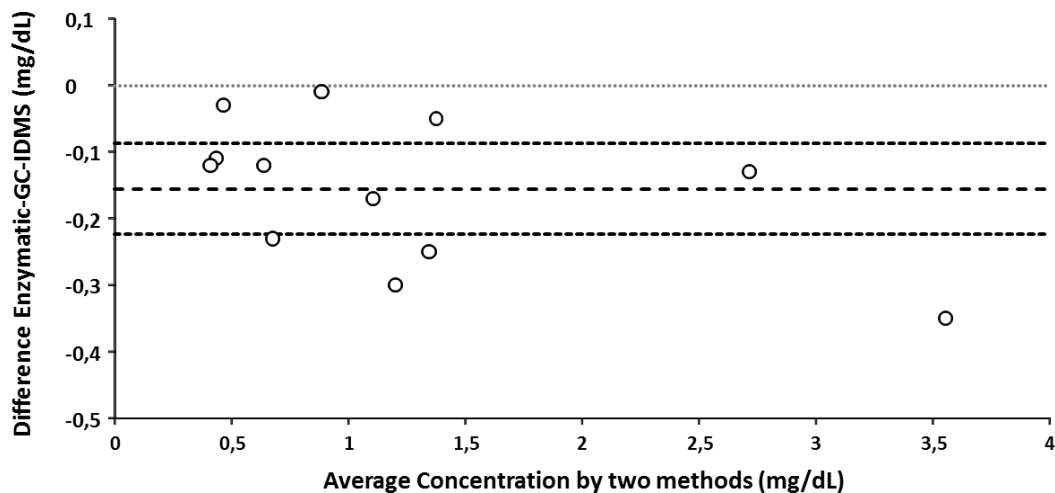


Figure 5. Bland-Altman plot showing the relative difference between the enzymatic method and the proposed GC-MS method in samples interfered by bilirubin, with the mean relative bias and the corresponding 95% confidence interval represented by dotted lines

D.2. Determinación simultánea de creatina y creatinina en suero humano mediante HPLC-ESI-MS/MS utilizando doble trazador isotópico que permita corregir la posible interconversión Creatina-Creatinina.

Artículo científico II: Analytical Chemistry 2015, 87(7), 3755-3763.

Título: “Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)”

Autores: Mario Fernández-Fernández, Pablo Rodríguez-González, M. Elena Añón Álvarez, Félix Rodríguez, Francisco V. Álvarez, J. Ignacio García Alonso

analytical
chemistry

Article
pubs.acs.org/analyticalchemistry

Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

Mario Fernández-Fernández,¹ Pablo Rodríguez-González,^{*,3} M. Elena Añón Álvarez,² Félix Rodríguez,³ Francisco V. Álvarez Menéndez,² and J. Ignacio García Alonso²

¹Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

²Clinical Biochemistry Service, Central University Hospital of Asturias, 33011 Oviedo, Spain

³Department of Organic and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: This work describes the first multiple spike isotope dilution procedure for organic compounds using ¹³C labeling. A double-spike isotope dilution method capable of correcting and quantifying the creatine–creatinine interconversion occurring during the analytical determination of both compounds in human serum is presented. The determination of serum creatinine may be affected by the interconversion between creatine and creatinine during sample preparation or by inefficient chemical separation of those compounds by solid phase extraction (SPE). The methodology is based on the use of differently labeled ¹³C analogues (¹³C₁-creatinine and ¹³C₂-creatinine), the measurement of the isotopic distribution of creatine and creatinine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and the application of multiple linear regression. Five different lyophilized serum-based controls and two certified human serum reference materials (ERM-DA252a and ERM-DA253a) were analyzed to evaluate the accuracy and precision of the proposed double-spike LC-MS/MS method. The methodology was applied to study the creatine–creatinine interconversion during LC-MS/MS and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis and the separation efficiency of the SPE step required in the traditional gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry (GC-IDMS) reference methods employed for the determination of serum creatinine. The analysis of real serum samples by GC-MS showed that creatine–creatinine separation by SPE can be a nonquantitative step that may induce creatinine overestimations up to 28% in samples containing high amounts of creatine. Also, a detectable conversion of creatine into creatinine was observed during sample preparation for LC-MS/MS. The developed double-spike LC-MS/MS improves the current state of the art for the determination of creatinine in human serum by isotope dilution mass spectrometry (IDMS), because corrections are made for all the possible errors derived from the sample preparation step.



Because of the increasing incidence of diabetes and hypertension, chronic kidney disease (CKD) is a worldwide health problem affecting 5%–10% of the world population.¹ Without diagnosis and treatment, CKD progresses to an end-stage renal failure that demands expensive treatments such as hemodialysis and renal transplantation.² With an early and accurate diagnosis of kidney dysfunction, a great amount of healthcare money can be saved. Diagnosis of CKD is based on the glomerular filtration rate, which is calculated using the serum creatinine concentration.³ The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out using alkaline phosphate methods such as the Jaffe method, which is based on the colorimetric determination of the derivative obtained after the reaction of creatinine with picric acid in an alkaline medium.⁴ The main limitation of this method is the

well-documented interference by other chromogens such as bilirubin, proteins, or ketones.⁵ Alternative enzyme methodologies are enzymatic assays mostly based on a series of sequential enzyme-mediated steps that result in the formation of hydrogen peroxide.⁶ Enzymatic assays are still not widely acceptable, because of cost constraints, but are routinely used for the determination of serum creatinine.⁷

The influence of interfering substances is still a problem for both Jaffe and enzymatic approaches.⁸ Thus, reliable methods ensuring accurate and precise creatinine determinations in every type of serum sample are still required.⁹ In clinical

Received: November 12, 2014

Accepted: March 7, 2015

Published: March 9, 2015

ACS Publications | © 2015 American Chemical Society

3755

DOI: 10.1021/acs.analyticalchemistry.5b01769
Anal. Chem. 2015, 87, 3755–3763

D.2.1. Introducción

La reacción reversible creatina-creatinina, es uno de los numerosos mecanismos existentes en el cuerpo humano cuya función es proporcionar y regenerar energía para que el cuerpo funcione correctamente.

Esta reacción forma parte de un sistema que sirve como almacenamiento de energía y juega un papel esencial como indicador renal. Es por ello, que desde principios del siglo XX, el estudio de esta reacción ha despertado una gran expectación entre la comunidad científica tanto desde el punto de vista biológico como químico debido a su simple apariencia e importancia biológica¹⁶⁶.

El equilibrio de esta reacción es dependiente tanto del pH como de la temperatura, aunque existen estudios realizados añadiendo creatina marcada en ¹⁵N en ratas¹⁶⁹ en las que se demostró que la conversión de creatina en creatinina es un proceso irreversible.

En todos los métodos existentes para la determinación de creatinina, tanto en el análisis de rutina como los métodos de referencia basados en ID-MS nunca se ha evaluado la posible desviación de los resultados debido a una posible interconversión creatina-creatinina durante el proceso de tratamiento de muestra. Esta posibilidad ya fue puesta de manifiesto en diferentes ejercicios de intercomparación entre laboratorios de referencia (IFCC RELA Ring Trials) como Institutos de Metrología (CCQM comparison) en los cuales se pone de manifiesto que existe una fuente de error no controlada, la cual puede ser debida a la posible interconversión creatina-creatinina. Más concretamente, en el ejercicio de intercomparación CCQM-K12 para creatinina se reportó que sin el tratamiento adecuado una conversión creatina-creatinina puede tener lugar¹⁷¹. Y además, en el CCQM-K12.1 uno de los participantes reportó problemas de reproducibilidad debido a una posible interconversión entre creatina y creatinina.

Por lo tanto surge la necesidad de evaluar dicha interconversión con el objetivo de asegurar la determinación exacta y precisa de creatinina. En este sentido, el uso de trazadores isotópicos múltiples en combinación con la dilución isotópica y la espectrometría de masas (ID-MS)¹⁷³ ha sido utilizado en el análisis elemental para la corrección de la interconversión entre diferentes especies del mismo elemento.

Esta estrategia ha sido aplicada con gran éxito al análisis de especiación utilizando marcaje en el heteroátomo y técnicas cromatográficas (HPLC o GC) acopladas a ICP-MS. Así, se han desarrollado diferentes métodos basados en trazadores isotópicos

múltiples para el análisis de Cr (III) y Cr (VI)⁷², Hg (II) y metil-mercurio⁶³ y compuestos butilados de estaño⁶⁷, entre otros.

El uso por primera vez de trazadores isotópicos enriquecidos en ¹³C para determinar las posibles interconversiones en compuestos orgánicos se muestran en este capítulo utilizando trazadores mínimamente marcados (¹³C₁-Creatinina y ¹³C₂-Creatina) y LC-MS-MS. Esta metodología a su vez se combinará con la metodología desarrollada en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral con la finalidad de estudiar las posibles interconversiones durante el tratamiento de muestra, especialmente durante la etapa de separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) que se requiere en los métodos basados en GC-IDMS.

D.2.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo de Tesis fue el desarrollo de una metodología para la determinación de las posibles interconversiones creatina-creatinina mediante el uso de trazadores isotópicos mínimamente marcados en ¹³C (¹³C₁-Creatinina y ¹³C₂-Creatina) y HPLC-ESI-MS/MS. Este objetivo principal se abordó a partir de los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización del procedimiento de tratamiento de muestra en muestras de suero humano para su análisis por HPCL-ESI-MS/MS.
2. Aplicación de un nuevo modo de adquisición basado en la determinación de las distribuciones isotópicas de los iones fragmento mediante HPLC-ESI-MS/MS.
3. Caracterización de los trazadores isotópicos (¹³C₁-Creatinina y ¹³C₂-Creatina) en concentración y abundancia isotópica mediante HPLC-ESI-MS/MS.
4. Desarrollo del procedimiento matemático para la determinación de las posibles interconversiones creatina-creatinina mediante el uso de trazadores isotópicos múltiples marcados en ¹³C y regresión lineal múltiple.
5. Validación de la metodología desarrollada mediante el análisis de tres sueros control liofilizados (Precinorm, Precipath, Calibrator CREJ2) y dos materiales de referencia de suero humano congelado certificados en creatinina (ERM-DA252a y ERM-DA253a).

6. Estudio de las posibles interconversiones creatina-creatinina durante el procedimiento de separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizado en la mayoría de los métodos basados en GC-IDMS.

7. Evaluación de las posibles desviaciones en la determinación de creatinina mediante GC-IDMS originadas de la separación no cuantitativa de creatina y creatinina mediante SPE.

D.2.3. Artículo Científico II**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE IN HUMAN SERUM BY DOUBLE-SPIKE ISOTOPE DILUTION LC-MS/MS AND GC-MS**

Mario Fernández Fernández^a, Pablo Rodríguez-González*^a, M. Elena Añón Álvarez^b, Felix Rodríguez^c, Francisco V. Álvarez Menéndez^b, J. Ignacio García Alonso^a.

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

^b*Clinical Biochemistry Service of the Central University Hospital of Asturias.*

^c*Department of Organic and Inorganic Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo.*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

This work describes the first multiple spiking isotope dilution procedure for organic compounds using ¹³C labeling. A double-spiking isotope dilution method capable of correcting and quantifying the creatine-creatinine interconversion occurring during the analytical determination of both compounds in human serum is presented. The determination of serum creatinine may be affected by the interconversion between creatine and creatinine during sample preparation or by inefficient chemical separation of those compounds by solid phase extraction (SPE). The methodology is based on the use differently labeled ¹³C analogues (¹³C₁-Creatinine and ¹³C₂-Creatine), the measurement of the isotopic distribution of creatine and creatinine by LC-MS/MS and the application of multiple linear regression. Five different lyophilized serum based controls and two certified human serum reference materials (ERM-DA252a and ERM-

DA253a) were analyzed to evaluate the accuracy and precision of the proposed double-spike LC-MS/MS method. The methodology was applied to study the creatine-creatinine interconversion during LC-MS/MS and GC-MS analyses and the separation efficiency of the SPE step required in the traditional GC-IDMS reference methods employed for the determination of serum creatinine. The analysis of real serum samples by GC-MS showed that creatine-creatinine separation by SPE can be a non-quantitative step that may induce creatinine overestimations up to 28% in samples containing high amounts of creatine. Also, a detectable conversion of creatine into creatinine was observed during sample preparation for LC-MS/MS. The developed double-spike LC-MS/MS improves the current state of the art for the determination of creatinine in human serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) as all the possible errors derived from the sample preparation step are corrected for.

INTRODUCTION

Due to the increasing incidence of diabetes and hypertension, chronic kidney diseases (CKD) are a worldwide health problem affecting 5-10% of the world population¹. Without diagnosis and treatment CKD progress to an end-stage renal failure that demands expensive treatments such as hemodialysis and renal transplantation². With an early and accurate diagnosis of kidney dysfunction, a great amount of healthcare money can be saved. Diagnosis of CKD is based on glomerular filtration rate calculated using the serum creatinine concentration³. The determination of serum creatinine in clinical laboratories is routinely carried out using alkaline picrate methods like the Jaffé method based on the colorimetric determination of the derivative obtained after the reaction of creatinine with picric acid in an alkaline medium⁴. The main limitation of this method is the well-documented interference by other chromogens such as bilirubin, proteins or

ketones⁵. Alternative routine methodologies are enzymatic assays mostly based on a series of sequential enzyme-mediated steps which result in the formation of hydrogen peroxide⁶. Enzymatic assays are still not widely acceptable due to cost constraints but are routinely used for the determination of serum creatinine⁷.

The influence of interfering substances is still a problem for both Jaffe and enzymatic approaches⁸. Thus, reliable methods ensuring accurate and precise creatinine determinations in every kind of serum samples are still required⁹. In Clinical Chemistry, and particularly in the determination of serum creatinine, IDMS is employed as a reference procedure to evaluate the accuracy of routine methods, to assign target values for reference serum pools, or to guide the development of new methods¹⁰. Reference procedures based on IDMS for the determination of creatinine can be found in the JCTLM database¹¹ and include both GC-MS¹²⁻¹⁵ and LC-MS methods¹⁶⁻¹⁷. We have recently reported a GC-IDMS method in which a significant decrease of the derivatization time in comparison to reference GC-MS procedures is achieved applying focused microwave radiation during the derivatization step¹⁸.

All the existing procedures reported in the literature for the determination of creatinine have never evaluated potential bias arising from a creatinine-creatine interconversion during sample preparation or by lack of complete chemical separation before GC-MS analysis as both species produce the same compound after derivatization. It should be pointed out that results of inter-laboratory comparisons between different reference laboratories (IFCC RELA Ring trials) and even between national metrology institutes (CCQM comparisons) show that agreement between different reference methods is perfectible but suggest that at least one unknown source of bias is not controlled. Creatine-creatinine inter-conversion is a very likely possibility that could explain why discrepancies are observed with some samples and not others. For example in the key

comparison CCQM-K12 it was reported that without proper handling, creatine and creatinine can interconvert leading to biased results¹⁹. Also during CCQM-K12.1 one of the participants reported reproducibility problems arising from a cross conversion between creatine and creatinine²⁰. The creatine-creatinine reversible reaction has been intensely studied from both biological and chemical perspectives since the beginning of the 20th century²¹. The equilibrium of the reversible and non-enzymatic cyclation of creatine to creatinine is both pH and temperature dependent. Creatine is favored at high pH and low temperature, whereas creatinine is favored at elevated temperatures and in acidic solutions^{22,23}. The administration of ¹⁵N-labeled creatine to rats showed that the conversion of creatine into creatinine in vivo is an irreversible process and that creatine is the only precursor of creatinine²⁴.

So far, correction of analytes interconversion during their determination has been only carried out for different species of the same element by means of multiple spiking IDMS²⁵. This requires the addition to the sample at the beginning of the sample preparation of all interconverting analyte species each one labelled in a different isotope of the element. Multiple spiking approaches have been applied thus far to the field of speciation analysis mostly by using heteroatom-labelling and chromatographic techniques coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). Using this strategy multiple spiking methods have been developed for the determination of Cr(III) and Cr(VI)²⁶, Hg(II) and methyl mercury²⁷, butyltin compounds²⁸ and nitrate and nitrite²⁹.

We present here the first multiple spiking IDMS methodology capable of determining organic compounds while correcting potential analyte interconversions. As a proof of concept, we have developed both GC-MS and LC-MS/MS methodologies to correct for the possible creatine-creatinine interconversion occurring during sample preparation.

For this purpose we use compound-specific minimally ^{13}C labelled analogues ($^{13}\text{C}_1$ -Creatinine and $^{13}\text{C}_2$ -Creatine) to minimize the occurrence of isotope effects during sample preparation and to properly correct for matrix effects during ESI ionization or chemical derivatization. The developed methodologies are combined to study potential biases arising from the creatine-creatinine interconversion during sample preparation, especially during the SPE separation of both compounds as applied in the GC-IDMS reference methods employed for creatinine determination^{12-15,18}. Providing that isotope equilibration between analytes and labelled analogues is achieved, the LC-MS/MS method developed in this work corrects for all sources of error and could be eventually evaluated as a new candidate reference method in the future.

EXPERIMENTAL

Reagents and materials section and Instrumentation section can be found in the Supporting Information section

Procedures

Analysis of serum samples by LC-MS/MS. An approximate amount of 2 μg of $^{13}\text{C}_1$ -creatinine and 2 μg of $^{13}\text{C}_2$ -creatine was added to 0.2 g of serum sample into a 1.5 ml Eppendorf tube. This was usually carried out by adding 0.2 g of ca. 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ solutions of each labelled compound. When analyzing a calibrator, 5 mL of milli-Q water were added and the vial was mechanically shaken during 30 minutes for reconstitution prior the addition of the labelled tracers. The amounts of sample and labeled standards were controlled gravimetrically with an analytical balance. Then, the mixture was manually shaken for 1 minute for complete homogenization and 0.4 g of methanol was added for protein precipitation. After vortex mixing, the solution was centrifuged at 13000 rpm

for 10 minutes. The supernatant was transferred to a glass vial and evaporated to dryness using a gentle stream of nitrogen. Then, the sample was reconstituted with mobile phase and filtered through a polyvinylidene fluoride syringe filter (13 mm diameter, 0.22 μm pore size) before injection into the LC-MS/MS system. The chromatographic separation of creatine and creatinine was carried out using a Zorbax 300-SCX column (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) supplied by Agilent Technologies.. LC-MS/MS analyses were performed in a gradient elution mode using an aqueous mobile phase A (0.1 % formic acid and 20 % methanol in water) at pH=2.77 and mobile phase B (0.1 % formic acid, 20% methanol and 10mM ammonium acetate in water) at pH=3.74. The temperature of both mobile phases was 24°C. The gradient began at 0% B, for 10 min and then the mobile phase composition was linearly increased to 50% B in 1 min and remained constant for 5 min. Then the original composition of 0% B was achieved in 1 min, and kept constant for 13 min for column equilibration. The flow rate was set at 0.7 mL/min, and the injection volume was 10 μL . The total run time was 30 minutes. LC-MS/MS analysis was performed by using positive ion electrospray ionization in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The ion spray voltage was set at -3500V. Drying gas temperature was maintained at 300°C. The flow rate of drying gas was set at 5 L/min and the nebulizer pressure was set at 45 psi. SRM was performed after adjusting the resolution of the first quadrupole as described elsewhere³⁰. Briefly, the mass resolution of the first quadrupole is modified to 10 u Full Width at Half Maximum (FWHM) while that of the second quadrupole is kept at 0.7 u. In this way we can accurately measure the real isotopic distribution of in-cell molecular fragments with a small number of SRM transitions as described in a previous publication³⁰. The protonated molecular ion $[\text{M}+\text{H}^+]$ was selected as precursor ion for both compounds. The acquired SRM transitions for creatine were 132 \rightarrow 90,

132→91, 132→92, 132→93 and for creatinine the SRM transitions were 114→86, 114→87, 114→88, 114→89. The fragmentor and collision energy was set at 100 V and 5 V for creatinine and at 94 V and 10 V for creatine.

Sample preparation for GC-MS analyses of serum samples. GC-MS analyses of the samples were carried out here only to evaluate and quantify the efficiency of the SPE procedure. Sample preparation for GC-MS analysis of serum samples has been explained previously¹⁸. Similar amounts of sample and labelled analogues than those reported for LC-MS/MS analyses were employed. After 1 minute of homogenization by manual shaking, the separation of creatine and creatinine by SPE using weak cation exchange cartridges was carried out in different steps: i) activation with 2 ml of MeOH (pH~2.60) and 2 mL of Milli-Q water (pH~5.10), ii) conditioning with 3 ml of 1 M ammonium hydroxide (pH~11.14), 5 ml of Milli-Q water (pH~5.10), 3 ml of 1M hydrochloric acid (pH~0.48) and 5 ml of Milli-Q water (pH~5.10), iii) application of the sample to the cartridge, iv) wash with 3mL of Milli-Q water (pH~5.10) to elute creatine and v) elution of creatinine with 1 mL of 1 M ammonium hydroxide (pH~11.14). Both creatine and creatinine fractions eluted from the SPE cartridge were derivatized with acetylacetone as described in a previous work¹⁸ and in the Supporting Information.

Calculations

Double-spike IDMS using ¹³C-labelled compounds and LC-MS/MS. As in any isotope dilution methodology, a complete mixing or complete isotope equilibration must be achieved between the analytes and the the labelled analogues before any interconversion reaction takes place. Once the isotope equilibration is achieved, then the proposed double spiking methodology will be able to correct for any interconversion occurring

during the sample preparation procedure. It should be also stressed that potential interconversion occurring before the addition of the labelled analogues, for example during thawing of frozen serum samples or calibrators reconstitution will not be corrected. The mathematical procedure explained below follows that described previously for the correction of interconversion reactions in trace element speciation²⁵ and has been adapted to multiple labelling with ¹³C after the LC separation of creatinine and creatine. The sample (s), containing natural abundance creatine and creatinine, is spiked with a known amount of ¹³C₁-creatinine (tracer 1, t1) and ¹³C₂-creatine (tracer 2, t2). Ideally, isotopically labelled creatinine spikes should not contain creatine and viceversa. However, our model takes into account such possible contributions as described in the amount balances for the number of moles (N) of creatine (cr) and creatinine (cn) in the mixture (m) of sample and labelled compounds:

$$N_m^{cr} = N_s^{cr} + N_{t1}^{cr} + N_{t2}^{cr} \quad (1)$$

$$N_m^{cn} = N_s^{cn} + N_{t1}^{cn} + N_{t2}^{cn} \quad (2)$$

For creatinine the contribution of N_{t2}^{cn} should be very small as it arises from possible ¹³C₂-creatinine impurities in the labelled ¹³C₂-creatine standard. Similarly, the contribution of N_{t1}^{cr} should be also small (¹³C₁-creatine impurities in the ¹³C₁-creatinine tracer solution). Before the addition of the isotopically enriched compounds to the sample, the values of N_{t1}^{cr} , N_{t1}^{cn} , N_{t2}^{cr} and N_{t2}^{cn} must be known either by an experimental determination or from the certificate of analysis provided by the manufacturer. Additionally, the isotopic composition of the pure tracers must be also known.

After tracer addition and homogenization with the sample a fraction of creatine may convert into creatinine, or viceversa, during any of the stages of sample preparation. If we assume that isotope equilibration takes place before the occurrence of any

interconversion reaction we can establish new amount balance equations, (3) and (4), in which F1 refers to the fraction of creatine transformed into creatinine and F2 to the fraction of creatinine transformed into creatine:

$$N_m^{cr} = (N_s^{cr} + N_{t1}^{cr} + N_{t2}^{cr}) \times (1 - F1) + (N_s^{cn} + N_{t1}^{cn} + N_{t2}^{cn}) \times F2 \quad (3)$$

$$N_m^{cn} = (N_s^{cn} + N_{t1}^{cn} + N_{t2}^{cn}) \times (1 - F2) + (N_s^{cr} + N_{t1}^{cr} + N_{t2}^{cr}) \times F1 \quad (4)$$

These amount balance equations can be transformed into molar fractions (x) for each isotopic form ($x_s = N_s/N_m$, $x_{t1} = N_{t1}/N_m$ and $x_{t2} = N_{t2}/N_m$) using partial amount balances taken from equations (3) and (4), leading to equations (5), (6) and (7) for creatine and (8), (9) and 10 for creatinine:

$$x_s^{cr} = \frac{N_s^{cr}(1 - F1) + N_s^{cn}F2}{N_m^{cr}} \quad (5)$$

$$x_{t1}^{cr} = \frac{N_{t1}^{cr}(1 - F1) + N_{t1}^{cn}F2}{N_m^{cr}} \quad (6)$$

$$x_{t2}^{cr} = \frac{N_{t2}^{cr}(1 - F1) + N_{t2}^{cn}F2}{N_m^{cr}} \quad (7)$$

$$x_s^{cn} = \frac{N_s^{cn}(1 - F2) + N_s^{cr}F1}{N_m^{cn}} \quad (8)$$

$$x_{t1}^{cn} = \frac{N_{t1}^{cn}(1 - F2) + N_{t1}^{cr}F1}{N_m^{cn}} \quad (9)$$

$$x_{t2}^{cn} = \frac{N_{t2}^{cn}(1 - F2) + N_{t2}^{cr}F1}{N_m^{cn}} \quad (10)$$

The isotopic composition measured for each compound can be expressed as a function of three isotopic patterns: the natural abundance pattern, the isotopic pattern of the $^{13}\text{C}_2$ tracer (t2) and the isotopic pattern of $^{13}\text{C}_1$ tracer (t1). In this way we can establish the overdetermined systems of equations (11) and (12) for creatine and creatinine, respectively. Applying multiple linear regression, six molar fractions can be obtained

and employed to solve equations (5) to (10)

$$\begin{bmatrix} A_{m,cr}^1 \\ A_{m,cr}^2 \\ A_{m,cr}^3 \\ \dots \\ A_{m,cr}^{n-1} \\ A_{m,cr}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{s,cr}^1 & A_{t1,cr}^1 & A_{t2,cr}^1 \\ A_{s,cr}^2 & A_{t1,cr}^2 & A_{t2,cr}^2 \\ A_{s,cr}^3 & A_{t1,cr}^3 & A_{t2,cr}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{s,cr}^{n-1} & A_{t1,cr}^{n-1} & A_{t2,cr}^{n-1} \\ A_{s,cr}^n & A_{t1,cr}^n & A_{t2,cr}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^{cr} \\ x_{t1}^{cr} \\ x_{t2}^{cr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (11)$$

$$\begin{bmatrix} A_{m,cn}^1 \\ A_{m,cn}^2 \\ A_{m,cn}^3 \\ \dots \\ A_{m,cn}^{n-1} \\ A_{m,cn}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{s,cn}^1 & A_{t1,cn}^1 & A_{t2,cn}^1 \\ A_{s,cn}^2 & A_{t1,cn}^2 & A_{t2,cn}^2 \\ A_{s,cn}^3 & A_{t1,cn}^3 & A_{t2,cn}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{s,cn}^{n-1} & A_{t1,cn}^{n-1} & A_{t2,cn}^{n-1} \\ A_{s,cn}^n & A_{t1,cn}^n & A_{t2,cn}^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s^{cn} \\ x_{t1}^{cn} \\ x_{t2}^{cn} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (12)$$

Where $A_{s,i}^i$, $A_{t1,i}^i$ and $A_{t2,i}^i$ are the theoretical isotope distributions for each compounds at the n measured masses. The isotopic distributions of in-cell molecular fragments, $A_{m,i}^i$, were measured at $n=4$ different masses using the transitions $132 \rightarrow 90$, $132 \rightarrow 91$, $132 \rightarrow 92$, $132 \rightarrow 93$ for creatine and $114 \rightarrow 86$, $114 \rightarrow 87$, $114 \rightarrow 88$, $114 \rightarrow 89$ for creatinine. This was performed by peak area integration of the corresponding chromatographic peak and dividing each peak area by the sum of all peak areas measured for the 4 SRM transitions. More details on the measurement procedure are given in the previous section and elsewhere³⁰. The solutions to equation (11) are the creatine molar fractions x_s^{cr} , x_{t1}^{cr} and x_{t2}^{cr} whereas the solutions to equation (12) are the creatinine molar fractions x_s^{cn} , x_{t1}^{cn} and x_{t2}^{cn} . Once the molar fractions are computed, the interconversion factors F1 and F2 can be calculated by dividing equations (6) and (7) for creatine and equations (9) and (10) for creatinine. In this way, we end up with equations (13) and (14) where the only unknowns are F1 and F2:

$$F1(x_{t2}^{cr} N_{t1}^{cr} - x_{t1}^{cr} N_{t2}^{cr}) + F2(x_{t1}^{cr} N_{t2}^{cn} - x_{t2}^{cr} N_{t1}^{cn}) = (x_{t2}^{cr} N_{t1}^{cr} - x_{t1}^{cr} N_{t2}^{cr}) \quad (13)$$

$$F1(x_{t2}^{cn} N_{t1}^{cr} - x_{t1}^{cn} N_{t2}^{cr}) + F2(x_{t1}^{cn} N_{t2}^{cn} - x_{t2}^{cn} N_{t1}^{cn}) = (x_{t1}^{cn} N_{t2}^{cn} - x_{t2}^{cn} N_{t1}^{cn}) \quad (14)$$

Note that these equations will simplify further when the tracers employed are pure as $N_{t1}^{cn} = 0$ and $N_{t2}^{cr} = 0$. Once F1 and F2 are calculated, the original creatine and creatinine amounts in the sample, N_s^{cr} and N_s^{cn} , corrected for the possible interconversion occurring during sample preparation and measurement can be calculated from the ratios of eqs (5) and (7) for creatine, and (8) and (9) for creatinine. The final equations (15) and (16) reduce to conventional IDMS equations when the interconversion factors F1 and F2 are 0.

$$N_s^{cr}(1-F1) + N_s^{cn}F2 = \frac{X_s^{cr}}{X_{t2}^{cr}} \times [N_{t2}^{cr}(1-F1) + N_{t2}^{cn}F2] \quad (15)$$

$$N_s^{cr}F1 + N_s^{cn}(1-F2) = \frac{X_s^{cn}}{X_{t1}^{cn}} \times [N_{t1}^{cn}(1-F2) + N_{t1}^{cr}F1] \quad (16)$$

Double-spike IDMS using ^{13}C -labelled compounds and GC-MS. Experiments were also performed by double-spike GC-MS. After derivatization, both creatine and creatinine produce the same compound, therefore only one isotope pattern could be calculated by GC-MS. So, to employ the double-spike procedure in GC-MS we required two injections per sample. The first injection corresponded to the creatine fraction, as it eluted from the SPE cartridge, and the second injection corresponded to the creatinine fraction. This strategy allows the study of the creatine-creatinine separation efficiency as F1 and F2 will reflect the presence of creatine in the creatinine fraction and viceversa. To confirm the GC-MS results, the same fractions eluting from the SPE cartridge were injected in the LC-MS/MS instrument and equations (13) to (16) applied. For comparison, conventional IDMS equations were also employed for the quantification of creatinine and creatine in the SPE fractions by GC-MS.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the creatine and creatinine tracers by LC-MS/MS

Both tracers were first characterized in terms of isotope composition and concentration. For the isotope composition an aliquot of each compound at natural abundance was injected in quintuplicate in the LC-MS/MS system using the acquisition parameters given in the procedures. The measured isotope compositions were in perfect agreement with those theoretically calculated²⁵ ruling out the presence of spectral errors in the LC-MS/MS instrument. Then, the labelled tracers were injected in quintuplicate in the LC-MS/MS system using the same acquisition parameters. The experimental isotope distribution was compared with theoretically derived spectra calculated for different tentative isotope enrichments as described elsewhere³⁰. The best isotope enrichment was that which provided the minimum in the square sum of residuals for the linear regression between the theoretical and experimental spectra. It was observed that the isotopic enrichment for $^{13}\text{C}_1$ -creatinine was $98.9 \pm 0.1\%$ (1s, n=5) while the enrichment was $99.4 \pm 0.1\%$ (1s, n=5) for $^{13}\text{C}_2$ -Creatine. Then, the stock solutions of the tracers were characterized in concentration by reverse IDMS using the natural abundance compounds as standards. It was observed that the $^{13}\text{C}_1$ -creatinine tracer contained about 3% of creatine impurities (98.51 $\mu\text{g/g}$ of creatinine and 3.20 $\mu\text{g/g}$ of creatine) while the $^{13}\text{C}_2$ -creatine tracer contained no detectable creatinine and its concentration was 100.07 $\mu\text{g/g}$.

Development of the double-spike LC-MS/MS methodology.

Figure 1 shows the LC-MS/MS chromatogram of a human serum sample that was spiked with the two enriched tracers. We will use the data from this sample to illustrate the calculation methodology employed. The peak areas measured for the 4 transitions both for creatine and creatinine are given in Table S1 of the Supporting Information.

These peak areas were employed to calculate the relative abundances for each mass and compound. Then, a multiple linear regression was set up to determine the molar fractions for the natural abundance compound and the $^{13}\text{C}_1$ and $^{13}\text{C}_2$ labels respectively. For that purpose we employed the theoretically calculated abundances for both compounds and for the different labeling forms as shown in Table S1. The multiple linear regression was implemented in Microsoft Excel using the function LINEST. The final results are the molar fractions for each isotopic pattern and for each compound are also included in Table S1. The interconversion factors F1 and F2 were calculated from equations (13) and (14) and resulted $F1 = 0.0101$ and $F2 = 0.0123$. That means that ca. 1.0% of creatine was transformed into creatinine and ca. 1.2% of creatinine was transformed into creatine for this particular sample. Finally, the concentrations of creatine and creatinine were calculated from equations (15) and (16). In this case, the final concentrations in the original serum sample were 1.44 mg/dL for creatinine and 3.43 mg/dL for creatine.

Validation of the double spike LC-MS/MS methodology

The inter-assay precision or reproducibility of the LC-MS/MS method was estimated from the analysis of $n=9$ independent replicates of two lyophilized serum based controls certified in creatinine (Precicontrol Clinchem Multi 1 and Precicontrol Clinchem Multi 2) carried out in three different measurement sessions over a period of 18 days. The results obtained are given in Table 1. The obtained inter-assay precision was 3.7% and 3.3% for creatinine and creatine, respectively at a level of 1.1 and 0.3 mg/dL (Precicontrol Clinchem Multi 1) and 3.0% and 3.6% at a level of 3.8 and 3.9 mg/dL (Precicontrol Clinchem Multi 2).. Regarding the interconversion factors, we observed a small conversion of creatine into creatinine of ca. 3% in both samples while the

opposite reaction can be considered negligible. This means that a slight overestimation of creatinine could occur when this interconversion reaction is not taken into account.

In order to gain more information about the interconversion reactions, the accuracy and precision of the proposed LC-MS/MS method was also evaluated by the analysis of three additional lyophilized serum based controls certified in creatinine (Precinorm, Precipath and Calibrator CREJ2) and two certified reference materials (CRMs): ERM-DA252a and ERM-DA253a (frozen human sera). The analyzed materials cover a range of creatinine concentrations from 0.3 to 5 mg/dL. Table 2 shows that the obtained results were in agreement with the certified creatinine concentration for the ERM-DA252a and ERM-DA253a materials and that the RSD values obtained ranged from 0.1 to 0.9 % for creatinine and from 0.6 to 3.5 % for creatine. As reported elsewhere³², the correction of analytes interconversion by multiple-spiking isotope dilution is possible at the expense of the precision of the initial amount estimates. Typically, multiple spiking approaches increase the uncertainty of the analytical results to 2-3% RSD in comparison with single spiking (typically 1-2% RSD). The factor F1 varied between 2.5 and 3.3% depending on the sample while factor F2 can be considered negligible in all cases. The small conversion of creatine into creatinine observed during LC-MS/MS analysis could be attributed to the final reconstitution of the sample with mobile phase, as it is the only sample preparation step in which the sample pH changes.

Study of creatine-creatinine interconversion during GC-MS analysis

General Strategy for the analysis of real human serum samples. A flow chart describing the protocol followed is given in Figure 2. Both $^{13}\text{C}_2$ -creatinine and $^{13}\text{C}_1$ -creatinine were added to a human serum sample, and the mixture was manually shaken for 1 minute for complete homogenization. Then, the mixture was divided into two different aliquots (A

and B). Aliquot A was treated following the LC-MS/MS sample preparation procedure explained above and Aliquot B was treated following the weak cation exchange SPE separation explained in the experimental section. After SPE the creatine fraction B1 and creatinine fraction B2 were further divided in two aliquots. Aliquots B1.1 and B2.1 were evaporated to dryness, reconstituted with mobile phase and injected into the LC-MS/MS. Aliquots B1.2 and B2.2 were derivatized with acetylacetone, extracted into hexane and injected in the GC-MS system. According to this strategy Aliquot A provides the concentration of creatine and creatinine in the sample as well as the interconversion extent occurring during sample preparation for LC-MS/MS analysis. Aliquots B1.1 and B2.1 analyzed by LC-MS/MS provide information on the additional interconversion occurring during the SPE step. Finally, the GC-MS aliquots B1.2 and B2.2 yield the same product after derivatization with acetylacetone. Therefore, both fractions were independently analyzed but both experimental isotopic patterns were employed in the same double spike calculation to obtain information on the creatine-creatinine separation efficiency of the SPE step as indicated in the procedures. Finally, the GC-MS data was also treated using the traditional IDMS procedure to detect potential creatinine overestimations.

Analysis of serum samples. The existing reference procedures for the determination of creatinine by GC-MS requires the isolation of creatinine from creatine by SPE or HPLC prior derivatization as both compounds lead to the same derivative under all reported derivatization protocols^{12-15,18}. An incomplete separation of both compounds may lead to overestimations of creatinine in real samples. Six anonymized human serum samples provided by the Central University Hospital of Asturias were analyzed following the strategy shown in Figure 2. Table 3 shows the results obtained in the different aliquots

analyzed for each sample by LC-MS/MS and GC-MS. As explained above, Aliquot A provides the concentration values and interconversion factors obtained by the double spike LC-MS/MS method. In this case, the conversion of creatine into creatinine (F1) varied between 1 and 9% depending on the sample (Table 3). No conversion of creatinine into creatine was detected. In contrast to the results obtained in lyophilized serum based controls and CRMs of Table 2, the results on real samples demonstrate that the creatine into creatinine conversion is matrix dependent. On the other hand, the level of precision for creatinine determination was comparable to that obtained in those previously analyzed materials (from 0.5 to 1.6 % RSD).

Aliquots B1.1 and B2.1 were analyzed by LC-MS/MS to provide the concentration of creatine and creatinine, respectively in the eluted fractions after the SPE step. For most of the samples, no creatinine peak was detected in aliquot B1.1 and the same can be said for creatine in aliquot B2.1. In those cases the interconversion factors had to be considered negligible and the conventional IDMS calculation was employed²⁵. Only sample 1 in aliquot B2.1 showed detectable amounts of creatine. In this sample, the double spike calculations provided the same concentrations and interconversion factors that were obtained in aliquot A demonstrating the absence of extra interconversion during the creatinine-creatine separation using the SPE procedure.

Finally, the efficiency of the off-line separation of creatinine and creatine by SPE was evaluated by GC-MS. For this purpose, aliquots B1.2 and B2.2 were injected sequentially in the GC-MS system and the results treated either as a double spike procedure or as conventional IDMS. As reported before, the derivatization procedure for creatine and creatinine yields the same product. However, the double spike method can be applied by combining both analyses in the same calculation. Thus, the obtained factors would reflect the separation efficiency of the SPE procedure as the extent of

interconversion has been calculated with the previous LC-MS/MS results. Non-quantitative separation of creatine and creatinine during SPE was obtained in Samples 1, 2 and 4, as 22%, 33% and 7.5% of creatine was found in the creatinine fraction. Therefore, as shown in Table 3, the application of conventional IDMS produces a creatinine overestimation, particularly for sample 1 in which the creatine concentration is as high as that for creatinine. In samples 2 and 4 the impact of such overestimation is lower. When comparing the creatinine values obtained for these samples by double spike LC-MSMS and conventional GC-IDMS creatinine overestimations of 28% and 9% were obtained for samples 1 and 2 whereas no overestimation was obtained in sample 4, in spite of a F1 value of 7.5% obtained by double spike GC-IDMS. On the other hand, a creatinine overestimation of 10% was obtained in sample 3 in spite of the low F1 value obtained (2.3%). This can be explained by the high creatine concentration (3.44 mg/dL) in this sample compared to creatinine (1.44 mg/dL). Thus, when the SPE separation is non-quantitative, the creatinine overestimation by conventional GC-IDMS procedures will depend not only on the separation efficiency but also on the creatine concentration in the sample.

CONCLUSIONS

This work demonstrates that ^{13}C labeled compounds can be employed in multiple spiking IDMS procedures for organic compounds. The double spike LC-MS/MS procedure developed here is capable of determining accurate and precise creatine and creatinine concentrations while correcting potential interconversions occurring during the analytical procedure. We have observed a small but systematic conversion of creatine into creatinine during sample preparation for LC-MS/MS which can be attributed to the sample reconstitution in the mobile phase and may eventually need to

be taken into account for high accuracy work. In most of the analyzed samples this interconversion reaction had no influence in the final concentration measured for creatinine as, the creatine concentration was very small. However, when the concentration of creatine was at the same level as that of creatinine (serum sample 1) or even higher (serum sample 3) significant bias in the creatinine determination can occur. As the concentration of creatine is not measured in human serum samples in a routine basis, there is no way to discriminate between “safe” and “potentially problematic” serum samples. So, the method described in this paper could be considered as an improved method for creatinine determination as it enables the correction of all errors involved in the sample preparation procedure. Combining LC-MS/MS and GC-MS analysis we have evaluated potential biases arising from the creatine-creatinine lack of separation during the SPE procedure applied in previous GC-IDMS methods^{12-15,18}. The results obtained in real samples show that the creatine-creatinine separation by SPE needs to be optimized very carefully as it can promote a significant overestimation of the creatinine concentration in real samples with high creatine content. Finally, it should be stressed that the specificity of the LC-MS/MS method can be evaluated using the square sum of residuals (SSR) of the multiple linear regression applied in each sample. Spectral interferences can be detected by examining the residuals in Eqs. (11) and (12) and its distribution over the masses measured. In a previous work³⁰ we observed that SSR values lower than 10^{-4} indicated a good agreement between experimental abundances and the theoretical abundances. In all samples analyzed here, the SSR values obtained for creatine and creatinine were lower than 10^{-4} demonstrating the absence of spectral interferences.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Projects Ref. CTQ2009-12814 and Ref. CTQ2012-36711, co-funded by FEDER. The EU is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS and LC-MS/MS instruments. MFF acknowledges Gobierno del Principado de Asturias through Ficyt (Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología) for the provision of a predoctoral grant in the frame of the Severo Ochoa Program (BP11-162). PRG acknowledges his research contract RYC-2010-06644 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal Program.

Supporting Information Available: This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>

REFERENCES

- (1) National Kidney Disease Education Program. Available at: www.nkdep.nih.gov. [Accessed: 16 April 2013].
- (2) Fountain, K.J.; Kloss, A.; Garibyan, I.; Blitshteyn, B.; Brezzani, A.; Kyostio-Moore, S.; Zuk A.; Sacchiero, R.; Cohen, A.S.. *J. Chromatogr. B* **2007**, *846*, 245-251.
- (3) Ceriotti, F.; Boyd, J.C.; Klein, G.; Henry, J.; Queraltó, J.; Kairisto, V.; Panteghini, M.; and on behalf of the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL). *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 559–566.
- (4) Delanghe, J.R.; Speckaert, M. *NDT Plus* **2011**, *4*, 83-86.
- (5) Srisawasdi, P.; Chaichanajarekul, U, Teerakanjana, N, Vanavanan, S, Kroll, MH. . *J. Clin. Lab. Anal.* **2010**, *24*:123–133.
- (6) Fossati, P.; Prencipe, L.; Berti, G. *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1494–1496.

- (7) Panteghini, M. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, *46*, 567–572.
- (8) Greenberg, N.; Roberts, W.L.; Bachmann, L.M.; Wright, E.C.; Dalton, R.N.; Zakowski, J.J.; Miller, W.G. *Clin. Chem.* **2012**, *58*, 391–401.
- (9) Myers, G.L., Miller, W.G., Coresh, J.; Fleming, J.; Greenberg, N.; Greene, T.; Hostetter, T.; Levey, A.S.; Panteghini, M.; Welch, M.; Eckfeldt, J.H.; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 5–18.
- (10) Camara, J.; Lippa, K.A.; Duewer, D.L.; Gasca-Aragon, H.; Toman, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 527–535.
- (11) Bureau International des Poids et Mesures. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>. [Accessed October 15th 2014].
- (12) Björkhem, I.; Blomstrand, R.; Öhman, G. *Clin. Chem.* **1977**, *23*, 2114–2121.
- (13) Siekmann, L. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1985**, *23*, 137–144.
- (14) Welch, M.J.; Cohen, A.; Hertz, H.S.; Kwokei J.Ng.; Schaffer, R.; Van Der Lijn, P.; White V, E. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1681–1865.
- (15) Stöckl, D.; Reinauer, H. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 993–1000.
- (16) Stokes, P.; O'Connor, G. *J Chromatogr B* **2003**, *794*, 125–136.
- (17) Dodder, N.G.; Tai, S.S.C.; Sniegowski, L.T.; Zhang, N.F.; Welch, M.J. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 1694-1699.
- (18) Fernández-Fernández, M.; González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Añón Álvarez, M.E.; Álvarez, F.V.; García Alonso, J.I. *Clin. Chim. Acta* **2014**, *431*, 96–102.
- (19) Welch, M.J.; Phinney, C.P.; Parris, R.M.; May, W.E.; Heo, G.S.; Henrion, A.; O'Conner G.; Schimmel, H. *Metrologia* **2003**, *40*, 08005.
- (20) CCQM-K12.1: Subsequent Key Comparison on the Determination of Creatinine in Serum Final Report September 2006.

<http://kcdb.bipm.org/AppendixB/appBResults/CCQM-K12/CCQM-K12.1.pdf>

[Accessed February 10th 2015].

- (21) Edgar, G.; Wakefield, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1923**, *45*, 2242-2245.
- (22) Edgar, G.; Wakefield, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 1179-1188.
- (23) Lempert, C. *Chem. Rev.* **1959**, *59*, 667-736.
- (24) Bloch, K.; Schoenheimer, R. *J. Biol. Chem.* **1939**, *131*, 111-119.
- (25) García Alonso, J. I.; Rodríguez-Gonzalez, P. “Isotope Dilution Mass Spectrometry”. Royal Society of Chemistry, **2013**, Cambridge (UK)
- (26) Kingston, H.M.; Huo, D.; Lu, Y.; Chalk, S. *Spectrochim. Acta Part B* **1998**, *53*, 299-309.
- (27) Hintelmann, H.; Evans, R.D. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *358*, 378-385.
- (28) Ruiz Encinar, J.; Rodriguez-Gonzalez, P.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 270–281.
- (29) Pagliano, E.; Meija, J.; Sturgeon, R.; Mester, Z.; D’Ulivo, A. *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 2592–2596.
- (30) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Ohlendorf, R.; Henrion, A.; Delatour, V.; García Alonso, J.I. *Journal of Proteomics* **2015**, *112*, 141-155.
- (31) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 681-691.
- (32) Meija, J.; Ouerdane, L.; Mester, Z. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *394*, 199–205.

FIGURES

Figure 1. LC-MS/MS chromatogram of a human serum sample containing 3.43 mg/dL of creatine and 1.44 mg/dL of creatinine and spiked with 10.2 μg of $^{13}\text{C}_2$ -creatine and 4.5 μg of $^{13}\text{C}_1$ -creatinine. The acquired SRM transitions have been shifted for clarity.

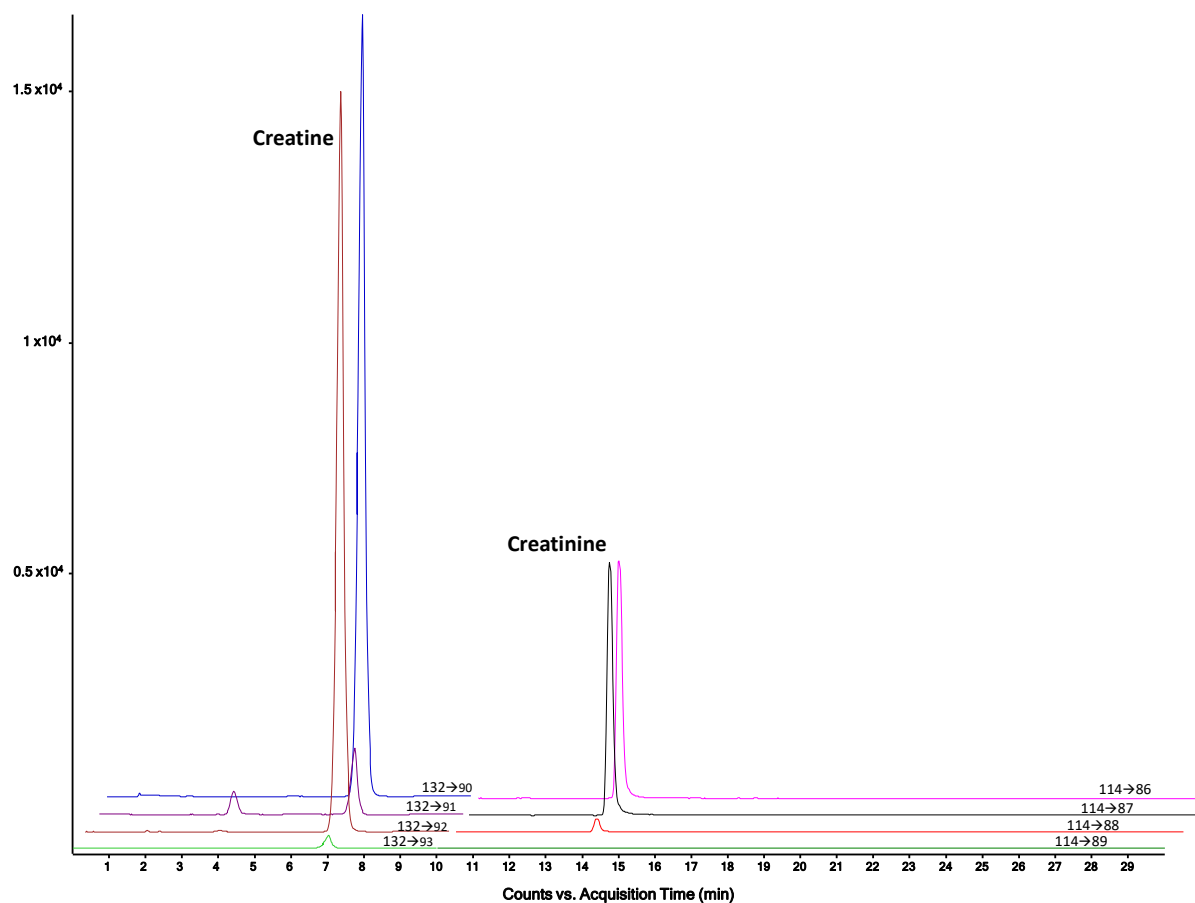
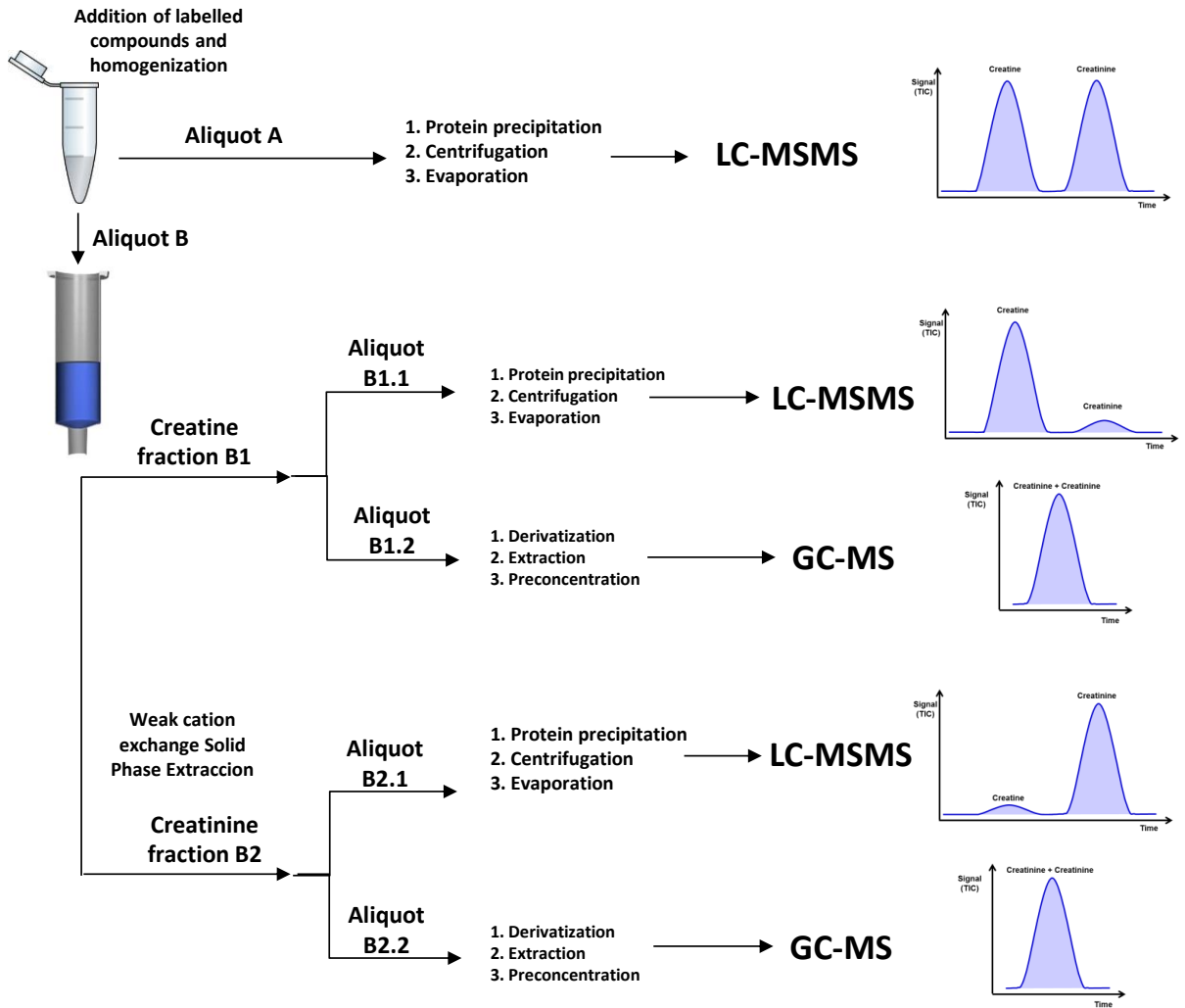


Figure 2. Flow chart describing the followed protocol for the evaluation of the creatine-creatinine interconversion during sample preparation by LC-MS/MS and GC-MS and during the Solid Phase Extraction procedure required for GC-MS procedures.



TABLES

Table 1. Results obtained in the analysis of n=9 independent replicates of two lyophilized serum based controls certified in creatinine (Precicontrol Clinchem Multi 1 and Precicontrol Clinchem Multi 2) carried out in three different measurement sessions over a period of 18 days. Interconversion factors F1 (% creatine to creatinine) and F2 (% creatinine to creatine) are also given. Uncertainty of each replicate is expressed as 1s standard deviation of three independent LC-MS/MS determinations. The uncertainty of the average value is expressed as 1s standard deviation obtained from all replicates.

Precicontrol Clinchem Multi 1	Replicate	Creatinine (mg/dL)	Creatine (mg/dL)	F1 (% Creatine to Creatinine)	F2 (% Creatinine to Creatine)
Day 1	1	1.185 ± 0.003	0.317 ± 0.001	2.768 ± 0.040	1.098 ± 0.022
	2	1.172 ± 0.005	0.312 ± 0.002	2.785 ± 0.014	1.117 ± 0.046
	3	1.167 ± 0.002	0.311 ± 0.001	2.754 ± 0.030	1.182 ± 0.009
Day 2	4	1.190 ± 0.001	0.308 ± 0.001	2.694 ± 0.016	0.949 ± 0.021
	5	1.169 ± 0.006	0.306 ± 0.001	2.808 ± 0.062	0.997 ± 0.034
	6	1.163 ± 0.001	0.305 ± 0.001	2.769 ± 0.030	0.989 ± 0.031
Day 3	7	1.096 ± 0.009	0.297 ± 0.001	2.907 ± 0.216	1.368 ± 0.078
	8	1.087 ± 0.005	0.288 ± 0.002	3.118 ± 0.051	1.245 ± 0.042
	9	1.096 ± 0.010	0.289 ± 0.006	3.065 ± 0.078	1.274 ± 0.029
Average		1.147 ± 0.042	0.304 ± 0.010	2.85 ± 0.15	1.14 ± 0.14
Certified Value		1.160			
Certified Range		1.030-1.450			
Precicontrol Clinchem Multi 2	Replicate	Creatinine (mg/dL)	Creatine (mg/dL)	F1 (% Creatine to Creatinine)	F2 (% Creatinine to Creatine)
Day 1	1	3.569 ± 0.035	3.755 ± 0.072	3.301 ± 0.060	-0.266 ± 0.385
	2	3.561 ± 0.018	3.743 ± 0.004	3.214 ± 0.027	-0.313 ± 0.048
	3	3.529 ± 0.004	3.752 ± 0.008	3.153 ± 0.064	-0.311 ± 0.032
Day 2	4	3.761 ± 0.002	4.044 ± 0.013	2.988 ± 0.019	-0.066 ± 0.071
	5	3.704 ± 0.008	4.029 ± 0.012	2.902 ± 0.017	-0.026 ± 0.044
	6	3.600 ± 0.022	4.050 ± 0.019	2.919 ± 0.030	0.176 ± 0.014
Day 3	7	3.767 ± 0.013	4.032 ± 0.027	2.934 ± 0.049	-0.048 ± 0.020
	8	3.797 ± 0.029	4.044 ± 0.017	2.889 ± 0.052	-0.064 ± 0.024
	9	3.750 ± 0.012	3.995 ± 0.037	2.900 ± 0.058	-0.045 ± 0.014
Average		3.67 ± 0.11	3.94 ± 0.14	3.02 ± 0.16	-0.11 ± 0.16
Certified Value		3.81			
Certified Range		3.310-4.750			

Table 2. Comparison of the creatinine certified values (mg/dL) of the lyophilized serum based controls Precinorm, Precipath and Calibrator CREJ2 and the Certified Reference Materials ERM-DA252a and ERM-DA253a (frozen human serum) with the experimental values of creatinine and creatine obtained by double spike LC-MS/MS (in mg/dL). Interconversion factors F1 (%creatine to creatinine) and F2 (%creatinine to creatine) are also given. Uncertainty of the experimental values is expressed as 1s standard deviation of n=3 independent replicates.

Sample	Creatinine Certified value	Limits of agreement	Creatinine	Creatine	F1 (% Creatinine to Creatinine)	F2 (% Creatinine to Creatine)
Precinorm	1.21	1.00-1.42	1.18 ± 0.01	0.33 ± 0.01	3.06 ± 0.05	-0.58 ± 0.01
Precipath	4.05	3.33-4.75	3.96 ± 0.01	4.08 ± 0.01	3.27 ± 0.61	0.57 ± 0.13
Calibrator CREJ2	4.06	4.01-4.12	4.01 ± 0.03	1.75 ± 0.02	2.91 ± 0.05	0.16 ± 0.01
ERM-DA252a	0.310	0.260-0.360	0.317 ± 0.002	0.096 ± 0.001	2.47 ± 0.15	-0.09 ± 0.01
ERM-DA253a	5.000	4.800-5.200	4.985 ± 0.066	0.426 ± 0.007	2.72 ± 0.04	-0.45 ± 0.03

Table 3. Concentrations of creatinine and creatine (mg/dL) obtained by LC-MS/MS and GC-MS in the different aliquots analyzed for six real human serum samples following the strategy described in Figure 2. Interconversion factors F1 (% creatine to creatinine) and F2 (% creatinine to creatine) are also given. Uncertainty of the experimental values is expressed as 1s standard deviation of n=3 independent replicates. N.D.: Not detected.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Aliquot A LC- IDMS/MS	Creatinine	3.99±0.04	1.19±0.01	1.44±0.02	0.61±0.01	3.82±0.03	1.13±0.01
	Creatine	4.04±0.02	0.33±0.01	3.44±0.08	0.22±0.01	0.19±0.01	0.15±0.01
	F1%	2.86	8.93	1.06	4.12	2.73	5.77
	F2%	0.62	-0.12	0.56	0.45	0.37	0.17
Aliquot B1.1 LC- IDMS/MS	Creatinine	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Creatine	4.10±0.04	0.32±0.01	3.36±0.12	0.21±0.01	0.22±0.02	0.15±0.01
	F1%	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	F2%	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aliquot B2.1 LC- IDMS/MS	Creatinine	4.00±0.03	1.21±0.02	1.49±0.03	0.61±0.01	3.86±0.01	1.14±0.03
	Creatine	4.08±0.02	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	F1%	2.99	-----	-----	-----	-----	-----
	F2%	0.49	-----	-----	-----	-----	-----
Aliquots B1.2 + B2.2, conventional GC-IDMS	Creatinine	5.14±0.13	1.30	1.58	0.63	3.87±0.06	1.15±0.01
	Creatine	4.97±0.33	0.36	3.55	0.25	0.43±0.03	0.16±0.01
Aliquots B1.2 + B2.2, double spike GC-IDMS	Creatinine	4.21±0.03	1.21	1.51	0.61	3.87±0.06	1.15±0.01
	Creatine	4.89±0.14	0.39	3.53	0.25	0.23±0.03	0.15±0.02
	F1%	22.5	33.2	2.31	7.51	1.40	3.89
	F2%	1.45	-1.90	0.91	-0.36	4.41	1.27

SUPPORTING INFORMATION

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CREATININE AND CREATINE IN HUMAN SERUM BY DOUBLE-SPIKE ISOTOPE DILUTION LC-MS/MS AND GC-MS

Mario Fernández Fernández^a, Pablo Rodríguez-González*^a, M. Elena Añón Álvarez^b, Felix Rodríguez^c, Francisco V. Álvarez Menéndez^b, J. Ignacio García Alonso^a.

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

^b*Clinical Biochemistry Service of the Central University Hospital of Asturias.*

^c*Department of Organic and Inorganic Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo.*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

Number of pages: 4
Number of Figures: 0
Number of Tables: 1

Reagents and materials

Creatinine labeled in one ^{13}C atom ($^{13}\text{C}_1$ -creatinine, labeled in the methyl group) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Creatine labeled in two ^{13}C atoms ($^{13}\text{C}_2$ -Creatine, labeled in the carboxylic group and adjacent methylene group) was in-house synthesized at the Department of Organic and Inorganic Chemistry of the University of Oviedo. Natural abundance creatinine and creatine standards (Sigma-Aldrich) were employed to calculate the concentration of $^{13}\text{C}_1$ -creatinine and $^{13}\text{C}_2$ -Creatine by reverse IDMS. The isotopic enrichment of ^{13}C in the labeled analogues was calculated according to the method described elsewhere¹. Precicontrol Clinchem Multi 1, Precicontrol Clinchem Multi 2, Precinorm, Precipath and CREJ2 lyophilized serums based controls for creatinine determination were provided by Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Six frozen human serum samples from anonymous patients were provided by the Clinical Biochemistry Service of the Central University Hospital of Asturias. The certified reference materials ERM-DA252a and ERM-DA253a (frozen human serum) were purchased from the Laboratory of the Government Chemist (LGC, Teddington, UK). Methanol was purchased by Fischer-Scientific (Madrid, Spain), ammonium acetate and formic acid was supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Eppendorf tubes (1.5 ml) were purchased from Labbox (Mataró, Spain) and pore filters (0.22 μm) were from Tecnokroma (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

Instrumentation

The triple quadrupole LC-MS/MS system employed in this work was an Agilent 6460 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with a “jet-stream” electrospray ionization (ESI) source and coupled to a 1290 HPLC infinity system

(Agilent Technologies). In addition, an Agilent 7890 gas chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) was employed operating at 70 eV in the SIM mode using a HP-5 MS capillary column (cross-linked 5% phenyl-methyl siloxane, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m coating). An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. A centrifuge 5810R D from Eppendorf (Hamburg, Germany) was used for serum protein removal and a mini-vap evaporator/concentrator from Supelco (St. Louis, MO, USA) was used for the evaporation of the samples.

Procedures

Sample preparation and measurement conditions for GC-MS Analyses. After derivatization 1 mL of hexane was added and the reaction tubes were briefly shaken for 1 minute. Finally, the organic layer was transferred to a chromatographic vial and preconcentrated under a gentle stream of nitrogen. The column temperature was initially held at 70°C for 1 minute, and then a temperature ramp of 12°C/min was applied until 202°C. A second temperature ramp of 60°C/min was applied until 300°C for 2 minutes. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The injector temperature was kept at 220°C while the interface temperature and the ion source were 280°C and 230°C respectively. A sample volume of 2 μ L was injected in splitless mode with 1 minute of purge time. The quantification was performed measuring the m/z range 221-225 using a 10 ms dwell time per mass in the SIM mode.

Table S1. Calculation of creatine and creatinine molar fraction by multiple linear regression calculated with the data extracted from the chromatogram shown in Figure 1.

Creatine peak		Calculated theoretical abundances		
Peak areas	Relative Abundances	Natural Creatine	¹³ C ₁ Creatine	¹³ C ₂ Creatine
201081	0.4811	0.9592	0.0107	0.0000
16848	0.0403	0.0362	0.9591	0.0117
196899	0.4711	0.0045	0.0259	0.9685
3156	0.0076	0.0002	0.0042	0.0157
Creatinine peak		Calculated theoretical abundances		
Peak areas	Relative Abundances	Natural Creatinine	¹³ C ₁ Creatinine	¹³ C ₂ Creatinine
53665	0.4790	0.9582	0.0107	0.0000
55509	0.4955	0.0391	0.9582	0.0117
2863	0.0256	0.0026	0.0288	0.9676
0	0.0000	0.0001	0.0023	0.0186
Molar fractions	Creatine peak	Creatinine peak		
X _{nat}	0.5014 ± 0.0001	0.4943 ± 0.0010		
X _{13C1}	0.0172 ± 0.0001	0.4968 ± 0.0010		
X _{13C2}	0.4836 ± 0.0001	0.0103 ± 0.0010		

REFERENCES

- (1) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *J. Mass Spectrom.* 2014, 49, 681-691.

D.3. Desarrollo y validación de un procedimiento de medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares en líneas celulares de cáncer de próstata mediante regresión lineal múltiple y GC-MS.

Artículo científico III: Enviado

Título: “Development and validation of a measurement procedure for mass isotopomer distribution analysis of intracellular metabolites in prostate cancer cell lines by multiple linear regression and GC-MS”

Autores: Mario Fernández-Fernández, Pablo Rodríguez-González , David Hevia Sánchez, Pedro González-Menéndez, Rosa M^a Sainz Menéndez, J. Ignacio García Alonso.

Analytical Chemistry (Enviado)

D.3.1. Introducción

La relación existente entre cáncer y metabolismo de la glucosa fue descubierta por Otto Warburg a principios del siglo XX, donde observó que las células cancerígenas consumían glucosa más rápida que las células sanas por vía de la Glucólisis. Además, investigaciones llevadas a cabo en las últimas décadas no solo confirmaron esta tendencia sino que evidenciaron también que ese incremento en el consumo de glucosa en las células cancerígenas se realiza a través de la ruta de las pentosas fosfato. Esto es conocido como “*Efecto Warburg*”²³⁹.

Para poder estudiar las rutas metabólicas y sus regulaciones el empleo de trazadores isotópicos estables (^{13}C o ^{15}N) juega un papel esencial. Aprovechando las diferencias metabólicas existentes entre las células sanas y las células cancerígenas como son la proliferación celular, incremento de la invasión local, metástasis o el anteriormente mencionado “*Efecto Warburg*”, el marcaje en ^{13}C o ^{15}N de las mismas va a permitir identificar cambios en las rutas metabólicas en células cancerígenas de diferentes tipos de cáncer^{240,241}. Estas diferencias metabólicas en las células cancerígenas son las que permitirán llevar a cabo estudios para observar su respuesta a diferentes tipos de fármacos^{243,244} y que en última instancia, nos puedan revelar resultados esperanzadores con los que en un futuro poder llevar a cabo terapias “diana” en la lucha contra el cáncer.

La estrategia de marcaje (principalmente con ^{13}C) se conoce con el nombre de “Huella dactilar de ^{13}C ”²⁴⁸. Esta consiste en el uso de un sustrato específico (generalmente Glucosa) enriquecido en ^{13}C adicionado a un cultivo celular en crecimiento, para posteriormente poder observar como “esa etiqueta” (^{13}C) se transfiere por toda la red metabólica generando patrones específicos de marcaje en los diferentes metabolitos intracelulares permitiéndonos revelar con facilidad las rutas metabólicas seguidas. Esta estrategia consta de tres etapas fundamentales: 1) Adición de un sustrato específico marcado en ^{13}C a un cultivo celular en crecimiento, 2) Medida de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C , 3) Establecimiento de las rutas metabólicas a partir de la distribución isotópica mediante espectrometría de masas.

La etapa clave de esta estrategia es la medida exacta y precisa de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C que nos permita establecer de manera fiable las diferentes rutas metabólicas. Existen dos técnicas para la medida de

la distribución isotópica: resonancia magnética nuclear (RMN)^{253,254} o espectrometría de masas^{252,255,256}, siendo esta última la más utilizada debido a su accesibilidad, coste y mayor sensibilidad.

Actualmente los métodos más usados para llevar a cabo la determinación de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares son: **1)** Métodos basados en la integración directa de las áreas de pico de los diferentes isotopólogos expresado como fracciones molares, donde las áreas de los iones deben ser corregidas debido a la contribución natural del ^{13}C ^{260,261,262}. **2)** Métodos basados en regresión lineal múltiple¹⁸¹ en los cuales únicamente se mide la abundancia isotópica del isotopólogo natural, asumiendo que las abundancias teóricas de los isotopólogos marcados en ^{13}C es la misma que el isotopólogo natural incrementada en masa, donde además se tiene que llevar a cabo una corrección matemática relacionada con la incorporación de átomos de ^{13}C a la molécula.

En este Tercer capítulo de Tesis hemos desarrollado una metodología más exacta y precisa basada en regresión lineal múltiple, para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares en líneas celulares sanas y de cáncer de próstata (andrógeno dependientes y andrógeno independientes) a las que se les ha añadido 2- ^{13}C -Glucosa. La principal novedad en la metodología radica en el cálculo de las abundancias teóricas de todos los posibles isotopólogos natural y marcados en ^{13}C de cada metabolito, haciendo uso de la distribución binomial de probabilidades como se ha explicado en la sección y en donde además se ha utilizado el valor exacto de enriquecimiento en ^{13}C calculado experimentalmente como se ha explicado previamente en la sección. De esta manera se asegura una medida exacta y precisa de la distribución isotópica que nos permitirá establecer con absoluta precisión las rutas metabólicas.

D.3.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo fue el desarrollo de una metodología para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares en líneas celulares normales y de cáncer de próstata mediante GC-MS y regresión lineal múltiple. Este objetivo se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización del procedimiento de extracción de los metabolitos intracelulares en las diferentes líneas celulares

2. Derivatización e identificación de los metabolitos intracelulares extraídos.
3. Aplicación de la metodología desarrollada a líneas celulares de cáncer de próstata en cultivos celulares a los que se les ha añadido 2-¹³C-Glucosa.
4. Validación de la metodología mediante comparación de las fracciones molares teóricas vs fracciones molares experimentales y mediante la comparación de los resultados obtenidos mediante GC-MS y GC-C-IRMS en función de la relación ¹³C/¹²C.
5. Estudio de la mínima cantidad de ¹³C detectada aplicando la metodología desarrollada basada en GC-MS y regresión lineal múltiple.

D.3.3. Artículo Científico III

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MEASUREMENT PROCEDURE FOR MASS ISOTOPOMER DISTRIBUTION ANALYSIS OF INTRACELULAR METABOLITES IN PROSTATE CANCER CELL LINES BY MULTIPLE LINEAR REGRESSION AND GC-MS.

Mario Fernández-Fernández^a, Pablo Rodríguez-González*^a, David Hevia Sánchez^b, Pedro González-Menéndez^b, Rosa M^a Sainz Menéndez^b, J. Ignacio García Alonso^a.

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

^b*University Institute of Oncology (IUOPA), University of Oviedo. Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain.*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

This work describes a methodology based on multiple linear regression and GC-MS for the mass isotopomer distribution analysis of intracellular metabolites in cultures of prostate cancer cell lines. Novel aspects of this work are: i) the calculation of theoretical isotopic distributions of the different isotopomers from an experimentally measured value of % ¹³C enrichment of the labelled precursor ii) the calculation of the contribution of lack of mass resolution of the mass spectrometer and different fragmentation mechanism such as the loss or gain of hydrogen atoms in the EI source to measure the purity of the selected cluster for each metabolite and iii) the validation of the methodology not only by the analysis of gravimetrically prepared mixtures of isotopomers but also by the comparison of the obtained molar fractions with experimental values obtained by GC-C-IRMS based on ¹³C/¹²C isotope ratio measurements. The method is able to measure mass isotopomer distributions in twenty-

eight intracellular metabolites derived from glucose metabolism in normal and prostate cancer cell lines grown in the presence of ^{13}C -labelled Glucose. The validation strategies demonstrate a satisfactory accuracy and precision of the proposed procedure. Also, our results show that the minimum value of ^{13}C incorporation that can be accurately quantified is significantly influenced by the calculation of the spectral purity of the measured cluster and the number of ^{13}C atoms of the labelled precursor. The proposed procedure is able to accurately quantify in gravimetrically prepared mixtures of natural and labelled glucose molar fractions of 0.07%. The method is finally applied here to initial studies of glucose metabolism of different prostate cancer cell lines

INTRODUCTION

The relationship between cancer and glucose metabolism was first proposed by Otto Warburg¹ in 1920s when he discovered that carcinogenic cells consumed glucose faster than healthy cells via glycolysis. During the last decade, it was demonstrated that the increased glucose consumption of carcinogenic cells occurs not only via glycolysis but also via the pentose phosphate pathway²⁻⁴. Many of the current metabolomics approaches to study cell glucose metabolism make use of enriched stable-isotopes⁵⁻⁶. After the discovery of ^2H and ^{15}N by Urey⁹⁻¹⁰, the first studies of metabolic pathways using stable isotopes were carried out by Schoenheimer⁷⁻⁸ in the 1930`s using ^2H - and ^{15}N -labeled compounds. After 1950, most of the metabolic pathway investigations were carried out using radiotracers due to the higher cost of stable isotopes¹¹⁻¹². However, during 1970`s radioactive isotopes were progressively replaced by stable isotopes¹³⁻¹⁴ not only due to the associated health and environmental risks of working with radiotracers but also to the development of mass spectrometric techniques like GC-MS and LC-MS¹⁵. From the early 21st-century there has been a massive application of stable isotopes in metabolomics, and in particular in metabolic pathways investigations⁶.

Isotopic-fingerprinting of metabolites employs ^{13}C -labeled substrates to create specific labeling patterns in key metabolites to reveal metabolic pathways¹⁶. This usually includes three key steps. First, a ^{13}C -labeled tracer, in most cases ^{13}C -labeled glucose, is introduced into a growing cell culture. Then, ^{13}C -labeling is measured in intracellular metabolites and finally, individual biochemical pathways are estimated from the labeling patterns measured. This labeling strategy is mainly applied for several purposes: i) to confirm or discover functional pathways¹⁶, ii) to determine the contribution of a pathway in a synthesis product in metabolic engineering¹⁷ and iii) to establish differences in metabolic routes between healthy and carcinogenic cells. Concerning the last application, ^{13}C -labeling can identify metabolic changes due to a different proliferative status, to the presence of local or distant metastasis and after specific targeted therapies in cancer tissues¹⁸.

So far, two techniques are employed to measure the isotopic labeling in metabolites: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS) coupled to a chromatography separation such as LC-MS¹⁹ or GC-MS²⁰⁻²⁴. NMR methods are less sensitive, require larger amount of sample and is mainly used to measure ^{13}C -positional enrichment²⁵⁻²⁶. MS is less expensive, and provides a more sensitive detection of the ^{13}C molecular enrichment²⁷⁻²⁹.

For the calculation of mass isotopomer distributions (MID), there are different approaches described in the literature. The first calculates MID directly from the integration of peak areas at each ion chromatogram to calculate fractional abundances²⁰. In most cases³⁰⁻³⁵ the peak areas are corrected for the natural abundance contribution of all elements contained in the molecule. The classical correction³⁶ assumes that MID of

both the unlabeled and ^{13}C -labeled molecules are equal but shifted in mass. Hence, the method only requires the previous measurement of MID for the unlabeled compound. However, this classical correction overestimates ^{13}C natural abundance contributions when the number of C atoms in the molecule increases. To solve these problems, current corrections are based on computational methods that calculate theoretical MIDs of labeled isotopomers³⁷⁻³⁸. A second strategy, widely employed to calculate MID, is based in the least squares approach developed by Brauman³⁹ in 1966. In these methods multiple linear regression is employed to solve a system of linear equations in which the experimental abundances are related to the theoretical and fractional abundances of unlabeled and labeled isotopomers⁴⁰⁻⁴¹. The mass spectra of the unlabeled compound is measured and used to calculate the theoretical mass spectra for the different labeled isotopomers. The third strategy is based on the calculation of complete mass isotopomer distributions including positional isotopomers using different techniques: GC-MS⁴², GC-MS-MS and LC-MS-MS⁴³⁻⁴⁵. For example, a recent study based on tandem mass spectrometry and least-squares regression measured the complete isotopomer distribution of aspartate⁴⁶. The theoretical tandem MS distribution of unlabeled and labeled aspartate was calculated using a binomial distribution using the natural and labeled isotopic abundances of all elements present in the molecule.

We present here an improved methodology for MID analysis of intracellular metabolites in cancer cell lines by multiple linear regression and GC-MS. The method is able to measure MID in twenty-eight intracellular metabolites derived from glucose metabolism in normal and prostate cancer cell lines grown in the presence of 2- $^{13}\text{C}_1$ glucose. The novelty of this methodology in comparison with previous published approaches relies on three main points: i) theoretical isotopic distribution of the

different isotopomers are calculated from the experimentally measured value of % ^{13}C enrichment of the labeled glucose, instead of using the value provided by the manufacturer, ii) the purity of the selected cluster for each metabolite is studied to calculate the contribution of either the lack of mass resolution of the mass spectrometer, or the existence of different fragmentation mechanism such as the loss or gain of hydrogen atoms in the EI source and iii) a full validation of the proposed method is carried out by the comparison of the calculated molar fractions with theoretical values obtained from gravimetrically prepared mixtures of isotopomers and with experimental values obtained by GC-Combustion-IRMS based on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio measurements. Using the proposed procedure we have been able to quantify the lowest validated values of ^{13}C incorporation ever reported in the literature. Initial studies on the application of the procedure to study the glucose metabolism of different prostate cell lines are also presented.

EXPERIMENTAL

Reagents and materials

Natural abundance D-glucose ($\geq 99.5\%$), L-alanine ($\geq 98\%$), glycine ($\geq 98.5\%$), β -alanine ($\geq 99\%$), L-valine ($\geq 98\%$), L-leucine ($\geq 98\%$), L-isoleucine ($\geq 98\%$), L-proline ($\geq 99\%$), L-methionine ($\geq 98\%$), L-serine ($\geq 99\%$), L-threonine ($\geq 98\%$), L-lysine ($\geq 98\%$), tyrosine ($\geq 98\%$), L-phenylalanine ($\geq 98\%$), cysteine ($\geq 97\%$), L-aspartic acid ($\geq 98\%$), L-glutamic acid ($\geq 99\%$), sodium fumarate dibasic ($\geq 99\%$), D-ribulose-5-phosphate disodium salt ($\geq 96\%$), sodium citrate tribasic dehydrate ($\geq 99\%$), urea (95%), sodium succinate dibasic ($\geq 98\%$), sodium L-lactate (98%), dodecanoic acid (98%), myristic acid (99%), palmitic acid ($\geq 99\%$), stearic acid ($\geq 98.5\%$), cholesterol ($\geq 99\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Disodium DL-malate (\geq

98%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). D-glucose-2-¹³C₁, D-glucose-1,2-¹³C₂, D-glucose-1,2,3-¹³C₃, D-glucose-¹³C₆, glycine-2-¹³C₁ and glycine-¹³C₂ were also purchased from Sigma-Aldrich. For cell culture, we employed normal human prostate epithelium PNT1A cells (Cat Number # 95012614), androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma LNCaP cells (Cat Number # CRL-1740), androgen-insensitive human prostate carcinoma PC3 cells (Cat Number # CRL-1435) obtained from “European Collection of Cell Cultures” (ECACC, Wiltshire, UK) and from “American Type Culture Collection” (ATCC, Rockville, MD). LNCaP^{S12} cells (LNCaP cells transfected with expression vector pcDNA3 containing the human MnSOD cDNA) and LNCaP^{MOCK} cells (LNCaP cells transfected with the corresponding empty vector) were developed in our laboratory. RPMI 1640 and DMEM/F12 medium were purchased from Lonza (Basel, Switzerland), fetal bovine serum was purchased from Gibco life Technologies (Waltham, USA). L-glutamine, HEPES, penicillin, streptomycin, amphotericin B, Dulbeccos’s phosphate buffered saline were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Flask T75 was purchased from Corning (Corning NY, USA), and 60 mm dishes were purchased from DB (New Jersey, USA). Methoxyamine hydrochloride (98%), N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide with 1% tert-butyldimethylchlorosilane (≥95%), pyridine (≥98%) and propionic anhydride (≥95%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydroxylamine hydrochloride (≥99%) was purchased from ACROS (Gael, Belgium). Methanol was purchased by Fischer-Scientific (Madrid, Spain), ethyl acetate and hexane was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Eppendorf tubes (1.5 ml) were purchased from Labbox (Mataró, Spain) and ultrapure water was obtained from a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

Instrumentation

A gas chromatograph, Agilent 7890, coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) operating at 70 eV was employed. The GC was fitted with a split/splitless injector and a DB-5 MS capillary column (cross-linked 5% phenyl-methyl siloxane, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m coating). In addition, a Trace GC Ultra chromatograph from Thermo (Bremen, Germany) equipped with a GC Triplus Autosampler, split/splitless injector, a GC-Isolink interface and a Conflo IV universal interface with a Ni/CuO/Pt combustion reactor set a 1000°C was employed coupled to a Delta V advantage sector field mass-spectrometer (Thermo). An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. A centrifuge 5810R D from Eppendorf (Hamburg, Germany) was used to remove debris. A centrifugal vacuum concentrator from Genevac (Sulflok, UK) was employed for sample evaporation. A thermomixer compact from Eppendorf (Hamburg, Germany) was used to control the temperature of the derivatization reactions.

Procedures

Detailed experimental conditions related to the cell culture, extraction of intracellular metabolites⁴⁷ and the derivatization procedures for gas chromatographic analysis are given in the Supplementary Information.

GC-MS experimental conditions for the separation and detection of intracellular metabolites

The column temperature was initially held at 60 °C for 1 min, and then a temperature ramp of 5°C/min was applied until 320 °C for 10 min. The total run time was 68 min.

Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The injector temperature was kept at 250°C while the interface temperature and the ion source were 280°C and 230°C, respectively. A sample volume of 2 µL was injected in splitless mode with 1 min of purge time. The electron ionization source was operated at 70eV. A full fragment cluster for each metabolite was measured in SIM mode using 10ms of dwell time per mass.

GC-MS experimental conditions for the separation and detection of glucose

The injection volume was 2 µL and the samples were injected in splitless mode. GC oven temperature was held at 70°C for 2 min, increased to 300°C at 20°C/min, and held for 3 min. Mass isotopomer distribution of Glucose was determined from the cluster at m/z 370, which contains the C1-C5 carbon atoms of Glucose.

GC-C-IRMS experimental conditions for intracellular metabolite- specific $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio measurement

For GC-C-IRMS analysis, 1 µL of sample was injected in the splitless mode by an autosampler at 250°C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The energy applied at the EI source was 124 eV. Two Faraday cup collectors for m/z 44 and 45, were used for CO₂ detection. Chromatographic conditions were the same as those employed in GC-MS analysis. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio was calculated from the integrated areas of m/z 44 and m/z 45.

GC-C-IRMS experimental conditions for glucose-specific $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio measurement

1 μL of sample was injected in split mode (1:5) at 250°C. The GC oven temperature was held at 70°C for 2 min, increased to 230°C at 20°C/min, at 10°C/min to 300°C and finally held for 5 min. Glucose-specific $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio was calculated from the integrated peak areas of m/z 44 and m/z 45.

Multiple linear regression for MID analysis

For the measurement of the MID of the different intracellular metabolites, the experimental isotopic distribution measured by GC-MS can be assumed to be a linear combination of all possible isotopomers with a different incorporation of ^{13}C in the molecule. The relative contribution of different isotope patterns in the experimental mass spectra can be calculated by multiple linear regression⁴⁸. This is better described in equation (1) in matrix notation for the measurement of a given number of m masses in a compound a .

$$\begin{pmatrix} {}^a A_{\text{sample}}^1 \\ {}^a A_{\text{sample}}^2 \\ {}^a A_{\text{sample}}^3 \\ \vdots \\ {}^a A_{\text{sample}}^m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} {}^a A_{\text{nat}}^1 & {}^a A_{^{13}\text{C}1}^1 & {}^a A_{^{13}\text{C}2}^1 & {}^a A_{^{13}\text{C}3}^1 & {}^a A_{^{13}\text{C}4}^1 & \cdots & {}^a A_{^{13}\text{C}n}^1 \\ {}^a A_{\text{nat}}^2 & {}^a A_{^{13}\text{C}1}^2 & {}^a A_{^{13}\text{C}2}^2 & {}^a A_{^{13}\text{C}3}^2 & {}^a A_{^{13}\text{C}4}^2 & \cdots & {}^a A_{^{13}\text{C}n}^2 \\ {}^a A_{\text{nat}}^3 & {}^a A_{^{13}\text{C}1}^3 & {}^a A_{^{13}\text{C}2}^3 & {}^a A_{^{13}\text{C}3}^3 & {}^a A_{^{13}\text{C}4}^3 & \cdots & {}^a A_{^{13}\text{C}n}^3 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ {}^a A_{\text{nat}}^m & {}^a A_{^{13}\text{C}1}^m & {}^a A_{^{13}\text{C}2}^m & {}^a A_{^{13}\text{C}3}^m & {}^a A_{^{13}\text{C}4}^m & \cdots & {}^a A_{^{13}\text{C}n}^m \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} {}^a x_{\text{nat}} \\ {}^a x_{^{13}\text{C}1} \\ {}^a x_{^{13}\text{C}2} \\ {}^a x_{^{13}\text{C}3} \\ {}^a x_{^{13}\text{C}4} \\ \vdots \\ {}^a x_{^{13}\text{C}n} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} {}^a e^1 \\ {}^a e^2 \\ {}^a e^3 \\ \vdots \\ {}^a e^m \end{pmatrix} \quad (1)$$

Where ${}^a A_{\text{sample}}^m$ refers to the experimental abundances measured by mass spectrometry in the sample and ${}^a A_{\text{nat}}^m$ to the natural theoretical isotope abundances. ${}^a A_{^{13}\text{C}1}^m$ and ${}^a A_{^{13}\text{C}n}^m$ are the theoretical isotope abundances calculated when one or n atoms of ^{13}C , respectively are incorporated into the molecule. Theoretical isotope abundances are

calculated with a visual basic program written as a macro for Microsoft Excel⁴⁹⁻⁵⁰ by adapting the calculation algorithm described by Kubinyi⁵¹. IUPAC data on the natural isotopic composition of the elements, the exact mass of the isotopes and the exact value of ¹³C enrichment calculated experimentally⁵² were introduced in the spreadsheet and were read from the visual basic program. Finally, ${}^a x_{13C_n}$ refers to the unknown molar fraction, which provides the contribution of the incorporation of *n* atoms of ¹³C in the molecule. As we have more parameters (nominal masses) than unknowns (molar fractions) an error vector *e* is included. The molar fractions can be obtained by multiple linear regression using conventional spreadsheet software (e.g. LINEST function of Microsoft Excel). Please note that the theoretical abundances used in equation (1) will have to be corrected by spectral purity as discussed below.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of the intracellular metabolites

For the identification of the intracellular metabolites the samples were measured in SCAN mode and the experimental spectra were compared with Wiley and NIST MS libraries. Once the structure was proposed by the library, it was confirmed by injecting a natural abundance standard to compare the experimental mass spectra and the retention times. A total number of 28 metabolites including 16 amino acids, 7 small metabolites including organic acids and 5 fatty acids, including here cholesterol, were positively identified. Then, a full cluster for each metabolite was measured in SIM mode to calculate the isotopic distribution. The identity of the metabolite, the fragment formula and the measured cluster for each metabolite are given in Table S1 in the Supplementary Information. In all cases, the selected cluster contained the original

number of C atoms of the underivatized molecule. Most of the clusters corresponded to the M-57 ion with the main in-source fragmentation being the loss of the tertbutyl group from the derivatizing reagent.

Spectral purity of the selected clusters for each intracellular metabolite

When using the EI source, different fragmentation mechanism may occur simultaneously⁵³ generating spectral interferences which prevent the accurate measurement of the isotope patterns of the metabolites. For example, given the main ion $[a]$ of a given cluster, we can find spectral overlap with $[a+H^+]$ or $[a-H^+]$ ions, so the purity of the selected cluster must be studied for accurate metabolic data to be obtained in real samples. Such potential mass overlap can be quantified by comparing the experimentally measured isotope abundances for the selected cluster of the natural abundance compound with the theoretical abundances calculated for $[a]$, $[a+H^+]$, $[a-H^+]$ and other possible ions using equation (2)^{48,54}.

$$\begin{bmatrix} A_{\text{exp}}^1 \\ A_{\text{exp}}^2 \\ A_{\text{exp}}^3 \\ \dots \\ A_{\text{exp}}^{n-1} \\ A_{\text{exp}}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_a^1 & A_{a-H}^1 & A_{a+H}^1 & \dots & A_{a\pm jH}^1 \\ A_a^2 & A_{a-H}^2 & A_{a+H}^2 & \dots & A_{a\pm jH}^2 \\ A_a^3 & A_{a-H}^3 & A_{a+H}^3 & \dots & A_{a\pm jH}^3 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_a^{n-1} & A_{a-H}^{n-1} & A_{a+H}^{n-1} & \dots & A_{a\pm jH}^{n-1} \\ A_a^n & A_{a-H}^n & A_{a+H}^n & \dots & A_{a\pm jH}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_a \\ X_{a-H} \\ X_{a+H} \\ \vdots \\ X_{a\pm jH} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (2)$$

In equation (2) A_{exp}^i refers to the measured abundance of the isotopologue i , A_a^i the theoretical abundance of the isotopologue i in the cluster $[a]$, A_{a+H}^i the theoretical abundance of the isotopologue i in the cluster $[a+H^+]$ and A_{a-H}^i the theoretical abundance of the isotopologue i in the cluster $[a-H^+]$.

Experiments were performed at five different concentration levels for each metabolite to check for concentration effects during fragmentation and no changes due to concentration were detected. The average results and their standard deviations obtained for each identified intracellular metabolite are given in Table S2 in the Supplementary Information. For most compounds, the major contribution arose from the $[a]$ ion whereas contributions due to the lack of resolution of the mass spectrometer or the loss of hydrogen atoms, $[a-H^+]$ and $[a-2H^+]$, or the gain of hydrogen atoms, $[a+H^+]$, were lower than 1% in general. However, certain compounds presented significant contributions such as L-lysine where the contribution of $[a-H^+]$ was about 2%, β -alanine where $[a-2H^+]$ was about 3%, glycine where the contribution of $[a+H^+]$ was about 2% and ribulose 5P where the contribution of $[a+H^+]$ reached even 6%. It is worth noting that the $[a+H^+]$ contribution in fatty acids increased with the number of carbon atoms. Cholesterol, included in this group, reached a value of 2.5%. According to these results, we considered that these contributions were significant and had to be taken into account when calculating the theoretical isotope patterns to be employed in equation (1).

Determination of the enrichment of the isotopically labeled compounds by GC-MS

For the determination of the isotopic enrichment of the labeled standards we followed a procedure previously developed in our laboratory⁵². For this purpose, the measured isotope distribution of all labeled compounds was compared with theoretically derived distributions calculated for different tentative isotope enrichments. The isotope enrichment providing the minimum in the square sum of residuals for the linear regression between the theoretical and experimental spectra is selected as the true enrichment. The calculated isotopic enrichments obtained from n=5 independent GC-MS injections were $98.45\pm 0.03\%$ for D-Glucose-2-¹³C₁, $98.91\pm 0.02\%$ for D-Glucose-

1,2-¹³C₂, 99.95±0.01% for D-Glucose-1,2,3-¹³C₃, 99.04±0.01% for D-Glucose-¹³C₆, 98.37%±0.01% for Glycine-2-¹³C and 99.48±0.02% for Glycine-¹³C₂. Note that, in most cases, the calculated isotopic enrichment is significantly different to the nominal value provided by the manufacturers (99%) and that this value is provided without any associated uncertainty. The calculated isotopic enrichments for ¹³C in the different compounds were then used in the calculation of the theoretical isotopic distribution of the different isotopomers of the metabolites to improve the accuracy and precision of the MID analysis in real samples. The calculated isotope enrichments for three selected metabolites when using D-Glucose-2-¹³C₁ enriched at 98.45±0.03% are included in the Supplementary Information both before (Table S3) and after (Table S4) the correction for spectral purity taking into account the results given in Table S2. The values given in Table S4 were then employed in equation (1) for the calculation of the molar fraction of the different isotopomers when using D-Glucose-2-¹³C₁ in cell cultures.

Validation of the methodology

The proposed methodology was first validated with the analysis of gravimetrically prepared mixtures of natural abundance and labeled compounds. In this way, the experimental molar fractions obtained by equation (1) could be compared with theoretical molar fractions. We selected glucose and glycine as model compounds in the validation experiments. Glycine was chosen because it is involved in numerous processes of glucose metabolism and glucose was selected due to the specific sample preparation procedure applied. The derivatization procedure employed for the intracellular metabolites uses methoxyamine hydrochloride and N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) whereas that employed for glucose is based on a derivatization with propionic anhydride. Details of both

procedures are given in the Supporting Information. In this way we could evaluate our calculations with two different sample preparation procedures.

Analysis of gravimetrically prepared mixtures of natural abundance and labeled glucose

A first validation experiment was carried out analyzing ten mixtures containing natural abundance D-glucose, D-glucose-2- $^{13}\text{C}_1$, D-glucose-1,2- $^{13}\text{C}_2$, D-glucose-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ and D-glucose- $^{13}\text{C}_6$ prepared from solutions of known concentration. In all mixtures, the molar fraction (%) of natural abundance glucose was kept constant at a value of approximately 18-19% whereas the molar fractions of the different labeled analogues were modified between 10 and 40%. It is interesting to note that the last four mixtures were prepared in the absence of one of the labeled analogues. The results obtained are given in Table S5 in the Supplementary Information. The uncertainty of the experimental values corresponds to the standard deviation of three independent GC-MS determinations. The uncertainties of the theoretical molar fractions were calculated following the procedure proposed by Kragten⁵⁵ in which the uncertainty of the weight of the solutions, the purity of the solutions and the molecular weights of all glucose analogues was taken into account. Table S5 shows that there are no statistical differences between the theoretical and experimental molar fractions for each analogue in all prepared mixtures. Also, negligible molar fractions were obtained for those glucose analogues removed from the preparation of mixtures 7, 8, 9 and 10.

Due to the low molar fractions expected for the labeled analogues in real samples we carried out additional validation experiments to identify the lowest value of ^{13}C incorporation that could be accurately calculated with the proposed methodology. For this purpose, we prepared eight quinary mixtures containing natural abundance glucose,

D-glucose-2-¹³C₁, D-glucose-1,2-¹³C₂, D-glucose-1,2,3-¹³C₃ and D-glucose-¹³C₆, in such a way that the molar fraction of each ¹³C labeled analogue in the mixture ranged from 0.015 to 4%. Figure 1 shows the comparison between the theoretical and experimental values obtained for the molar fractions of each labeled analogues. As can be observed, all data agreed well with the expected values down to ca. 0.05% of labeled glucose. It is worth noting also that when using D-glucose-1,2,3-¹³C₃ and D-glucose-¹³C₆ all the experimental values obtained agreed well with the theoretical values. However, when using D-glucose-1,2-¹³C₂ and D-glucose-2-¹³C₁ we could not obtain accurate molar fractions for lowest isotope enrichments studied of 0.037% and 0.015%. These results suggest that the accuracy obtained for ¹³C incorporation at this very low enrichment level may depend on the number of ¹³C atoms of the labeled analogue.

Then, we studied the minimum molar fraction of the labeled glucose analogues which could be detected in binary mixtures by preparing a group of five mixtures containing natural glucose and D-glucose-2-¹³C₁ and another group of five mixtures containing natural glucose and D-glucose-¹³C₆. In both groups the molar fraction of the labeled analogue was varied between 0.015 and 0.35%. Figure 2 shows the results obtained in both groups of mixtures. As can be observed the procedure provided accurate experimental values when the molar fraction was higher or equal to 0.07% for both labeled analogues. When using D-glucose-¹³C₆, the experimental molar fractions for values lower than 0.07% were much closer to the theoretical values than those obtained using D-glucose-2-¹³C₁. In addition, the standard deviation of the molar fraction obtained for 0.07% when using D-glucose-¹³C₆ (0.002) was ten times lower than that obtained when using D-glucose-2-¹³C₁ (0.022). These results demonstrate the influence of the number of ¹³C atoms not only on the accuracy but also on the precision of the

molar fractions. Other procedures published in the literature were able to validate molar fractions in the range of 1.7%⁴¹ and 0.3%²¹. Therefore, our validated molar fractions of 0.07% are, to the best of our knowledge, the lowest validated molar fractions ever reported in the literature.

Analysis of gravimetrically prepared mixtures of natural abundance and labeled glycine

First we prepared a group of five binary mixtures containing natural glycine and glycine-2-¹³C₁, a second group of five binary mixtures containing natural glycine and glycine-¹³C₂ and a third group of five ternary mixtures containing natural glycine, glycine-2-¹³C₁ and glycine-¹³C₂. The molar fraction (%) of natural abundance glycine was modified from 20 to 99%, and the molar fractions of the labeled glycine analogues from 1 to 50%. Table 1 shows the results obtained in the three groups of samples. As can be observed, the results obtained for the experimental molar fractions calculated by equation (1) were in agreement with the theoretical molar fractions for the whole range of molar fractions assayed.

Finally, and in order to study the minimum enrichment which can be accurately measured for glycine, we prepared a group of four binary mixtures of natural abundance glycine and glycine-2-¹³C₁ and another group of four binary mixtures of natural abundance glycine and glycine-¹³C₂ at enrichment levels between 0.1 and 0.7% for the labeled analogues. The results obtained are shown in Table S6 in the supplementary information. As can be observed, the method was not able to provide accurate molar fractions at levels lower than 0.7% for both mixtures. These results show that the lowest amount of ¹³C incorporation detected in this intracellular metabolite was ten times higher than that obtained previously for glucose. A possible reason for this result is that the mass cluster measured for glucose was pure while the spectral purity of glycine (see

Table S2) showed the presence of the $[a+H^+]$ ion with a contribution of about 2% with relatively high experimental uncertainty. Obviously, the uncertainty of the $[a+H^+]$ contribution translated into a similar uncertainty for the calculated molar fractions of, particularly, glycine-2- $^{13}C_1$.

Measurement of $^{13}C/^{12}C$ ratio by GC-C-IRMS for validation of GC-MS results

A second validation of the proposed GC-MS method was carried by measuring compound-specific $^{13}C/^{12}C$ isotope ratios by GC-C-IRMS from the measured areas of m/z 44 and m/z 45 resulting from the oxidation of the target compounds to CO_2 . To carry out the comparison, molar fractions obtained by GC-MS were transformed into $^{13}C/^{12}C$ isotope ratios using equation (3).

$$\frac{X_{13C}^{13C}}{X_{13C}^{12C}} = \frac{(1 \cdot Ab_{13C1}^{13C} + (n-1) \cdot Ab_{nat}^{13C}) \cdot X_{13C1} + (2 \cdot Ab_{13C2}^{13C} + (n-2) \cdot Ab_{nat}^{13C}) \cdot X_{13C2} + \dots + (m \cdot Ab_{13Cm}^{13C} + (n-m) \cdot Ab_{nat}^{13C}) \cdot X_{13Cm} + n \cdot Ab_{nat}^{13C} \cdot X_{nat}}{(1 \cdot Ab_{13C1}^{12C} + (n-1) \cdot Ab_{nat}^{12C}) \cdot X_{13C1} + (2 \cdot Ab_{13C2}^{12C} + (n-2) \cdot Ab_{nat}^{12C}) \cdot X_{13C2} + \dots + (m \cdot Ab_{13Cm}^{12C} + (n-m) \cdot Ab_{nat}^{12C}) \cdot X_{13Cm} + n \cdot Ab_{nat}^{12C} \cdot X_{nat}}$$

In this equation m refers to the number of carbon atoms of the compound; n refers to the number of carbon atoms of the derivatized compound; Ab_{13Ci}^{13C} is the ^{13}C abundance in an analogue labeled in i ^{13}C atoms, Ab_{13Ci}^{12C} is the natural abundance for ^{12}C in an analogue labeled in i ^{13}C atoms, Ab_{nat}^{13C} is the natural abundance for ^{13}C , Ab_{nat}^{12C} is the natural ^{12}C abundance, X_{nat} is the molar fraction of the natural abundance compound and X_{13Ci} is the molar fraction of an analogue labeled in i ^{13}C atoms.

First, we calculated for the ten mixtures of Table S5 in the supplementary information containing natural abundance D-glucose, D-glucose-2- $^{13}C_1$, D-glucose-1,2- $^{13}C_2$, D-glucose-1,2,3- $^{13}C_3$ and D-glucose- $^{13}C_6$ the global $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio. For this purpose we used the isotopic enrichment calculated as described previously⁵² and the experimental molar fractions for each labeled analogue obtained by GC-MS and equation (1). Then the mixtures were injected in triplicate into the GC-C-IRMS system to measure the glucose-specific $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio. Figure 3 compares the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio calculated from the molar fractions obtained by GC-MS with the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio measured by GC-C-IRMS. For the ten mixtures, the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratios calculated with equation (3) using the molar fractions measured by GC-MS were in perfect agreement with the experimental $^{13}C/^{12}C$ isotope ratios measured by GC-C-IRMS. The uncertainty of the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio measurement by GC-C-IRMS calculated from three independent injections and expressed as relative standard deviation (RSD%) ranged from 0.3 to 2.5% whereas that obtained from the molar fractions obtained by equation (1) and equation (2) ranged from 0.001 to 0.21%. Such significant difference can be attributed to the better sensitivity obtained in the GC-MS system in SIM mode compared to that obtained by GC-C-IRMS in which the peak heights ranged from 240 to 800 mV for m/z 44.

Secondly, we followed the same validation strategy in the analysis of cell cultures of different prostate cancer cell lines grown in the presence of 2-¹³C₁-glucose. For this purpose, cell cultures were treated as described in the Supporting Information and simultaneously injected by triplicate in the GC-MS and in the GC-C-IRMS systems. This validation was performed for four intracellular metabolites involved in glucose metabolism: serine, malate, L-aspartate and L-glutamate. These intracellular metabolites were chosen because it was possible to obtain for all four compounds baseline-resolved chromatographic peaks in the GC-C-IRMS system, which is essential for and accurate ¹³C/¹²C ratio measurement. Again, the experimental molar fractions obtained by GC-MS and equation (1) were converted into ¹³C/¹²C ratios using equation (3) and compared with the ¹³C/¹²C ratios directly measured by GC-C-IRMS. Table 2 shows the molar fractions obtained for each labeled analogue and the resulting ¹³C/¹²C ratios. As can be observed, for all four compounds and all four cell lines ¹³C/¹²C isotope ratios calculated with equations (1) and (3) using the isotopic distributions measured by GC-MS were in perfect agreement with the experimental ¹³C/¹²C isotope ratio measured by GC-C-IRMS. In this case, the uncertainty of the ¹³C/¹²C isotope ratio measurement by GC-C-IRMS calculated from three independent injections and expressed as relative standard deviation (RSD%) ranged from 1.1 to 8.3% whereas that obtained by equations (1) and (3) and GC-MS ranged from 0.8 to 12.9%.

Application to the measurement of mass isotopomer distributions in cultures of prostate cancer cell lines.

To demonstrate the potential application of the proposed methodology we measured the mass isotopomer distributions of the twenty-eight intracellular metabolites in cultures of normal human prostate epithelium PNT1A cells and four different prostate cancer cell

lines: PC3 (androgen-insensitive human prostate carcinoma) LNCaP (androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma) LNCaP^{S12} (LNCaP cells transfected with expression vector pcDNA3 containing the human MnSOD cDNA) and LNCaP^{MOCK} (LNCaP cells transfected with the corresponding empty vector). Cells were grown in the presence of 2-¹³C₁-glucose during 24h as described in the Supporting Information. ¹³C incorporation was observed in sixteen of the twenty-eight metabolites studied. However, only L-alanine, glycine, serine, fumarate and succinate showed significant differences in ¹³C labeling between the different cell lines. The actual mass isotopomer distributions measured by GC-MS for glycine, serine and L-alanine are given in Table S7 in the Supplementary Information (average values for five determinations). From that data, and the data shown in Table S4, the molar fractions from the incorporation of ¹³C in the different metabolites can be calculated. Figure 4 shows the molar fractions obtained for the ¹³C₁-analogue of L-alanine, glycine and serine in the different cell lines. As can be observed, PNT1A and PC3 cell lines showed negligible ¹³C incorporation in glycine whereas the molar fraction for the serine ¹³C₁-analogue was lower than 3% in these two cell lines. However, when analyzing cultures of LNCaP, LNCaP^{S12}, and LNCaP^{MOCK} significant molar fractions of the ¹³C₁-analogue were detected in glycine (close to 10%) and in serine (between 10 and 15%). In the same graph we plotted for comparison the results for L-alanine which showed a high and similar incorporation in all cell lines (between 25 and 35% enrichment).

Previous works have shown that the tumor suppressor protein p53 not only upregulates metabolic targets to inhibit tumorigenesis but also regulates glycolysis and oxidative phosphorylation⁵⁶. More recently, it was demonstrated that serine starvation activates p53 to reprogram metabolism and increase cancer cell survival⁵⁷. After glucose is

converted into 3-phosphoglycerate through glycolysis and shuttled into the serine synthesis pathway, serine is converted into glycine, where p53 is elevated and activates p21 to promote cell-cycle arrest and replenish GSH (glutathione). In this way, conversion to inosine monophosphate (IMP) and resultant purine biosynthesis is suppressed and GSH pools suppress reactive oxygen species (ROS) generated from the TCA cycle^{57,58}. According to this, we should observe a lower glycine production in cells lacking p53 activity (non-functional p53) as they generate IMP instead of replenishing the GMP pools. Similarly, a higher ¹³C incorporation should be observed in p53^{+/+} as glycine and subsequent GSH production is promoted. Figure 4 shows that our results are in agreement with this explanation as PNT1A and PC3 cell lines have non-functional p53 whereas LNCaP, LNCaP^{MOCK}, LNCaP^{S12} are p53^{+/+} (functional p53 gene and protein).

CONCLUSIONS

This work proposes an improved method for accurate and precise determinations of mass isotopomer distributions in intracellular glucose metabolites in cultures of prostate cancer cell lines. Three main aspects justify the novelty of the proposed procedure. First, theoretical isotopic distributions of the different isotopomers are previously calculated using the experimentally measured value of ¹³C enrichment of the substrate (labeled glucose administered to the cell cultures). Secondly, the purity of the selected cluster obtained for each compound in the GC-MS system used in this work is studied to calculate the contribution of different fragmentation mechanism such as the loss or gain of hydrogen atoms in the EI source or the lack of resolution of the mass spectrometer. Using the experimental value for the glucose isotopic enrichment and the correction of the spectral purity of theoretical isotopic patterns of the intracellular metabolites the

proposed procedure is able to correct for systematic errors which are not corrected in previous approaches and improves the accuracy and precision of the final molar fractions obtained from equation (1). The comparison with theoretical values obtained from gravimetrically prepared mixtures of different labeled analogues and with experimental values obtained by GC-C-IRMS based on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio measurements demonstrates the satisfactory accuracy and precision of the proposed procedure. Our results show that the spectral purity of the measured cluster and the number of ^{13}C atoms of the labeled analogue, strongly affect the minimum value of ^{13}C incorporation that can be accurately quantified. Using our experimental conditions the proposed procedure was able to accurately quantify in gravimetrically prepared mixtures of natural and labeled glucose molar fractions of 0.07% in binary and quinary mixtures. Those values are the lowest validated molar fractions ever reported in the literature. In addition, we have shown that the method is able to discriminate between different glucose metabolic routes in prostate cancer cell lines.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project Ref. CTQ2012-36711, co-funded by FEDER. The EU is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS instrument. MFF acknowledges Gobierno del Principado de Asturias through Ficyt (Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología) for the provision of a predoctoral grant in the frame of the Severo Ochoa Program (BP11-162).

REFERENCES

- (1) Warburg, O. *Biochem. Zeitschr.* **1924**, 152, 309-344.
- (2) Galluzi, L; Keep, O; Vander Heiden, MG; Kroemer, G. *Nature Reviews.* **2013**, 12, 829-846.
- (3) DeBerardinis, RJ; Lum, JJ; Hatzivassiliu, G; Thompson, CB. *Cell metabolism.* **2008**, 7, 11-20.
- (4) Barfeld, SJ; Itkonen, HM; Urbanucci, A; Mills, IG. *Endocrine-Related Cancer.* **2014**, 21, 57-66.
- (5) Creek, DJ; Chokkathukalam, A; Jankevics, A; Burgess, KEV; Breitling, R; Barrett, MP. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 8442-8447.
- (6) Lane, AN; Fan, TWN; Higashi, RM. *Life,* **2008**, 60, 124-129.
- (7) Schoenheimer, R; Ratner, S; Rittenberg, D. *J. Biol. Chem.* **1939**, 130, 703-732.
- (8) Schoenheimer, R; Rittenberg, D. *J. Biol. Chem.* **1935**, 111, 175-181
- (9) Washburn, W; Urey, HC. *Proc. N. A. S.* **1932**, 18, 496
- (10) Urey, HC; Huffman, JR; Thode, HG; Fox, M. **1937**, 5, 856.
- (11) Spencer, H; Eisinger, R; Laszlo, D. *Am. J. Cancer. Res.* **1958**, 282-296
- (12) Wang, CH; Stern, I; Gilmour, CM; Klungsoyr, S, Braly, JJ; Christensen BE; Cheldelin, VH. *J. Bacteriol.* **1958**, 76, 207-216.
- (13) Brazier, JL; Ribon, B; Desage, M; Salle, B. *Biomed.* **1980**, 7, 189-192.
- (14) Leonard, JU; Heales, SJR. *Eur. J. Pediatr.* **1994**, 1, 581-593.
- (15) Bier, DM; Arnold, KJ; Sherman, WR; Holland, WH; Holmes, WF; Kipnis, DM. *Diabetes.* **1977**, 26, 1005-1015.
- (16) Tang, JKH; You, L; Blankenship, RE; Tang, YJ. *J. R. Soc. Interface.* **2012**, 9, 2767-2780.
- (17) Bogoard, IW; Lin, TS; Liao, JC. *Nature,* **2013**, 502, 693-697.
- (18) Metallo, CM; Vander Heiden, MG. *Mol. Cell.* **2013**, 49, 388-398.
- (19) Iwatani, S; Van Dien, S; Shimbo, K; Kubota, K; Kageyama, N; Iwahata, D; Miyano, H; Hirayama, K; Usuda, Y; Shimizu, K; Matsui, K. *J. Biotechnol,* **2007**, 128, 93-111.
- (20) Antoniewicz, MR; Keheller, JK; Stephanopoulos, G. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 7554-7559.
- (21) Antoniewicz, MR; Keheller, JK; Stephanopoulos, G. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3211-3216.

- (22) Cipollina, C; Ten Pierick, A; Canelas, AB; Seifar, RM; Van Maris, AJA; Van Dam, JC; Heijnen, JJ. *J. Chromatogr. B.* **2009**, 877, 3231-3236.
- (23) Koubaa, M; Mghaieth, S; Thomasset, B; Roscher, A. *Anal. Biochem.* **2012**, 45, 183-188.
- (24) Leighty, RW; Antoniewicz, MR. *Metab. Eng.* **2012**, 14, 533-541.
- (25) Chatman, JC; Bouchard, B; Des Rosiers, C. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, 249, 105-112.
- (26) Kleijn, RJ; Geertman, JM; Nfor, BK; Ras, C; Schipper, D; Pronk, JT; Heijnen, JJ; Van Maris, AJ; Van Winden, WA. *FEM. Yeast. Res.* **2007**, 7, 216-231.
- (27) Choi, J; Antoniewicz, MR. *Metab. Eng.* **2011**, 13, 225-233.
- (28) Yuan, Y; Yang, TM; Heinzle, E. *Meta. Eng.* **2010**, 12, 392-400.
- (29) Ahn, WS; Antoniewicz, MR. *Meta. Eng.* **2011**, 13, 598-609.
- (30) Di Donato, L; Des Rosiers, C; Montgomery, JA; David, F; Garneau, M; Brunengraber, H. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4170-4180.
- (31) Des Rosiers, C; Di Donato, L; Comte, B; Laplante, A; Marcoux, C; David, F; Fernandez, CA; Brunengraber, H. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 10027-10036.
- (32) Katz, J; Wals, P; Paul-Lee, WN. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 25509-25521.
- (33) Chatham, JC; Bouchard, B; Des Rosiers, C. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, 249, 105-112.
- (34) Jung, JY; Oh, MK. *J. Chromatogr. B.* **2015**, 974, 101-108.
- (35) Yang, TH; Bolten, CJ; Coppi, MV, Sun, J; Heinzle, E. *Anal. Biochem.* **2009**, 388, 192-203.
- (36) Biemann, K, *Mass Spectrometry*, Chapt. 5. McGraw-Hill. **1962**.
- (37) Fernandez, CA; Des Rosiers, C; Previs, SF. *J. Mass. Spectrom.* **1996**, 31, 255-262
- (38) Des Rosiers, C; Montgomery, JA; Desrochers, S; Garneau, M; Mamer, OA; Brunengraber, H. *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 96-105.
- (39) Brauman, JI. *Anal. Chem.* **1966**, 38, 607-610.
- (40) Paul Lee, WN; Byerley, LO; Bergner, EA. *Biol. Mass. Spectrom.* **1991**, 20, 451-458.
- (41) Jennings, ME; Matthews, DE. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6435-6444.
- (42) Christensen, B; Nielsen, J. *Meta. Eng.* **1999**, 1, 282-290.
- (43) Kiefer, P; Nicolas, C; Letisse, F; Portais, JC. *Anal. Biochem.* **2007**, 360, 182-188.
- (44) Jeffrey, MH; Roach, JW; Storey, CJ; Sherry, D; Malloy, CR. *Anal. Biochem.* **2002**, 300, 192-195.

- (45) Rühl, M; Rupp, B; Nöh, K; Wiechert, W; Sauer, W; Zamboni, N. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 109, 763-771.
- (46) Choi, J; Grossbach, MT; Antoniewicz, MR. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4628-4632.
- (47) Sellick, CA; Hansen, R; Stephens, GM; Goodacre, R, Dickson, AJ. *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 1241-1249.
- (48) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P. “Isotope Dilution Mass Spectrometry”. Royal Society of Chemistry, **2013**, Cambridge (UK)
- (49) García-Alonso, JI; Rodríguez-González, P; González-Gago, A; González-Antuña, A. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 664, 68-76.
- (50) Garcia-Alonso, JI; Rodriguez-González, P. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 694, 177-180.
- (51) Kubinyi, H; *Anal. Chim. Acta.* **1991**, 247, 107-119.
- (52) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49, 681-691.
- (53) Mejía, J; Caruso, JA. *J. Am. Soc. Mass. Spectrum.* **2004**, 15, 654-658.
- (54) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G; García Alonso, J.I. *Analyst.* **2010**, 135, 953-964.
- (55) Kragten, J. *Analyst.* **1994**, 119, 2161-2165.
- (56) Gottlieb, E., Vousden, K.H. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010** 2, a001040
- (57) Maddocks O.D., Berkers C.R., Mason S.M., Zheng L., Blyth K., Gottlieb E., Vousden K.H. *Nature* **2013**, 493, 542-546
- (58) Tavana O., Gu W. *Cell Metabolism* **2013**, 17, 159-161.

TABLES

Table 1. Comparison of the theoretical molar fractions with experimental molar fractions calculated by the proposed methodology in different gravimetrically prepared mixtures of natural glycine and labeled glycine.

Mixtures of natural glycine and glycine-2- ¹³ C ₁		X _{nat} (%)	X ¹³ C ₁ (%)	
1	Theoretical	99.03±0.01	0.97±0.01	
	Experimental	99.05±0.38	1.12±0.32	
2	Theoretical	90.34±0.11	9.66±0.11	
	Experimental	90.48±0.30	9.96±0.26	
3	Theoretical	80.41±0.21	19.59±0.21	
	Experimental	80.73±0.17	19.64±0.10	
4	Theoretical	75.63±0.24	24.37±0.24	
	Experimental	75.92±0.15	24.64±0.08	
5	Theoretical	50.69±0.33	49.31±0.33	
	Experimental	51.15±0.06	49.64±0.04	
Mixtures of natural glycine and glycine- ¹³ C ₂		X _{nat} (%)	X ¹³ C ₂ (%)	
1	Theoretical	99.11±0.01	0.89±0.01	
	Experimental	99.16±0.01	0.86±0.02	
2	Theoretical	91.02±0.10	8.98±0.10	
	Experimental	91.14±0.06	9.00±0.02	
3	Theoretical	80.14±0.18	19.86±0.18	
	Experimental	80.81±0.23	19.93±0.29	
4	Theoretical	76.32±0.21	23.68±0.21	
	Experimental	76.42±0.05	23.61±0.02	
5	Theoretical	52.39±0.29	47.61±0.29	
	Experimental	52.54±0.17	47.88±0.15	
Mixtures of natural glycine, glycine-2- ¹³ C ₁ and glycine- ¹³ C ₂		X _{nat} (%)	X ¹³ C ₁ (%)	X ¹³ C ₂ (%)
1	Theoretical	98.16±0.02	0.96±0.01	0.88±0.01
	Experimental	98.34±0.24	0.92±0.24	0.91±0.11
2	Theoretical	90.95±0.09	4.55±0.06	4.50±0.05
	Experimental	91.01±0.19	4.73±0.14	4.43±0.22
3	Theoretical	81.23±0.17	9.70±0.11	9.06±0.09
	Experimental	81.38±0.08	9.86±0.07	9.11±0.04
4	Theoretical	61.50±0.26	19.92±0.19	18.58±0.15
	Experimental	61.88±0.12	20.10±0.18	18.43±0.10
5	Theoretical	20.93±0.18	40.72±0.26	38.35±0.23
	Experimental	20.99±0.01	41.04±0.04	38.61±0.04

Table 2. Comparison of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios obtained by GC-C-IRMS with those obtained applying equation (1) and equation (3) for the intracellular metabolites serine, malate, L-aspartate and L-glutamate in cultures of four different cell lines: PNT1A, PC3, LNCaP and LNCaP^{MOCK}.

Compound	Cell Line	Molar Fractions				$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratio		$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratio
		Xnat (%)	$\bar{X}^{13}\text{C}_1$ (%)	$\bar{X}^{13}\text{C}_2$ (%)	$\bar{X}^{13}\text{C}_3$ (%)	GC-MS	GC-C-IRMS	
Serine	PNT1A	91.69±0.90	8.02±0.86	0.22±0.24	0.12±0.21	0.0150±0.0004	0.0153±0.0003	
	LNCaP	78.43±0.54	20.61±0.43	1.16±0.09	----	0.0218±0.0003	0.0224±0.0009	
	PC3	96.27±0.61	4.77±0.25	0.07±0.58	----	0.0130±0.0002	0.0132±0.0006	
	LNCaP ^{MOCK}	88.43±0.61	10.77±0.57	0.78±0.10	0.06±0.04	0.0214±0.0002	0.0217±0.0018	
Malate	PNT1A	86.85±0.99	12.02±1.00	0.91±0.40	0.11±0.06	0.0176±0.0008	0.0176±0.0004	
	LNCaP	70.73±0.84	25.79±0.85	2.68±0.25	----	0.0260±0.0004	0.0261±0.0003	
	PC3	64.39±0.58	32.99±1.69	3.45±0.41	----	0.0290±0.0020	0.0296±0.0005	
	LNCaP ^{MOCK}	86.37±0.93	12.88±0.90	0.84±0.20	----	0.0231±0.0030	0.0248±0.0015	
L-Aspartate	PNT1A	89.20±0.79	9.84±0.52	0.80±0.22	0.03±0.07	0.0160±0.0006	0.0158±0.0005	
	LNCaP	72.96±0.91	24.40±0.95	2.02±0.23	0.05±0.06	0.0241±0.0005	0.0252±0.0012	
	PC3	67.61±11.20	29.14±0.98	4.38±1.53	----	0.0271±0.0010	0.0289±0.0019	
	LNCaP ^{MOCK}	89.04±0.80	9.95±0.83	0.41±0.08	----	0.0220±0.0003	0.0228±0.0012	
L-Glutamate	PNT1A	85.17±0.90	13.84±0.75	1.11±0.18	0.04±0.04	0.0177±0.0003	0.0184±0.0004	
	LNCaP	64.24±0.91	29.81±0.56	5.51±0.33	0.19±0.04	0.0293±0.0006	0.0310±0.0011	
	PC3	55.38±0.63	35.82±0.77	8.53±0.17	0.34±0.16	0.0349±0.0001	0.0349±0.0011	
	LNCaP ^{MOCK}	87.36±1.21	11.27±1.06	1.10±0.20	----	0.0239±0.0002	0.0249±0.0008	

FIGURES

Figure 1. Comparison between the theoretical molar fractions (%) with the experimental molar fraction determined by the proposed methodology in different gravimetrically prepared mixtures of natural glucose and D-glucose-2- $^{13}\text{C}_1$, D-glucose-1,2- $^{13}\text{C}_2$, D-glucose-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ and D-glucose- $^{13}\text{C}_6$. The line corresponds to a slope of 1 (perfect agreement).

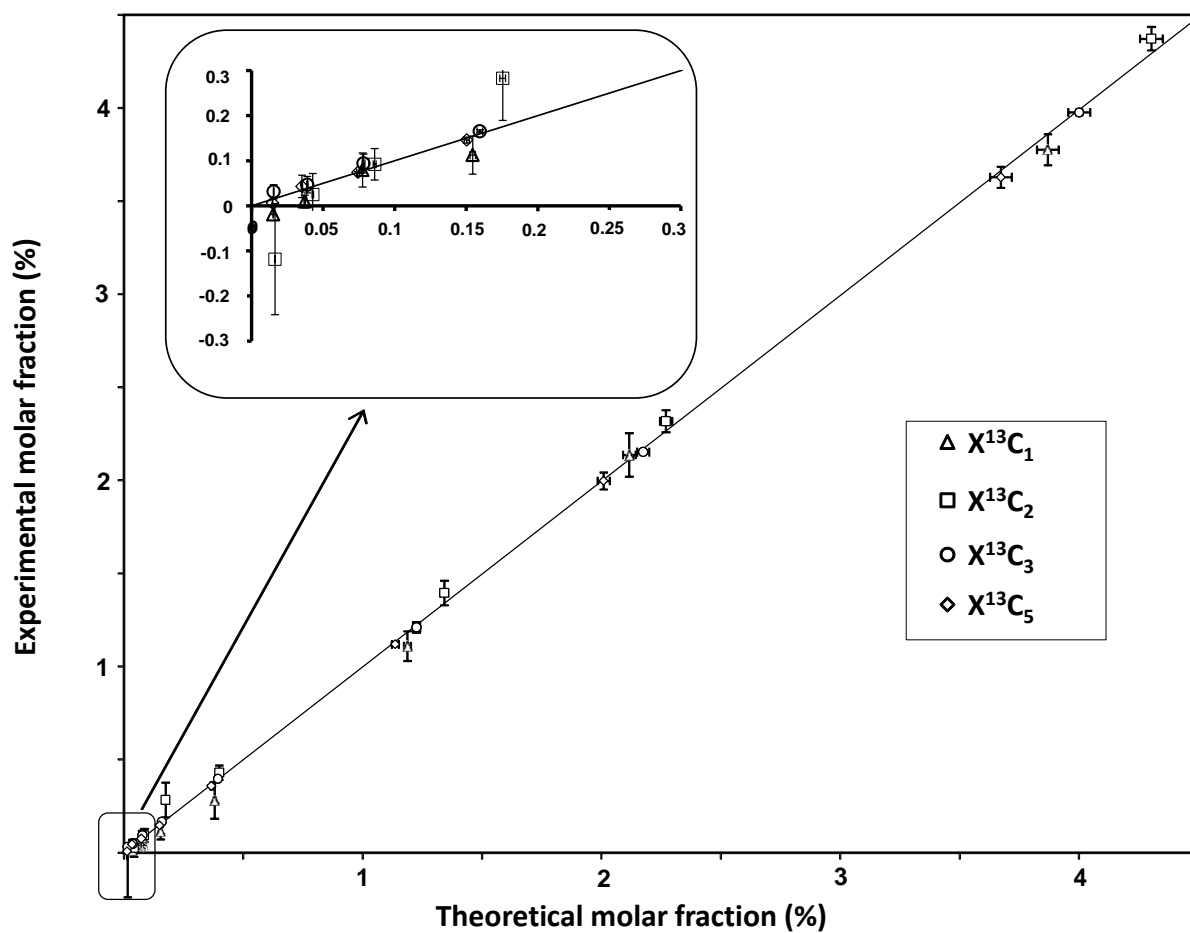


Figure 2. Comparison of the theoretical molar fraction with experimental molar fraction calculated by the proposed methodology in different gravimetrically prepared mixtures of a) natural glucose and D-glucose-2- $^{13}\text{C}_1$ and b) natural glucose and D-glucose- $^{13}\text{C}_6$.

The line corresponds to a slope of 1 (perfect agreement)

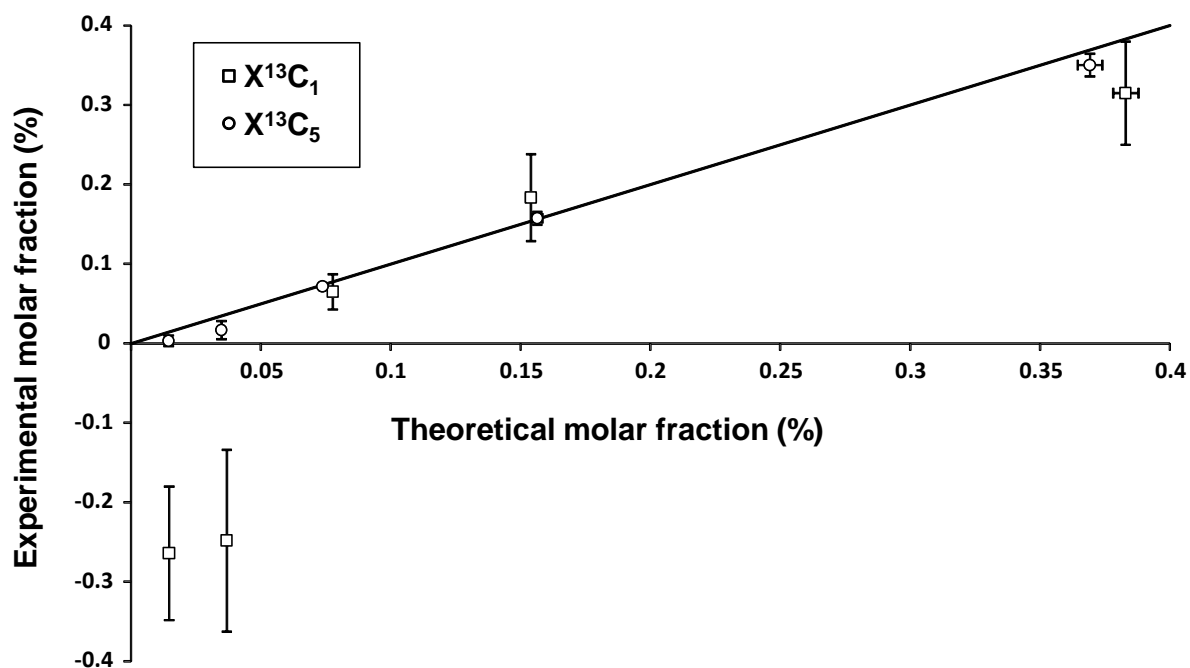


Figure 3. Comparison of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios obtained by GC-C-IRMS with those obtained by GC-MS applying equation (1) and equation (3) for the ten mixtures of Table S5 containing natural abundance D-glucose, D-glucose-2- $^{13}\text{C}_1$, D-glucose-1,2- $^{13}\text{C}_2$, D-glucose-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ and D-glucose- $^{13}\text{C}_6$.

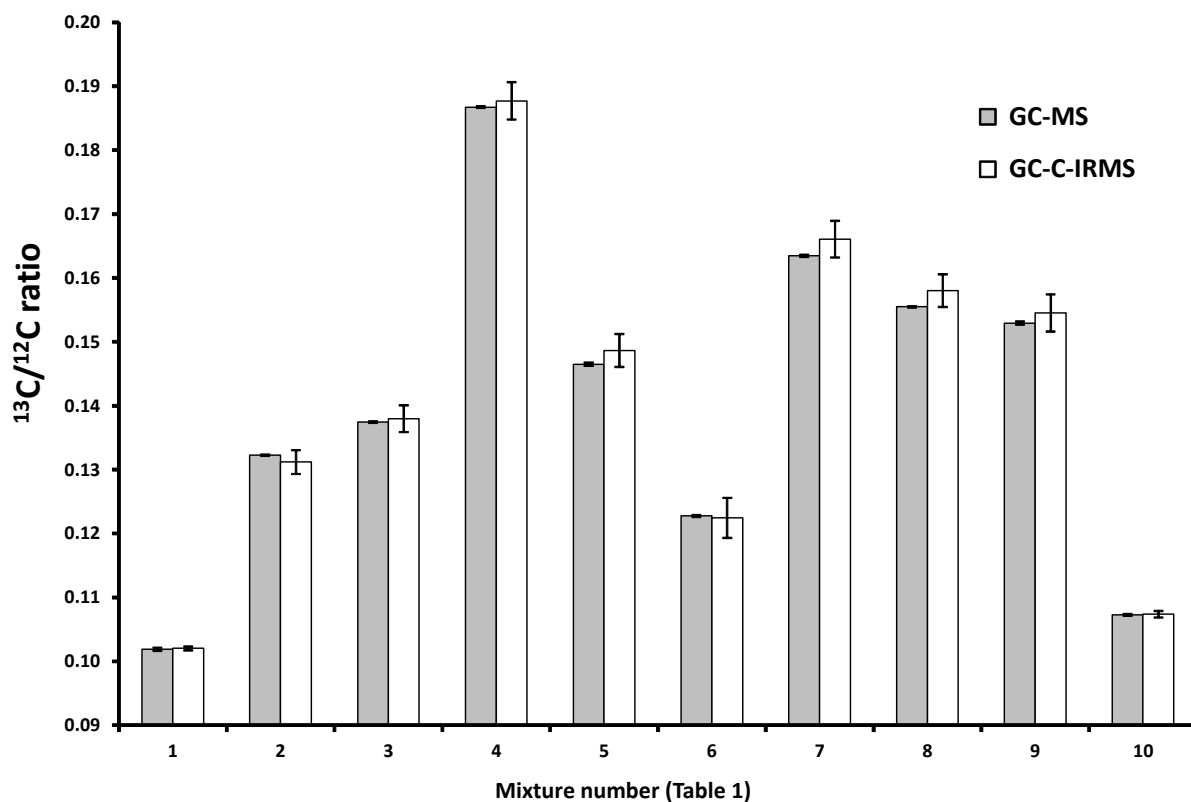
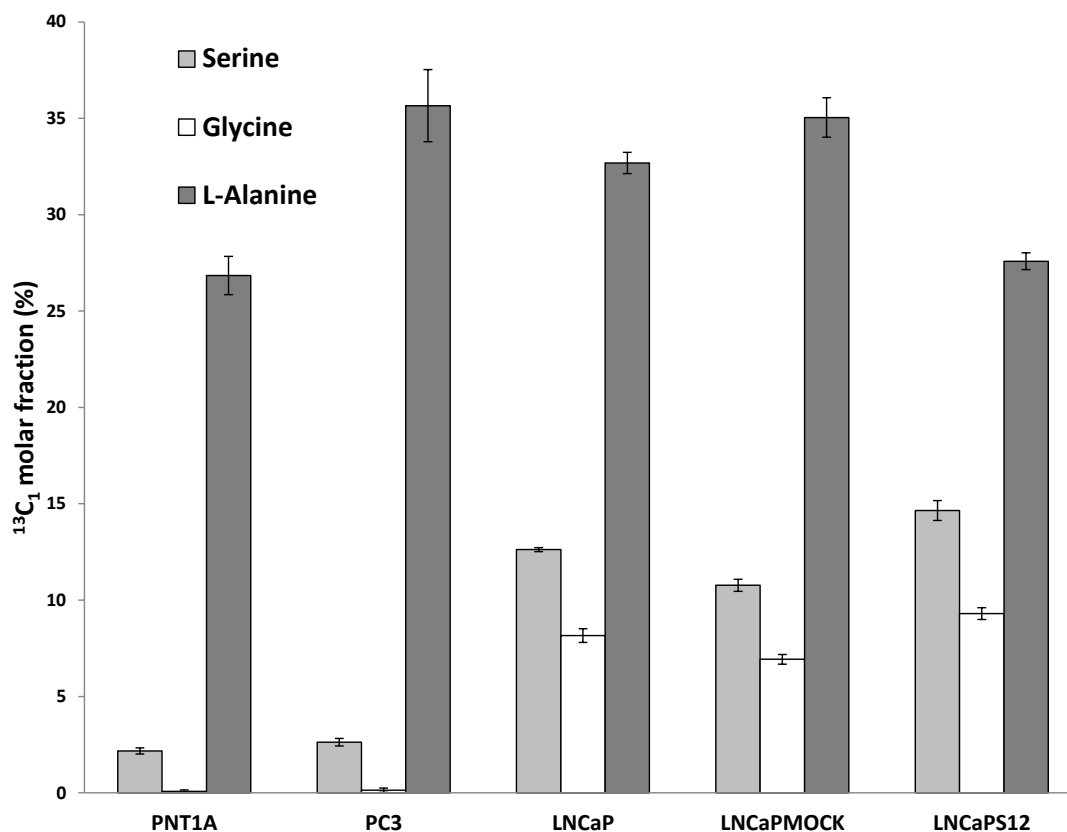


Figure 4: Molar fraction for the $^{13}\text{C}_1$ -analogue of serine, glycine and L-alanine measured in cell cultures of normal human prostate epithelium PNT1A cells and four different prostate cancer cell lines: PC3, LNCaP, LNCaP^{S12}, and LNCaP^{MOCK}.



SUPPLEMENTARY INFORMATION

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MEASUREMENT PROCEDURE FOR MASS ISOTOPOMER DISTRIBUTION ANALYSIS OF INTRACELULAR METABOLITES IN PROSTATE CANCER CELL LINES BY MULTIPLE LINEAR REGRESSION AND GC-MS.

Mario Fernández-Fernández^a, Pablo Rodríguez-González^{*a}, David Hevia Sánchez^b, Pedro González-Menéndez^b, Rosa M^a Sainz Menéndez^b, J. Ignacio García Alonso^a.

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

^b*University Institute of Oncology (IUOPA), University of Oviedo. Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain.*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

Number of pages: 11
Number of Figures: 0
Number of Tables: 7

PROCEDURES

Cell culture growth

Normal human prostate epithelium PNT1A cells, androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma LNCaP cells, androgen-insensitive human prostate carcinoma PC3 cells, LNCaP^{S12} cells (LNCaP cells transfected with expression vector pcDNA3 containing the human MnSOD cDNA) and LNCaP^{MOCK} cells (LNCaP cells transfected with the corresponding empty vector) were maintained in RPMI 1640, or DMEM/F12 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 2 mM L-Glutamine, 15 mM HEPES and an antibiotic-antimycotic cocktail containing 100 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B. All cell lines were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was changed every 2 days and cultures were split at least once a week. Before each experiment, near-confluent cultures were harvested by brief trypsinization and seeded at a density of 25,000 cell/ml on 60 mm dishes and allowed to attach overnight before treatments. Then, media was replaced, cells were washed with DPBS and media with 2g/L of 2-¹³C₁-glucose were added during 24h. After treatments, cells were washed twice with ice-cold DPBS and harvested by cell scraping briefly at room temperature and pelleted by centrifugation at 500 g for 5 min at 4°C. Each sample was kept frozen at -80°C until processing.

Extraction of intracellular metabolites

Intracellular metabolites were extracted from pelleted cells by a double extraction with 100% methanol at -80°C followed by a single extraction with milli-Q water⁴⁷. The frozen pellet cells were resuspended in 500 µL of methanol at -80°C, snap-frozen in liquid nitrogen and thawed in a mixture of liquid nitrogen-acetone to about -80°C. After vortexing for 30 s and pelleting by centrifugation at 800g for 1 min, the supernatant was

transferred to a fresh microcentrifuge tube on liquid nitrogen-acetone mixture at -80°C . The pellet cells were again resuspended in $500\ \mu\text{L}$ of methanol at -80°C and the freeze-thaw-vortex-pellet cycle was repeated. The supernatant was transferred and pooled with the previous methanol extract at -80°C . Finally, the cell pellet was resuspended in $250\ \mu\text{L}$ of milli-Q water, and the freeze-thaw cycle was repeated for a last time. The cells were then vortexed for 30s and pelleted by centrifugation at $15000g$ for 1 min. The supernatant was removed and pooled with the previously pooled methanol extracts. The pooled supernatant fractions were centrifuged at $15000g$ for 1 min in order to remove cell debris. Then, the supernatant was transferred to a fresh tube using a Pasteur pipette and evaporated to dryness at 30°C in a centrifugal vacuum concentrator. Dried intracellular metabolites were kept at -80°C prior derivatization and GC-MS analysis.

Derivatization of intracellular metabolites

The extracted metabolites were dissolved in $100\ \mu\text{L}$ of 2% methoxyamine hydrochloride in pyridine and incubated at 40°C for 8 min on a thermomixer compact. Next, $150\ \mu\text{L}$ of a mixture of N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide and 1% tert-Butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) was added and the samples were incubated for 10 min at 60°C . The derivatized samples were centrifuged for 2 min at $14000\ g$ to remove debris and the clear liquid was transferred into a GC vial for GC-MS analysis.

Derivatization and GC-MS determination of glucose

^{13}C -labeling of glucose in the medium cell culture was determined by GC-MS analysis of the aldonitrile pentapropionate derivative of glucose. For this purpose, $100\ \mu\text{L}$ of medium was evaporated to dryness at 30°C in a centrifugal vacuum concentrator. Next, $100\ \mu\text{L}$ of hydroxylamine hydrochloride solution ($20\ \text{mg/mL}$ in pyridine) was added to the samples. The samples were incubated at 90°C for 8 min, followed by addition of

150 μL of propionic anhydride. After 10 min incubation at 60°C , the samples were evaporated to dryness at 50°C , dissolved in 100 μL of ethyl acetate and transferred into GC vials for GC-MS analysis.

Table S1. Identity, fragment ion formula and m/z range measured by GC-MS in SIM mode for all the intracellular metabolites identified in this work.

Metabolite	Selected in-source fragment ion formula	Measured cluster (m/z)
Aminoacids		
L-Proline	C ₁₃ H ₂₈ NO ₂ Si ₂	284-293
L-Methionine	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂ S	318-327
L-Lysine	C ₂₀ H ₄₇ N ₂ O ₂ Si ₃	429-438
L-Cysteine	C ₁₇ H ₄₀ NO ₂ Si ₃ S	404-413
L-Tyrosine	C ₂₃ H ₄₄ NO ₃ Si ₃	464-476
L-Glutamate	C ₁₉ H ₄₂ NO ₄ Si ₃	430-439
L-Valine	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	286-295
L-Aspartate	C ₁₈ H ₄₀ NO ₄ Si ₃	416-425
L-Leucine	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	300-309
L-Isoleucine	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	300-309
L-Phenylalanine	C ₁₇ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	334-346
Glycine	C ₁₀ H ₂₄ NO ₂ Si ₂	244-253
L-Serine	C ₁₇ H ₄₀ NO ₃ Si ₃	388-397
L-Threonine	C ₁₈ H ₄₂ NO ₃ Si ₃	402-411
L-Alanine	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	258-267
β-Alanine	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	258-267
Small metabolites		
Urea	C ₉ H ₂₃ N ₂ O ₂ Si ₂	229-238
Succinate	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ Si ₂	287-296
Fumarate	C ₁₂ H ₂₃ O ₄ Si ₂	285-294
Malate	C ₁₈ H ₃₉ O ₅ Si ₃	417-426
Citrate	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ Si ₃	457-466
Lactate	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂	259-268
Ribulose 5P	C ₁₃ H ₂₈ O ₇ Si ₂ P	381-390
Fatty acids		
Lauric acid	C ₁₄ H ₂₉ O ₂ Si	255-264
Myristic acid	C ₁₆ H ₃₃ O ₂ Si	283-292
Palmitic acid	C ₁₈ H ₃₇ O ₂ Si	311-320
Stearic acid	C ₂₀ H ₄₁ O ₂ Si	339-348
Cholesterol	C ₂₉ H ₅₁ O ₂ Si	441-450

Table S2. Spectral purity of the selected clusters for the identified intracellular metabolites in the electron ionization source (EI).

Metabolite	Molecular range of cluster (m/z)	Fragment formula	X _{M+}	X _{M-H+}	X _{M-2H+}	X _{M+H+}
Aminoacids						
L-Proline	284-293	C ₁₃ H ₂₈ NO ₂ Si ₂	99.35±0.20	0.29±0.03	0.55±0.08	-----
L-Methionine	318-327	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂ S	99.84±0.08	0.13±0.01	0.21±0.01	-----
L-Lysine	429-438	C ₂₀ H ₄₇ N ₂ O ₂ Si ₃	97.56±0.06	1.76±0.04	0.68±0.11	-----
L-Cysteine	404-413	C ₁₇ H ₄₀ NO ₂ Si ₃ S	100.05±0.02	-----	-----	-----
L-Tyrosine	464-476	C ₂₃ H ₄₄ NO ₃ Si ₃	99.56±0.05	0.16±0.01	0.44±0.08	-----
L-Glutamate	430-439	C ₁₉ H ₄₂ NO ₄ Si ₃	99.55±0.31	0.09±0.01	0.16±0.01	-----
L-Valine	286-295	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	99.21±0.07	0.45±0.13	0.17±0.02	-----
L-Aspartate	416-425	C ₁₈ H ₄₀ NO ₄ Si ₃	99.46±0.27	0.21±0.02	0.26±0.07	-----
L-Leucine	300-309	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	99.14±0.14	0.22±0.02	0.20±0.03	0.24±0.04
L-Isoleucine	300-309	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	99.45±0.05	0.22±0.01	0.13±0.01	0.18±0.06
L-Phenylalanine	334-346	C ₁₇ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	99.43±0.19	0.19±0.02	0.26±0.03	-----
Glycine	244-253	C ₁₀ H ₂₄ NO ₂ Si ₂	97.59±0.57	0.49±0.04	0.12±0.02	1.70±0.42
L-Serine	388-397	C ₁₇ H ₄₀ NO ₃ Si ₃	99.10±0.23	0.25±0.03	0.40±0.08	-----
L-Threonine	402-411	C ₁₈ H ₄₂ NO ₃ Si ₃	99.82±0.04	0.34±0.01	0.26±0.02	-----
L-Alanine	258-267	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	99.82±0.11	0.20±0.02	-----	-----
β-Alanine	258-267	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	96.93±0.09	0.10±0.01	2.90±0.09	-----
Small metabolites						
Urea	229-238	C ₉ H ₂₃ N ₂ O ₂ Si ₂	99.49±0.10	0.16±0.01	0.03±0.01	0.24±0.09
Succinate	287-296	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ Si ₂	99.51±0.18	0.13±0.01	0.07±0.01	0.24±0.08
Fumarate	285-294	C ₁₂ H ₂₃ O ₄ Si ₂	98.64±0.31	0.37±0.16	0.04±0.03	0.94±0.18
Malate	417-426	C ₁₈ H ₃₉ O ₅ Si ₃	99.96±0.05	0.14±0.01	0.21±0.01	-----
Citrate	457-466	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ Si ₃	99.60±0.20	0.20±0.01	0.20±0.01	-----
Lactate	259-268	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂	99.87±0.08	0.13±0.03	-----	-----
Ribulose 5P	381-390	C ₁₃ H ₂₈ O ₇ Si ₂ P	91.70±0.60	0.10±0.01	0.10±0.01	6.20±0.60
Fatty acids						
Lauric acid	255-264	C ₁₄ H ₂₉ O ₂ Si	99.52±0.07	0.25±0.04	0.33±0.04	-----
Myristic acid	283-292	C ₁₆ H ₃₃ O ₂ Si	99.55±0.05	0.04±0.01	0.46±0.03	-----
Palmitic acid	311-320	C ₁₈ H ₃₇ O ₂ Si	98.36±0.19	0.05±0.01	0.50±0.03	0.86±0.17
Stearic acid	339-348	C ₂₀ H ₄₁ O ₂ Si	97.59±0.19	0.04±0.01	0.65±0.02	1.56±0.20
Cholesterol	441-450	C ₂₉ H ₅₁ O ₂ Si	95.89±0.19	0.33±0.05	0.46±0.04	2.34±0.21

Table S3. Theoretical abundance for the three studied metabolites.

Compound	Theoretical abundances			
<i>Glycine (m/z)</i>	Nat	¹³ C ₁	¹³ C ₂	¹³ C ₃
244	0.0000	0.0000	0.0000	---
245	0.0000	0.0000	0.0000	---
246	0.7553	0.0041	0.0000	---
246	0.1638	0.7601	0.0084	---
247	0.0690	0.1568	0.7649	---
248	0.0099	0.0677	0.1497	---
249	0.0017	0.0092	0.0665	---
250	0.0001	0.0016	0.0085	---
251	0.0000	0.0001	0.0015	---
252	0.0000	0.0000	0.0001	---
<i>Serine (m/z)</i>	nat	¹³ C ₁	¹³ C ₂	¹³ C ₃
388	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
389	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
390	0.6433	0.0035	0.0000	0.0000
391	0.2223	0.6479	0.0071	0.0000
392	0.1038	0.2170	0.6524	0.0108
393	0.0238	0.1021	0.2117	0.6569
394	0.0055	0.0228	0.1005	0.2062
395	0.0008	0.0053	0.0219	0.0989
396	0.0001	0.0008	0.0051	0.0210
397	0.0000	0.0001	0.0007	0.0049
<i>L-Alanine (m/z)</i>	nat	¹³ C ₁	¹³ C ₂	¹³ C ₃
258	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
259	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
260	0.7470	0.0072	0.0000	0.0000
261	0.1702	0.7494	0.0145	0.0002
262	0.0700	0.1630	0.7517	0.0218
263	0.0105	0.0684	0.1557	0.7538
264	0.0018	0.0098	0.0669	0.1484
265	0.0001	0.0017	0.0091	0.0655
266	0.0000	0.0001	0.0016	0.0084
267	0.0000	0.0000	0.0001	0.0015

Table S4. Theoretical abundance for the three studied metabolites calculated taking into account the spectral purity of the selected clusters.

Compound	Theoretical abundances			
<i>Glycine (m/z)</i>	Nat	¹³C₁	¹³C₂	¹³C₃
244	0.0009	0.0000	0.0000	---
245	0.0038	0.0009	0.0000	---
246	0.7379	0.0080	0.0009	---
246	0.1730	0.7427	0.0121	---
247	0.0702	0.1663	0.7474	---
248	0.0108	0.0688	0.1594	---
249	0.0018	0.0101	0.0675	---
250	0.0001	0.0017	0.0095	---
251	0.0000	0.0001	0.0016	---
252	0.0000	0.0000	0.0001	---
<i>Serine (m/z)</i>	nat	¹³C₁	¹³C₂	¹³C₃
388	0.0025	0.0000	0.0000	0.0000
389	0.0024	0.0025	0.0000	0.0000
390	0.6385	0.0059	0.0026	0.0000
391	0.2206	0.6430	0.0095	0.0027
392	0.1030	0.2154	0.6475	0.0131
393	0.0236	0.1013	0.2101	0.6519
394	0.0055	0.0227	0.0997	0.2047
395	0.0008	0.0053	0.0217	0.0981
396	0.0001	0.0008	0.0051	0.0208
397	0.0000	0.0001	0.0007	0.0049
<i>L-Alanine (m/z)</i>	nat	¹³C₁	¹³C₂	¹³C₃
258	0	0	0	0
259	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000
260	0.7460	0.0056	0.0000	0.0000
261	0.1701	0.7508	0.0098	0.0002
262	0.0699	0.1632	0.7555	0.0233
263	0.0105	0.0686	0.1563	0.7527
264	0.0018	0.0098	0.0673	0.1482
265	0.0001	0.0017	0.0091	0.0654
266	0.0000	0.0001	0.0016	0.0084
267	0.0000	0.0000	0.0001	0.0015

Table S5. Comparison of the theoretical molar fractions (%) with experimental molar fractions calculated by the proposed methodology in different gravimetrically prepared mixtures of natural Glucose and D-Glucose-2-¹³C₁, D-Glucose-1,2-¹³C₂, D-Glucose-1,2,3-¹³C₃ and D-Glucose-¹³C₆.

Mixtures of natural Glucose and labelled Glucoses		X _{nat} (%)	X ¹³ C ₁ (%)	X ¹³ C ₂ (%)	X ¹³ C ₃ (%)	X ¹³ C ₅ (%)
1	Theoretical	18.81±0.14	37.07±0.25	20.82±0.20	14.67±0.13	8.63±0.10
	Experimental	18.82±0.02	37.06±0.05	20.75±0.11	14.74±0.10	8.67±0.06
2	Theoretical	18.44±0.14	13.71±0.13	41.15±0.37	9.67±0.09	17.03±0.18
	Experimental	18.49±0.06	13.74±0.06	41.15±0.07	9.68±0.01	17.07±0.04
3	Theoretical	18.81±0.14	18.43±0.14	10.43±0.10	39.44±0.25	12.90±0.20
	Experimental	18.82±0.03	18.50±0.07	10.45±0.03	39.47±0.05	12.91±0.05
4	Theoretical	19.23±0.15	9.35±0.09	16.01±0.16	19.87±0.17	35.54±0.37
	Experimental	19.30±0.09	9.44±0.05	16.10±0.09	19.92±0.09	35.58±0.03
5	Theoretical	18.79±0.14	18.58±0.16	21.08±0.20	19.84±0.17	21.71±0.23
	Experimental	18.90±0.12	18.60±0.05	21.07±0.04	19.90±0.07	21.75±0.06
6	Theoretical	18.62±0.14	23.03±0.19	25.90±0.24	19.52±0.16	12.94±0.14
	Experimental	18.70±0.10	22.99±0.08	25.92±0.07	19.57±0.05	12.90±0.04
7	Theoretical	18.46±0.14	---	31.08±0.29	28.96±0.22	21.50±0.23
	Experimental	18.50±0.08	0.07±0.02	31.14±0.09	29.08±0.14	21.42±0.15
8	Theoretical	19.35±0.15	28.75±0.23	---	25.13±0.20	26.77±0.29
	Experimental	19.41±0.09	28.76±0.18	0.03±0.03	25.27±0.14	26.79±0.03
9	Theoretical	19.09±0.15	23.47±0.20	26.60±0.26	---	30.83±0.33
	Experimental	19.18±0.11	23.55±0.09	26.69±0.18	-0.04±0.02	30.87±0.05
10	Theoretical	18.06±0.14	13.53±0.13	35.36±0.33	33.05±0.24	---
	Experimental	18.06±0.04	13.43±0.11	35.34±0.04	33.07±0.12	0.08±0.01

Table S6. Comparison of the theoretical molar fraction with experimental molar fraction calculated by the proposed methodology in different gravimetrically prepared mixtures of natural Glycine and Glycine-2-¹³C and natural Glycine Glycine-¹³C₂.

Mixtures of natural Glycine and Glycine-2-¹³C		X¹³C₁ (%)
1	Theoretical	0.7094±0.0093
	Experimental	0.6852±0.0563
2	Theoretical	0.4750±0.0063
	Experimental	-1.2912±0.0047
3	Theoretical	0.2376±0.0031
	Experimental	-1.5389±0.0054
4	Theoretical	0.0962±0.0013
	Experimental	-1.7145±0.0109
Mixtures of natural Glycine and Glycine-¹³C₂		X¹³C₂ (%)
1	Theoretical	0.6694±0.0079
	Experimental	0.6752±0.0634
2	Theoretical	0.4592±0.0054
	Experimental	0.0823±0.0060
3	Theoretical	0.0900±0.0026
	Experimental	-0.1413±0.0287
4	Theoretical	0.0900±0.0011
	Experimental	-0.2737±0.0047

Table S7. Experimental abundances measured for the three studied metabolites in the PNT1A, LNCaP, PC3, LNCaP^{MOCK} and LNCaP^{S12} cell lines.

Compound	Experimental abundances				
	PNT1A	LNCaP	PC3	LNCaP^{MOCK}_K	LNCaP^{S12}
<i>Glycine (m/z)</i>					
244	0.0114	0.0016	0.0110	0.0015	0.0011
245	0.0072	0.0034	0.0060	0.0032	0.0042
246	0.7040	0.6166	0.7054	0.6372	0.6504
246	0.1875	0.2664	0.1869	0.2505	0.2388
247	0.0712	0.0860	0.0720	0.0833	0.0824
248	0.0150	0.0213	0.0140	0.0198	0.0188
249	0.0025	0.0036	0.0033	0.0034	0.0032
250	0.0008	0.0007	0.0007	0.0006	0.0006
251	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001
252	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Serine (m/z)</i>					
388	0.0042	0.0019	0.0000	0.0020	0.0017
389	0.0029	0.0035	0.0000	0.0035	0.0028
390	0.5865	0.4994	0.6118	0.5053	0.5231
391	0.2541	0.3067	0.2433	0.3034	0.2932
392	0.1135	0.1334	0.1111	0.1311	0.1280
393	0.0301	0.0420	0.0282	0.0417	0.0392
394	0.0070	0.0103	0.0054	0.0103	0.0093
395	0.0012	0.0020	0.0000	0.0020	0.0019
396	0.0000	0.0003	0.0000	0.0003	0.0003
397	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>L-Alanine (m/z)</i>					
258	0.0022	0.0019	0.0016	0.0015	0.0019
259	0.0068	0.0037	0.0060	0.0033	0.0048
260	0.5369	0.5030	0.5059	0.4657	0.5220
261	0.3265	0.3563	0.3928	0.3736	0.3297
262	0.0951	0.1056	0.0831	0.1134	0.1073
263	0.0274	0.0292	0.0103	0.0363	0.0288
264	0.0048	0.0000	0.0000	0.0059	0.0052
265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
267	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000


D.4. Desarrollo de una estrategia de cálculo novedosa, rápida y sencilla para MIDA basada en regresión lineal múltiple.

Artículo científico IV: Journal of Mass Spectrometry, 2016, 51, 980-987.

Título: “A simplified calculation procedure for mass isotopomer distribution analysis (MIDA) based on multiple linear regression.”

Autores: Mario Fernández-Fernández, Pablo Rodríguez-González, J. Ignacio García Alonso.

Research article



Received: 14 April 2016
Revised: 16 June 2016
Accepted: 5 July 2016
Published online in Wiley Online Library

www.interscience.wiley.com | DOI 10.1002/jms.3809

A simplified calculation procedure for mass isotopomer distribution analysis (MIDA) based on multiple linear regression

Mario Fernández-Fernández, Pablo Rodríguez-González and J. Ignacio García Alonso*

Abstract: We have developed a novel, rapid and easy calculation procedure for Mass Isotopomer Distribution Analysis based on multiple linear regression which allows the simultaneous calculation of the precursor pool enrichment and the fraction of newly synthesized labelled proteins (fractional synthesis) using linear algebra. To test this approach, we used the peptide RGGGLK as a model tryptic peptide containing three subunits of glycine. We selected glycine labelled in two ^{13}C atoms (^{13}C -glycine) as labelled amino acid to demonstrate that spectral overlap is not a problem in the proposed methodology. The developed methodology was tested first *in vitro* by changing the precursor pool enrichment from 10 to 40% of ^{13}C -glycine. Secondly, a simulated *in vivo* synthesis of proteins was designed by combining the natural abundance RGGGLK peptide and 10 or 20% ^{13}C -glycine at 1:1, 1:3 and 3:1 ratios. Precursor pool enrichments and fractional synthesis values were calculated with satisfactory precision and accuracy using a simple spreadsheet. This novel approach can provide a relatively rapid and easy means to measure protein turnover based on stable isotope tracers. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Keywords: multiple linear regression; mass isotopomer distribution analysis; glycine; LC-MS; peptides

Introduction

Protein biosynthesis has been a topic of interest in many scientific disciplines since the mid-twentieth century as it is related to the regulation of protein expressions in cells.^[1] The most efficient tool to differentiate existing proteins from newly synthesized proteins is the use of isotopic tracers. The first isotopic tracers used to study protein biosynthesis were radioactive tracers. For example, the method reported by Garlick *et al.*^[2] was based on the injection of ^3H -phenylalanine (tritium-labelled phenylalanine) to calculate the radioactivity incorporated into a protein pool. Another method based on the use of radioactive isotopes was developed by Gemir *et al.*^[3] In this method, ^{35}S -methionine was used and, combining the fluorescence detection of radio-labelled proteins and 2D autoradiography of the gels, ^{35}S incorporation rate was quantified.

However, the use of radioisotopes has been gradually replaced by methods using stable isotopes tracers^[4–10] where deuterium (^2H) or ^{13}C labelled essential amino acids are used as tracers in combination with Mass Spectrometric detection. Nowadays, the use of stable isotopes is the most widely used procedure for measuring protein synthesis rates. This procedure is based on the precursor-product isotopic approach, which compares the amount of isotopic labels incorporated into the protein of interest with the initial amount of isotopic labels present in the precursor pool. In general, labelled (^2H or ^{13}C) amino acids are administered and their incorporation into the protein of interest measured.

The development of specific approaches is required to know the relationship between the isotopic label incorporation rate into proteins and the precursor pool enrichment because the precursor pool from which proteins are synthesized has many natural sources

of amino acids.^[11] The main parameters which need to be calculated are the isotopic enrichment of the precursor pool (β) and the fractional synthesis (α) which is the fraction of labelled protein in the mixture that has been synthesized as the labelled amino acid was administered.

So far, two general procedures have been developed to study *in vivo* protein synthesis. The first strategy is based on the administration and equilibration of deuterated water^[2,12,13] ($^2\text{H}_2\text{O}$) with the rest of the water in the body. When the hydrogens of the amino acids are exchanged for ^2H , the final ^2H enrichment is used as the precursor pool enrichment (β). Finally, the fractional synthesis is calculated from the relationship between the amino acid enrichment in proteins to the amino acid enrichment in the body. The second strategy, Mass Isotopomer Distribution Analysis (MIDA), which uses combinatorial probabilities, was first developed for the study of the synthesis of fatty acids, cholesterol or glucose^[14–17] and then applied for protein synthesis.^[18–20] If the amino acid present in the precursor pool combines to form a protein containing at least two amino acid subunits, the method is able to calculate the precursor pool enrichment. As the precursor pool is formed by a mixture of natural amino acids and the administered labelled amino acids, the newly synthesized protein will be a mixture containing: (1) all natural amino acids; (2) one labelled amino acid; (3) two

* Correspondence to: J. Ignacio García Alonso, Department of Physical and Analytical Chemistry Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: jign@uniovi.es

Department of Physical and Analytical Chemistry Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

D.4.1. Introducción

Los primeros estudios en la biosíntesis de proteínas se remontan a los años 40 cuando Schoenheimer utilizó Glicina y Leucina marcadas en ^{15}N y observó una rápida incorporación de estos a diferentes proteínas²⁷⁵. Estos resultados sentarían la base de los estudios en décadas posteriores sobre biosíntesis de proteínas tanto en mamíferos, bacterias o plantas.

Sin embargo no sería hasta los años 80 cuando los estudios sobre la biosíntesis de proteínas comenzó a ser de gran relevancia para investigadores de multitud de disciplinas debido a que estos estudios se consideran clave para comprender la regulación de la expresión de las proteínas en las células²⁷⁹. Estos métodos incluyen tanto el uso de isótopos radioactivos (^3H o ^{35}S)^{280,281} como isótopos estables (^2H , ^{13}C o ^{15}N)^{282,283}.

Actualmente el uso de isótopos estables es la técnica más utilizada para la medida de la biosíntesis de proteínas. Está basada en la comparación del marcaje incorporado a la proteína con el marcaje presente inicialmente en lo que se conoce como pool precursor. Se administran aminoácidos marcados (^2H , ^{13}C , ^{15}N) y se mide su incorporación a la proteína de interés²⁸⁶. Sin embargo, esa incorporación es muy difícil de conocer debido a que el pool precursor a partir del que se forman las proteínas posee numerosas fuentes de aminoácidos naturales, haciendo complicado conocer el porcentaje de aminoácido marcado presente en el pool precursor²⁸⁷, teniendo que desarrollarse metodologías específicas. Los principales parámetros que tienen que ser calculados son el enriquecimiento en el pool precursor (p) y la cantidad de proteína marcada sintetizada desde que se administró el aminoácido marcado

Se han desarrollado dos procedimientos generales para el estudio in vivo de la biosíntesis de proteínas: 1). Métodos basados en la adición de agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$)^{284,288} y 2) “*Mass isotopomer distribution analysis (MIDA)*”^{283,294}. Este último método es el más utilizado y está basado en el uso de la combinatoria de probabilidades, donde los aminoácidos presentes en el pool precursor se combinan para formar una proteína la cual contiene al menos tres subunidades del aminoácido marcado en ^{13}C o ^{15}N . La estrategia usada es seleccionar un péptido característico de la proteína objeto de estudio que contenga al menos tres repeticiones del aminoácido marcado en ^{13}C o ^{15}N añadido. Este péptido representará al conjunto de la proteína. El principal problema de

este método está basado en cálculos matemáticos complicados y tediosos que incluyen ajustes polinómicos.

Por lo tanto, en este cuarto y último capítulo de Tesis Doctoral se presenta una novedosa, sencilla y rápida estrategia de cálculo para MIDA. En este método se añade un aminoácido marcado en ^{13}C ($^{13}\text{C}_2$ -Glicina) donde su incorporación a la proteína de interés vendrá descrita, como en MIDA, por la distribución binomial. La principal novedad es el cálculo simultáneo del enriquecimiento en el pool precursor y de la cantidad de proteína marcada sintetizada desde la adición del aminoácido marcado en ^{13}C mediante regresión lineal múltiple. En comparación con los métodos de MIDA actuales, nuestro método usa algebra lineal y además tiene en cuenta la medida de la distribución isotópica experimental en el péptido objeto de estudio mediante HPLC-MS.

D.4.2. Objetivos

El objetivo general de este último capítulo de Tesis Doctoral es el desarrollo de una novedosa, rápida y fácil estrategia de cálculo para MIDA, basada en regresión lineal múltiple, que permite el cálculo simultáneo del enriquecimiento en el pool precursor y de la cantidad de nueva proteína marcada sintetizada.

1. Síntesis del péptido tríptico modelo (RGGGLK) utilizando un sintetizador de péptidos en fase sólida con tecnología microondas.
2. Confirmación del péptido RGGGLK sintetizado mediante su análisis por HPLC-ESI-MS y selección del fragmento molecular objeto de estudio.
3. Validación “in vitro” de la metodología desarrollada mediante el análisis de cuatro péptidos modelo (RGGGLK) sintetizados a partir de cantidades diferentes de $^{13}\text{C}_2$ -Glicina (10%, 20%, 30% y 40%)
4. Validación “in vivo” de la metodología desarrollada combinando en proporciones 1:1, 1:3 y 3:1, péptido de abundancia natural y péptido sintetizado a partir de 10% o 20 % de $^{13}\text{C}_2$ -Glicina.

D.4.3. Artículo científico IV

A SIMPLIFIED CALCULATION PROCEDURE FOR MASS ISOTOPOMER DISTRIBUTION ANALYSIS (MIDA) BASED ON MULTIPLE LINEAR REGRESSION.

Mario Fernández-Fernández, Pablo Rodríguez-González, J. Ignacio García Alonso*.

Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

*Author for correspondence: jiga@uniovi.es

ABSTRACT

We have developed a novel, rapid and easy calculation procedure for Mass Isotopomer Distribution Analysis (MIDA) based on multiple linear regression which allows the simultaneous calculation of the precursor pool enrichment and the fraction of newly synthesized labelled proteins (fractional synthesis) using linear algebra. To test this approach we used the peptide RGGGLK as a model tryptic peptide containing three subunits of glycine. We selected glycine labelled in two ^{13}C atoms ($^{13}\text{C}_2$ -glycine) as labelled amino acid to demonstrate that spectral overlap is not a problem in the proposed methodology. The developed methodology was tested first “*in vitro*” by changing the precursor pool enrichment from 10% to 40% of $^{13}\text{C}_2$ -glycine. Secondly, a simulated “*in vivo*” synthesis of proteins was designed by combining the natural abundance RGGGLK peptide and 10% or 20 % $^{13}\text{C}_2$ -glycine at 1:1, 1:3 and 3:1 ratios. Precursor pool enrichments and fractional synthesis values were calculated with satisfactory precision and accuracy using a simple spreadsheet. This novel approach can provide a relatively rapid and easy means to measure protein turnover based on stable isotope tracers.

Keywords

Multiple linear regression, Mass isotopomer distribution analysis, glycine, LC-MS, peptides

INTRODUCTION

Protein biosynthesis has been a topic of interest in many scientific disciplines since the mid-twentieth century as it is related to the regulation of protein expressions in cells¹. The most efficient tool to differentiate existing proteins from newly synthesized proteins is the use of isotopic tracers. The first isotopic tracers used to study protein biosynthesis were radioactive tracers. For example, the method reported by Garlick *et al*² was based on the injection of ³H-phenylalanine (tritium-labelled phenylalanine) to calculate the radioactivity incorporated into a protein pool. Another method based on the use of radioactive isotopes was developed by Gerner *et al*³. In this method ³⁵S-methionine was used and, combining the fluorescence detection of radiolabelled proteins and 2D autoradiography of the gels, ³⁵S incorporation rate was quantified.

However, the use of radioisotopes has been gradually replaced by methods using stable isotopes tracers⁴⁻¹⁰ where deuterium (²H) or ¹³C labeled essential amino acids (AAs) are used as tracers in combination with Mass Spectrometric detection. Nowadays, the use of stable isotopes is the most widely used procedure for measuring protein synthesis rates. This procedure is based on the precursor-product isotopic approach, which compares the amount of isotopic labels incorporated into the protein of interest with the initial amount of isotopic labels present in the precursor pool. In general, labeled (²H or ¹³C) amino acids are administrated and their incorporation into the protein of interest measured.

The development of specific approaches is required to know the relationship between the isotopic label incorporation rate into proteins and the precursor pool enrichment because the precursor pool from which proteins are synthesized has many natural sources of amino acids¹¹. The main parameters, which need to be calculated, are the isotopic enrichment of the precursor pool (p) and the fractional synthesis (x_t) which is the fraction of labeled protein in the mixture that has been synthesized since the labelled amino acid was administrated.

So far, two general procedures have been developed to study *in vivo* protein synthesis. The first strategy is based on the administration and equilibration of deuterated water^{8,12-13} ($^2\text{H}_2\text{O}$) with the rest of the water in the body. When the hydrogens of the amino acids are exchanged for ^2H , the final ^2H enrichment is used as the precursor pool enrichment (p). Finally, the fractional synthesis is calculated from the relationship between the amino acid enrichment in proteins to the amino acid enrichment in the body. The second strategy, Mass Isotopomer Distribution Analysis (MIDA), which uses combinatorial probabilities, was first developed for the study of the synthesis of fatty acids, cholesterol or glucose¹⁴⁻¹⁷ and then applied for protein synthesis^{7,18-25}. If the amino acids present in the precursor pool combines to form a protein containing at least two amino acid subunits the method is able to calculate the precursor pool enrichment. As the precursor pool is formed by a mixture of natural amino acids and the administrated labelled amino acids, the newly synthesized protein will be a mixture containing: i) all natural amino acids; ii) one labelled amino acid; iii) two labelled amino acids, etc. The probability of finding the different species of the protein can be described by a binomial distribution as a function of the precursor pool enrichment. The general strategy to apply MIDA to study protein synthesis is to obtain a peptide that contains at least three repeats of the selected amino acid²² and measure its isotope

composition by Mass Spectrometry. This peptide will represent the synthesis of the entire protein.

The main problem of the current MIDA procedures applied to study protein synthesis is the complex mathematical calculations involved²². In order to calculate the precursor pool enrichment the theoretical mass isotopomer distributions from a range of precursor pool enrichments needs to be calculated. Then, the distribution of the unlabelled isotopomer is subtracted to obtain what is known as “excess isotopomer abundances”. Then, the “excess isotopomer abundances” are plotted against the precursor pool enrichment and adjusted to a polynomial equation. The experimental precursor pool enrichment (p) is obtained from the measured excess abundance using the resulting polynomial regression equation.

The determination of the mass isotopomer distributions of metabolites using matrix based methods from mass spectrometry (MS) or tandem MS data has been reported during the last years²⁶⁻²⁹. In those procedures MIDA is applied to study the degradation of isotopically labelled monomers during metabolism. However, in this work, we have introduced for the first time multiple linear regression to simplify regular MIDA calculations for the study of protein biosynthesis. The application of multiple linear regression to simplify complex mass spectra was first developed by Braumann³⁰ in 1966 and, more recently, has been widely applied for isotope dilution calculations³¹. In this paper we described a novel calculation strategy for the traditional MIDA application to protein biosynthesis. In this method, a ¹³C labeled amino acid is added (¹³C₂-glycine) and its incorporation into the peptide of interest is described, as in MIDA, by a binomial distribution. The main difference lays on the way the precursor pool enrichment (p) and fractional synthesis (x_t) is calculated. Our method is based on the simultaneous determination of p and x_t by multiple linear regression. In contrast to the current MIDA

calculations based on the use of excess abundances, our method uses linear algebra and takes into account the whole mass isotopomer distribution experimentally measured. So, the novelty of our method relies on the easy, rapid and simultaneous calculation of the precursor pool enrichment (p) and the fraction of newly synthesized protein (x_i) using a simple spreadsheet. We selected the peptide RGGGLK as a model tryptic peptide containing three glycine subunits to evaluate the procedure. First, the approach was tested *in vitro* from known enrichments of $^{13}\text{C}_2$ -Glycine in the precursor pool, and then we simulated different *in vivo* synthesis by preparing several mixtures containing different proportions of the natural abundance and labelled peptide.

EXPERIMENTAL

Reagents and materials

Natural abundance Fmoc-protected amino acids Fmoc-Gly-OH ($\geq 98\%$), Fmoc-Leu-OH ($\geq 97\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Fmoc-Arg (Pbf)-OH were purchased from Novabiochem (Darmstadt, Germany). $^{13}\text{C}_2$ -labelled Glycine-N-Fmoc was purchased from Cambridge isotope Laboratories (Tewksbury, Massachusetts, USA). A ^{13}C isotopic enrichment of $99.0\pm 0.1\%$ in the $^{13}\text{C}_2$ -labelled Glycine-N-Fmoc was calculated according to the method described elsewhere³². Preloaded resin Fmoc-Lys (Boc) Wang resin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). N,N-diisopropylcarbodiimide (99%), ethyl-(hydroxyimino) cyanoacetate (97%), piperazine (99%), ethanol ($\geq 99.8\%$), 1-methyl-2-pyrrolidone ($\geq 99\%$), dichloromethane ($\geq 99.5\%$), trifluoroacetic acid (99%), triisopropylsilane (98%), diethyl ether (99.9%), formic acid ($\geq 96\%$), methoxyamine hydrochloride (98%), N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide with 1% tert-butyltrimethylchlorosilane ($\geq 95\%$) and pyridine ($\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich. N,N-

dimethylformamide (ACS grade) was purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania, USA). Acetonitrile was purchased from Fischer-Scientific (Madrid, Spain). Hexane was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Eppendorf tubes (1.5 ml) were purchased from Labbox (Mataró, Spain). Centrifuge tubes (50 mL) were purchased from VWR and Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

Instrumentation

The triple quadrupole LC-MS/MS system employed in this work was an Agilent 6460 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with a “jet-stream” electrospray ionization (ESI) source and coupled to a 1290 HPLC infinity system (Agilent Technologies). In addition, a gas chromatograph, Agilent 7890, coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with an electron ionization source was employed. The GC was fitted with a split/splitless injector and a DB-5 MS capillary column (cross-linked 5% phenyl-methyl siloxane, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm coating). A HPLC system (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a variable wavelength detector was employed for the characterization of the peptide solutions for the *in vivo* simulation experiment. A Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM, Matthews, NC, USA) was used to synthesize the natural abundance and labelled peptide RGGGLK. An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. A centrifuge Centro-8-BL (JP Selecta, Barcelona, Spain) was used for peptide precipitation. A Fisher bioblock scientific (Thermo, Bremen, Germany) was employed for orbital agitation during the cleavage

step. A centrifugal vacuum concentrator from Genevac (Sulflok, UK) was used to dry the samples. A thermomixer compact from Eppendorf (Hamburg, Germany) was used for the thermostization of the derivatization reaction for GC analyses. A Heto Power dry LC 3000 freeze dryer (Thermo, Bremen, Germany) was used for lyophilizing the peptides and a mini-vap evaporator/concentrator from Supelco (St. Louis, MO, USA) was used for solvent evaporation of the peptide solutions.

Procedures

Synthesis of the RGGGLK peptide

The peptide RGGGLK with a monoisotopic mass of 586.4 was synthesized using a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer by standard Fmoc solid-phase peptide synthesis. The natural abundance peptide RGGGLK was synthesized using natural abundance glycine whereas the synthesis of the different labelled peptides was carried out using mixtures of $^{13}\text{C}_2$ -labelled and natural abundance glycine. For this purpose, the different precursor pool enrichments of the labelled glycine were obtained by mixing different proportions of natural and labelled $^{13}\text{C}_2$ -labelled FMOC-protected glycine (10%, 20%, 30% and 40% mole percent of labelled glycine) before the peptide synthesis procedure. In all cases, an excess of Fmoc-protected amino acid was used with respect to the resin. First, 0.1g of Fmoc-Lys (Boc) Wang resin was swelled in 10 mL of N-N-dimethylformamide (DMF) for 30 minutes. For the activator preparation, 0.505g of N-N-diisopropylcarbodiimide (DIC) was dissolved in 8 mL of DMF. As an activator base, 0.568 g of ethyl-(hydroxyamino) cyanoacetate was mixed with 4 mL of DMF. Deprotection of Fmoc-groups was carried out using 10% (w/v) piperazine in 10:90 Ethanol: 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP). Microwave deprotection conditions for each amino acid was 75°C, 155W, 15s and then 90°C, 30W, 50s. For each amino acid,

microwave coupling conditions was carried out at 75°C, 170W, 15s and then 90°C, 30W, 110s (except for Arginine which required a double coupling cycle). The complete synthesis took about 45-50 minutes. Then, the synthesized peptide, attached to the resin, was removed from the reaction vessel, washed with DMF and dichloromethane and transferred to a clean tube. The cleavage of protecting groups and the separation of the peptide from the resin was carried out by the addition of a solution containing 95% trifluoroacetic acid (v/v), 2.5% H₂O (v/v) and 2.5% triisopropylsilane (TIS) (v/v) and by orbital agitation for 2.5 hours. Further, diethyl ether at -20°C was added into the peptide solution for peptide precipitation. After, a vigorous stirring, the solution was centrifuged at 500 rpm for 3 min and the supernatant was discarded. Diethyl ether was again added and this operation was repeated twice. Finally the peptide was dried with a flow of nitrogen, lyophilized and stored at -20°C.

Determination of the concentration of the labelled peptides

The concentration of the labelled peptides stock solutions was calculated using an HPLC system equipped with a UV detector ($\lambda=220$ nm) and a Luna 5 μ m, SCX, 10 x 250 mm ion exchange column from Phenomenex. The natural abundance peptide was used as reference standard for calibration assuming that the molar absorption coefficient of the peptide is not affected by isotopic substitutions.

LC-MS analysis

Chromatographic separation of the peptide was carried out using an Aeris Peptide XB-C18 column (100 mm x 2.1 mm d.i, 1.7 μ m) supplied by Phenomenex. LC-MS analyses were performed in isocratic elution mode with a mobile phase composition of 98% A (0.1% formic acid in water) and 2% B (0.1% formic acid in acetonitrile). The

temperature of both mobile phases was 25°C. The flow rate was set at 0.3 mL min⁻¹, and the injection volume was 2 µL. The total run was 3 minutes. LC-MS analysis was performed by using positive-ion electrospray ionization in selected ion monitoring mode (SIM). The ion spray voltage was set at 3500V. The sheath gas temperature was set at 300°C and the sheath gas flow at 11 L min⁻¹. The gas temperature was set at 350°C, the gas flow at 7 L min⁻¹ and the nebulizer pressure at 40 psi. The SIM mode was performed measuring eleven m/z values from 587.3 to 597.3 at the protonated molecular ion [M+H]⁺ using 50 ms dwell time per mass. The fragmentor voltage was set at 150 V.

Sample treatment for the determination of isotope enrichment in ¹³C₂-labelled Fmoc-protected glycine

Deprotection of the ¹³C₂-labelled Fmoc-protected glycine was required to calculate the isotopic enrichment of the amino acid, using the method proposed elsewhere²⁶. For this purpose, 1.5 mL of glycine-N-Fmoc ¹³C₂ (10 µg/g) was added into a 1.5 mL Eppendorf tube and evaporated to dryness at 50°C in a centrifugal vacuum concentrator. Next, 1.5 mL of deprotection solution (10% (w/v) piperazine in 10:90 Ethanol: 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP)) was added to the sample and incubated at 25°C for 1h. Then, the solution was again evaporated to dryness at 50°C in a centrifugal vacuum concentrator. Dried ¹³C₂-glycine was derivatized with N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA). For this purpose 150µL of MTBSTFA was added and the sample was incubated for 10 min at 60° and injected into the GC-MS system.

Calculations

Multiple linear regression and binomial distribution for protein turnover measurements

When a $^{13}\text{C}_2$ -glycine amino acid subunit is administrated, the precursor pool contains a proportion of labelled subunits. As the peptide of interest RGGGLK contains three repeat of the precursor unit, the synthesized peptide will contain a variable number of the labelled subunits (0, 1, 2 or 3) which will depend on the proportion of labelled subunits present in the precursor pool (“precursor pool enrichment”). The probability of finding each labelled subunit ($i=0$ to 3) in the RGGGLK peptide, x^i , will be given by the binomial distribution as a function of the precursor pool enrichment (p) as described in equation (1).

$$x^i = \frac{3!}{(3-i)!(i)!} (1-p)^{3-i} p^i \quad (1)$$

Where p is the precursor pool enrichment and i is the number of labelled subunits in the RGGGLK peptide. Note that $\sum_{i=0}^3 x^i = 1$ and that the probabilities x^i calculated using equation 1 are also the molar fractions of each peptide type in the peptide mixture for a given precursor pool enrichment p .

The overall isotope composition of the labelled peptide, the relative abundances A_t^j , will be a linear combination of the isotope composition of each peptide type (with 0, 1, 2 or 3 labelled glycine subunits) and the molar fraction of each peptide type in the mixture.

This linear combination can be expressed as equation (2).

$$\begin{bmatrix} A_t^0 \\ A_t^1 \\ A_t^2 \\ \dots \\ A_t^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_0^0 & A_1^0 & A_2^0 & A_3^0 \\ A_0^1 & A_1^1 & A_2^1 & A_3^1 \\ A_0^2 & A_1^2 & A_2^2 & A_3^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_0^m & A_1^m & A_2^m & A_3^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_p^0 \\ x_p^1 \\ x_p^2 \\ x_p^3 \end{bmatrix} \quad (2)$$

Where x_p^i are the probabilities for each peptide type calculated from equation (1) for a given precursor pool enrichment p . In this equation A_i^j (for masses $j=0$ to m where $j=0$ is the monoisotopic mass) are the theoretical isotopologue abundances calculated for each peptide type with $i=0, 1, 2$ or 3 labelled amino acid subunit. These theoretical abundances can be calculated with a number of mathematical tools available for isotope distribution measurements³³. In our case we have used a visual basic programme written as a macro for excel³⁴⁻³⁵ by adapting the calculation algorithm described by Kubinyi³⁶. IUPAC data on the natural isotopic composition of the elements, the exact mass of the isotopes and the exact value of ^{13}C enrichment calculated experimentally³² were introduced in the excel spreadsheet and were read from the visual basic programme.

During the course of an *in vivo* synthesis, the newly synthesized protein will be mixed in a biological system with preexisting natural abundance protein. So, after trypsin hydrolysis of a biological sample, the peptide of interest will be a mixture of natural abundance and labelled peptide. The whole isotope distribution of the peptide in the sample can be thus assumed to be a linear combination of the peptide of natural abundance and the labelled peptide according to equation (3):

$$\begin{bmatrix} A_s^0 \\ A_s^1 \\ A_s^2 \\ \dots \\ A_s^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_n^0 & A_t^0 \\ A_n^1 & A_t^1 \\ A_n^2 & A_t^2 \\ \dots & \dots \\ A_n^m & A_t^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_n \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^0 \\ e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^m \end{bmatrix} \quad (3)$$

Where x_n and x_t are the unknown molar fractions of natural abundance and labelled peptide contributing to the final isotopic composition in the sample. Please note that $x_n + x_t = 1$ and that equation (3) contains more equations than unknowns and that is why we need to introduce an error vector in the equation. So, the values of x_n and x_t that better fit the data in equation (3) can be obtained by multiple linear regression.

Finally, the isotope composition of the labelled peptide to be included in equation (3) will be a function of the precursor pool enrichment as shown in equations (1) and (2).

So, equation (3) is better expressed in the form:

$$\begin{bmatrix} A_s^0 \\ A_s^1 \\ A_s^2 \\ \dots \\ A_s^m \end{bmatrix} = x_n \times \begin{bmatrix} A_n^0 \\ A_n^1 \\ A_n^2 \\ \dots \\ A_n^m \end{bmatrix} + x_t \times \begin{bmatrix} A_0^0 & A_1^0 & A_2^0 & A_3^0 \\ A_0^1 & A_1^1 & A_2^1 & A_3^1 \\ A_0^2 & A_1^2 & A_2^2 & A_3^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_0^m & A_1^m & A_2^m & A_3^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_p^0 \\ x_p^1 \\ x_p^2 \\ x_p^3 \\ \dots \\ x_p^m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^0 \\ e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^m \end{bmatrix}$$

(4)

Where A_n^j , the isotope composition of natural abundance peptide, is the same as that theoretical calculated for 0 labelled subunits.

The final calculation procedure can be performed with a spreadsheet to find the best values of p and x_t which better fit the experimental isotope distribution in the sample. For this purpose, the experimental isotope distributions were compared with calculated isotope distribution for given values of p and x_t using equation 4. The optimum p and x_t values were obtained using the SOLVER function of Microsoft Excel as those giving the minimum in the square sum of residuals (SSR) between the calculated and experimental isotope distribution. An example Excel spreadsheet (MIDA supplementary information.xlsx) with actual data is given in the supplementary information.

RESULTS AND DISCUSSION

Study of the spectral purity of the selected cluster.

The mathematical procedure described in this paper requires the accurate measurement of the isotope distribution of the peptide. As discussed previously³², the tailing of the peak at the low mass side could contribute significantly at M-1. So, the contribution of the tailing of the peaks at low mass side (M-1) in LC-MS experimental spectrum was

obtained using the method described previously^{32,37-38}. The isotopic distribution of the natural abundance RGGGLK peptide was measured on the LC-MS instrument in the SIM mode monitoring the corresponding m/z of the protonated molecular ion $M+H^+$. For the RGGGLK peptide the measured mass cluster was practically pure, only a small contribution (ca. 0.3%) at $M-1$ was observed due to of a small tailing at the low mass side of the spectrum when working in the standard resolution mode of the instrument (0.7 u FWHM). This contribution was not high enough to be taken into account in the calculation of theoretical abundance for each peptide type with 0, 1, 2 or 3 labelled amino acid subunits.

Determination of the isotopic enrichment of $^{13}\text{C}_2$ -labelled FMOC-protected glycine by GC-MS

The calculation of the theoretical abundances for each peptide containing 1, 2 or 3 labelled amino acid subunits requires an exact determination of the isotopic enrichment of the $^{13}\text{C}_2$ -labelled FMOC-protected glycine. The nominal isotopic enrichment provided by the manufacturer was given as 97-99% without any uncertainty value or information on how the enrichment value was calculated. Therefore, to accurately calculate the isotopic enrichment in the labelled $^{13}\text{C}_2$ -labelled FMOC-protected glycine we followed a recently published procedure³². For this purpose, once the deprotection and derivatization of the labelled amino acid was performed as explained in the experimental section, the labelled amino acid was injected in quintuplicate in the GC-MS system. The experimental isotope distribution was compared with theoretically derived spectra calculated for different tentative isotope enrichments as described elsewhere³². The best isotope enrichment was that which provided the minimum in the square sum of residuals for the linear regression between the theoretical and

experimental spectra. It was observed that the isotopic enrichment was $99.0 \pm 0.1\%$ (2s, n=5).

In vitro studies using the RGGGLK peptide

The proposed procedure was evaluated in *in vitro* studies using the model RGGGLK peptide, containing three glycine subunits (monoisotopic mass of 586.4). Figure 1 shows the mass spectrum for the synthesized natural abundance peptide obtained in SCAN mode using a LC-MS instrument equipped with an electrospray source. Note that the most intense ions in the spectrum correspond to the singly $M+H^+$ ion at m/z 587.4 and the double charged ion at m/z 294.2.

To perform an *in vitro* experiment, four different RGGGLK peptides were synthesized simulating different enrichments in the precursor pool. For this purpose different labelled peptides were synthesized by mixing different proportions of natural and $^{13}\text{C}_2$ -labelled Fmoc-protected glycine (10%, 20%, 30% and 40% mole percent of $^{13}\text{C}_2$ -glycine) before the peptide synthesis procedure. After synthesis and purification, 10 ppm solutions of each peptide were injected by quintuplicate into LC-ESI-MS. Eleven consecutive masses (from 587.4 to 597.4) from the protonated singly ion ($M+H^+$) were measured in SIM mode to calculate the experimental isotopic distribution which was finally employed to obtain the “precursor pool enrichment” and “fractional synthesis” using equation (4).

The isotopic distribution of the cluster of the singly charged RGGGLK obtained from the LC-ESI-MS instrument in SIM mode for the peptides synthesized from natural glycine, and from 10%, 20%, 30% and 40% mole percent of $^{13}\text{C}_2$ -glycine are shown in Figure 2. As expected, the abundances of $M+2$, $M+4$ and $M+6$ in the cluster increased with the amount of $^{13}\text{C}_2$ -glycine. The comparison between the expected values for

precursor pool enrichment (p) and fractional synthesis (x_t) and the calculated values by the proposed methodology are shown in Table 1. As we can observe, the results obtained by multiple linear regression agree well with the theoretical values. The deviations, calculated using equation (5) were of the order of those obtained previously in a similar study using the classical non-linear MIDA calculations²².

$$deviation (\%) = \frac{(Measured - Theoretical)}{Theoretical} \times 100 \quad (5)$$

***In vivo* simulation in mixtures of labelled and natural abundance RGGGLK peptide**

We evaluated the applicability of measuring fractional synthesis by the proposed methodology during a simulated *in vivo* protein synthesis. To do so, we prepared mixtures of natural abundance peptide and ¹³C₂-glycine peptides by combining different proportions of natural abundance and labelled peptides. To do so, 1:3, 1:1 and 3:1 mixtures of natural and labelled peptide were prepared to simulate approximately 75, 50 and 25% fractional synthesis, respectively. Those three proportions were prepared using two labelled peptides with different precursor pool enrichments: 10% and 20 %. All mixtures were prepared gravimetrically from 10 µg g⁻¹ solutions of natural abundance and labeled RGGGLK peptide. The isotopic distributions of the mixtures were measured by quintuplicate injection in the LC-ESI-MS system to calculate p and x_t by the proposed methodology. Figure 3 shows the mass profiles of the M+H⁺ cluster in SIM mode of the singly charged RGGGLK obtained from the LC-ESI-MS instrument for the different mixtures prepared by combining the natural abundance and the labelled RGGGLK peptide with 10% or 20% precursor pool enrichment of ¹³C₂-labelled glycine.

The results obtained for the different mixtures are listed in Table 2. As we can observe for each of the two different p values in the three simulated mixtures 3:1, 1:1 and 1:3, the values of the precursor pool enrichment (p) were in agreement with the gravimetrically calculated values (theoretical values) regardless the fractional synthesis value. As we can see also in Table 2 the results obtained for fractional synthesis (x_f) were in good agreement with the expected values. The maximum deviation obtained was 10.7 % for the 3:1 mixture and 20% precursor pool enrichment.

It is of interest to demonstrate that the developed methodology provides unique and unequivocal values for p and x_f from the minimum in the square sum of residuals (SSR) of the multiple linear regression. For this purpose, we have calculated the values of SSR for a range of tentative p and x_f values and the results are shown in Figure 4 using the data for the 1:1 mixture of natural and labelled peptide for 20% precursor pool enrichment. As it can be observed, a single minimum is found in the curve which corresponds to the values of p and x_f which better fit the data. Note also the logarithmic scale in the z-axis showing the values of SSR.

CONCLUSIONS

In this work we have presented a novel and simple mathematical procedure to implement Mass Isotopomer Distribution Analysis based on multiple linear regression and LC-MS. This calculation procedure is an easy and rapid approach in comparison with the classic MIDA calculations for protein synthesis which involve a very tedious procedure based on the use of excess abundances and polynomial curve-fitting of mass profiles. The developed methodology was applied to a model RGGGLK synthetic peptide and tested “in vitro” on the model peptide for different precursor pool enrichments of $^{13}\text{C}_2$ -glycine, and simulated “in vivo” conditions by combining different

proportion of the natural abundance and labelled peptide for 10% and 20% precursor pool enrichment with satisfactory results. The methodology described in this paper could be considered as an alternative procedure for MIDA showing the same level of accuracy and precision in comparison with the classical approach²².

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project Ref. CTQ2012-36711, co-funded by FEDER. The EU is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS instrument. MFF acknowledges Gobierno del Principado de Asturias through FICYT (Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología) for the provision of a predoctoral grant in the frame of the Severo Ochoa Programme (BP11-162).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

The file “MIDA supplementary information.xlsx” has been uploaded to show the type of calculations performed.

REFERENCES

- (1) Pratt, JM; Petty, J; Riba-Garcia, I; Duncan, HL; Gaskell, SJ; Oliver, SG; Beynon, RJ. *Mol. Cell. Proteomics*. **2002**, 1(8), 579-91.
- (2) Garlick, M; McNurlan, MA; Preedy, VR. *Biochem. J*. **1980**, 192, 719-23.
- (3) Gerner, C; Vejda, S; Gelbmann, D; Bayer, E; Gotzmann, J; Schulte-Hermann, R; Mikulits, W. *Mol. Cell. Proteomics*. **2002**, 1, 528-37.
- (4) Lamarre, SG; Saulnier, RJ; Blier, PU; Driedzic, WR. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol*. **2015**, 182, 1-5.

- (5) Beynon, RJ; Pratt, JM. *Mol. Cell. Proteomics*. **2005**, 4, 857-72.
- (6) Cargile, BJ; Bundy, JL; Grunden, AM; Stephenson Jr, JL. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 86-97.
- (7) Hellerstein, MK, Neese, RA. *Am. J. Physiol.* **1999**, 276, E1146-E1170.
- (8) Kasumov, T; Ilchenko, S; Li, L; Rachdaoui, N; Sadygov, RG; Willard, B; McCullough, AJ; Previs, S. *Anal. Biochem.* **2011**, 412, 47-55.
- (9) Lee, YH; Yates, NA; Ichetovkin, M; Deyanova, E; Southwick, TSF; Wang, W; Loderstedt, J; Walker, N; Zhou, H; Zhao, X; Sparrow, CP; Hubbard, BK; Rader, DJ; Sitlani, A; Millar, JS; Hendrickson, RC. *Clin. Chem.* **2012**, 58, 619-27.
- (10) Abimorad, EG; Ducati, C; Castellani, D; Jomori, RK; Portella, MC; Carneiro, DJ. *Aquaculture*. **2014**, 433, 119-24.
- (11) Renie, MJ; Smith, K; Watt, PW. *Am. J. Physiol.* **1994**, 266, E298-E307.
- (12) Bush, R; Kim, YK; Neese, RA; Schade-Serin, V; Collins, M; Awada, M; Gardner, JL; Beysen, C; Marino, ME; Misell, LM; Hellerstein, MK. *Biochem. Biophys. Acta.* **2006**, 1760, 730-44.
- (13) Previs, SF; Fatica, R; Chandramouli, V; Alexander, JC; Brunengraber, H; Landau, BR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2004**, 286, E665-72.
- (14) Di Bueno, M; Jones, PJ; Beaumier, L; Wykes, LJ. *J. Lipid. Res.* **2000**, 41, 1516-23.
- (15) Hellerstein, MK; Christiansen, M; Kaempfer, S; Klete, C; Wu, K; Reid, JS. *J. Clin. Invest.* **1991**, 87, 1841-52.
- (16) Faiz, D; Neese, R; Kletke, C; Wolden, S; Cesar, D; Coutlangus, M; Schackleton, CM; Hellerstein, MK. *J. Lipid. Res.* **1993**, 345, 2063-75.
- (17) Bandsma, RM; Kuipers, F; Vonk, RJ; Boverhof, R; Sauer, PJ; Nagel, GT; Elzinga, M; Neese, RA; Hellerstein, MK; Stellaard, F. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, 1483, 343-51.
- (18) Doherty, MK; Brownridge, P; Owen, MAG; Davies, SJ; Young, IS; Whitfield, PD. *J. Proteomics*. **2012**, 75, 4471-75.

-
- (19) Doherty, MK; Young, IS; Davies, SJ; Whitfield, PD. Cambridge Isotopes. Application Note 29.
- (20) Neese, RA; Schwarz, JM; Faix, D; Turner, S; Letscher, A; Vu, D; Hellerstein, MK. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14452-63.
- (21) De Riva, A; Deery, MJ; McDonald, S; Lund, T; Busch, R. *Anal. Biochem.* **2010**, 403, 1-12.
- (22) Papageorgopoulos, C; Caldwell, K; Shackleton, C; Schwengrubber, H; Hellerstein, MK. *Anal. Biochem.* **1999**, 267, 1-16.
- (23) Papageorgopoulos, C; Caldwell, K; Schwengrubber, H; Neese, RA; Shackleton, C; Hellerstein, MK. *Anal. Biochem.* **2002**, 309, 1-10.
- (24) Van Eijk, HMH; Deutz, NEP. *J.Nutr.* **2003**, 133, 20845S-89S.
- (25) Zhang, H; Roy Reckler, R; Xiao, GG. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 764-71.
- (26) Christensen, B; Nielsen, J. *Metab. Eng.* 1999, 1, 282-90.
- (27) Winden, WV; Wittman, C; Heinzle, E; Heijnen, J. *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 80, 477-79.
- (28) Rousu, JA; Runtana, RA; Ketola, C; Juha, T; Kokkonen, C. *Spectroscopy.* 2005, 19, 53-67.
- (29) Rantanen, A; Rousu, J; Ketola, RA; Kokkonen, JT; Tarkiainen, V. *Metab. Eng.* 2002, 4, 285-94.
- (30) Braumann, JI. *Anal. Chem.* 1966, 38, 607-10.
- (31) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P. "Isotope Dilution Mass Spectrometry". Royal Society of Chemistry, 2013, Cambridge (UK).
- (32) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49, 681-691.
- (33) Valkenburg, D.; Mertens, I.; Lemièrre, F.; Witters, E.; Burzykowski, T. *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, 31, 96-109.

- (34) García-Alonso, JI; Rodríguez-González, P; González-Gago, A; González-Antuña, A. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 664, 68-76.
- (35) Garcia-Alonso, JI; Rodriguez-González, P. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 694, 177-180.
- (36) Kubinyi, H; *Anal. Chim. Acta.* **1991**, 247, 107-119.
- (37) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P. “Isotope Dilution Mass Spectrometry”. Royal Society of Chemistry, 2013, Cambridge (UK).
- (38) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G; García Alonso, J.I. *Analyst.* **2010**, 135, 953-964.

TABLES

Table 1: Theoretical and experimental precursor pool enrichments (p) and fractional synthesis (x_t) obtained for the RGGGLK peptide synthesized *in vitro* from different precursor pool enrichments of $^{13}\text{C}_2$ -glycine. Uncertainties given as standard deviation of $n=5$ injections.

Theoretical (p)	Measured (p)	Deviation (%)	Theoretical (x_t)	Measured (x_t)	Deviation (%)
0.0983	0.0920±0.0008	-6.40	1	0.9868±0.0109	-1.32
0.2021	0.2002±0.0011	-0.94	1	0.9688±0.0039	-3.12
0.2999	0.3001±0.0019	0.06	1	0.9760±0.0053	-2.40
0.3971	0.3977±0.0007	0.15	1	0.9847±0.0013	-1.53

Table 2: Theoretical and experimental precursor pool enrichments (p) and fractional synthesis (x_t) obtained for different mixtures of natural abundance and labelled RGGGLK peptide (3:1, 1:1 and 1:3) using 10% and 20% precursor pool enrichments of $^{13}\text{C}_2$ -glycine. Uncertainties given as standard deviation of $n=5$ injections.

10% $^{13}\text{C}_2$ glycine	Theoretical (p)	Measured (p)	Deviation (%)	Theoretical (x_t)	Measured (x_t)	Deviation (%)
3:1	0.0983	0.0958±0.0048	-2.54	0.2639	0.2564±0.0075	-2.84
1:1	0.0983	0.0956±0.0032	-2.74	0.5181	0.5129±0.0089	-1.00
1:3	0.0983	0.0943±0.0011	-4.07	0.7619	0.7641±0.0060	0.29
20% $^{13}\text{C}_2$ glycine	Theoretical (p)	Measured (p)	Deviation (%)	Theoretical (x_t)	Measured (x_t)	Deviation (%)
3:1	0.2021	0.2083±0.0036	3.06	0.2388	0.2133±0.0026	-10.69
1:1	0.2021	0.2059±0.0024	1.88	0.4852	0.4496±0.0031	-7.34
1:3	0.2021	0.2040±0.0016	0.94	0.7382	0.7055±0.0051	-4.43

FIGURES

Figure 1: LC-ESI-MS mass spectrum obtained in SCAN mode for natural abundance RGGGLK model synthetic peptide.

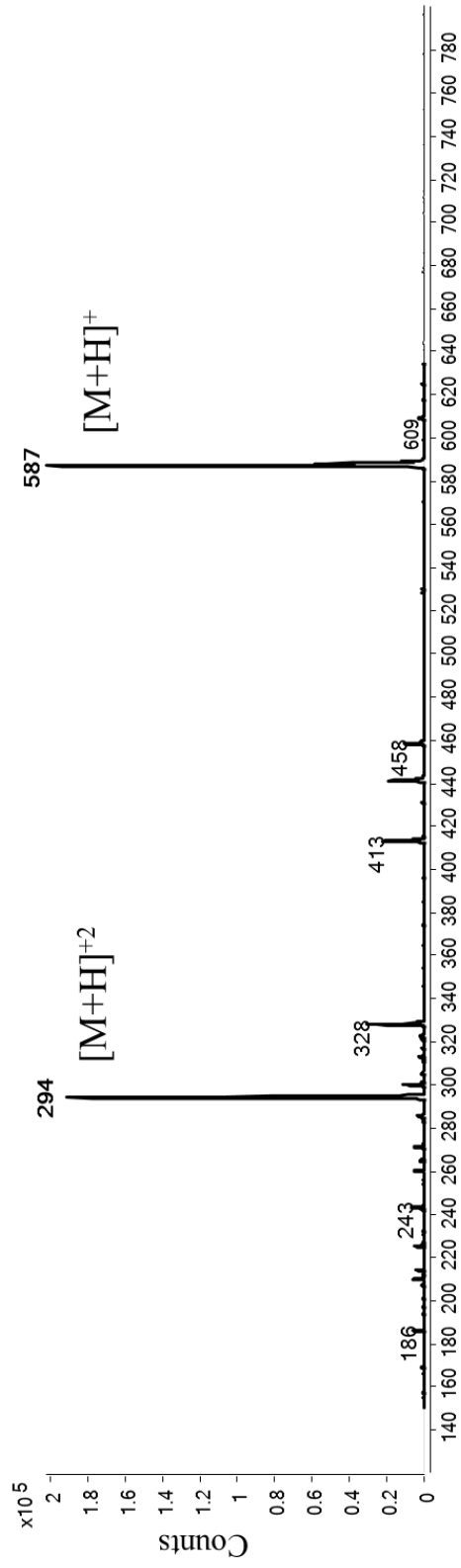


Figure 2: LC-ESI-MS mass spectra obtained in SIM mode for the cluster of singly charged RGGGLK. A) natural abundance peptide, B) labelled peptide with a 10% precursor pool enrichment, C) labelled peptide with a 20% precursor pool enrichment, D) labelled peptide with a 30% precursor pool enrichment, E) labelled peptide with a 40% precursor pool enrichment. The synthesis of the labelled peptides was carried out using universally ^{13}C labelled glycine ($^{13}\text{C}_2$ -glycine).

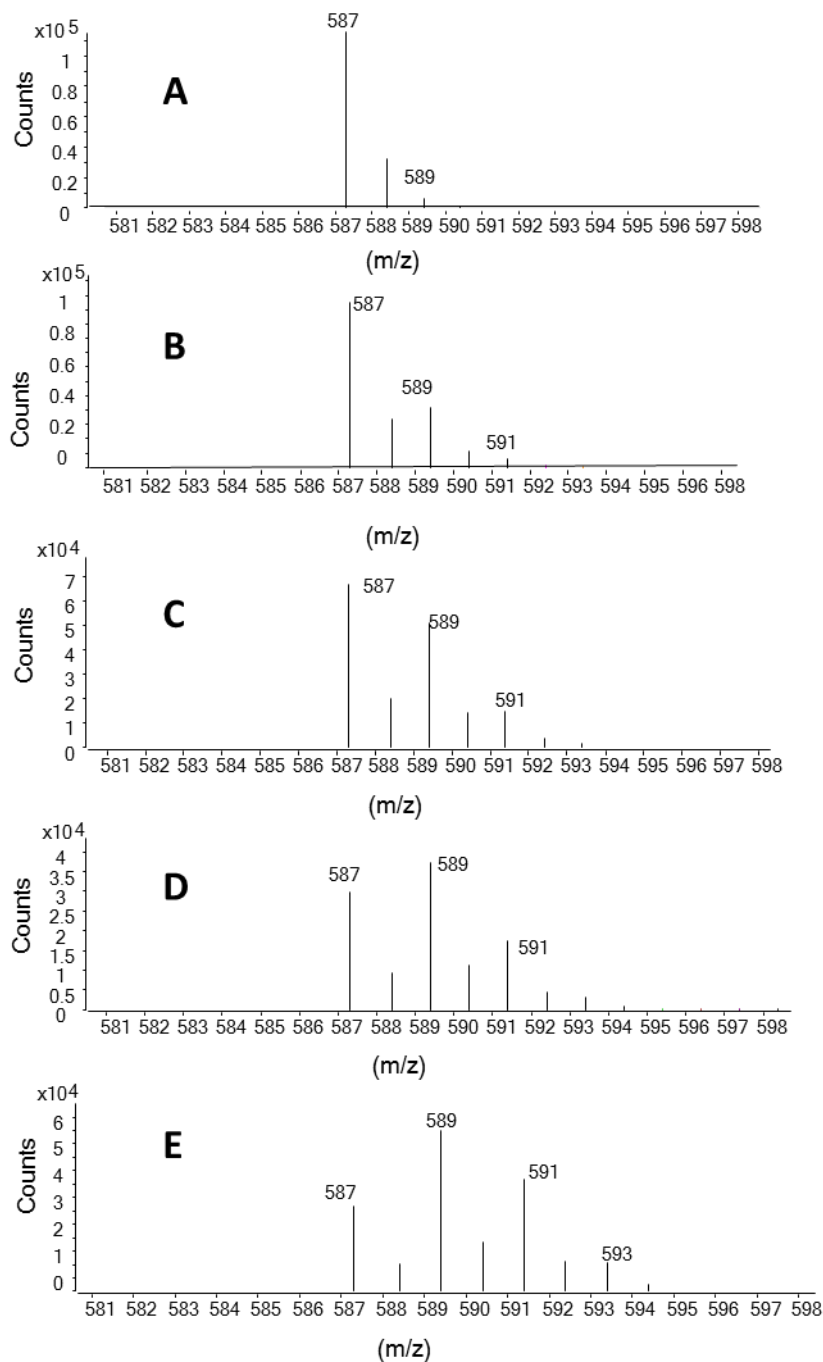


Figure 3: LC-ESI-MS mass spectra obtained in SIM mode for the different mixtures (3:1, 1:1 and 1:3) of natural abundance and labelled RGGGLK peptide for 10% and 20% precursor pool enrichment of $^{13}\text{C}_2$ -labelled glycine.

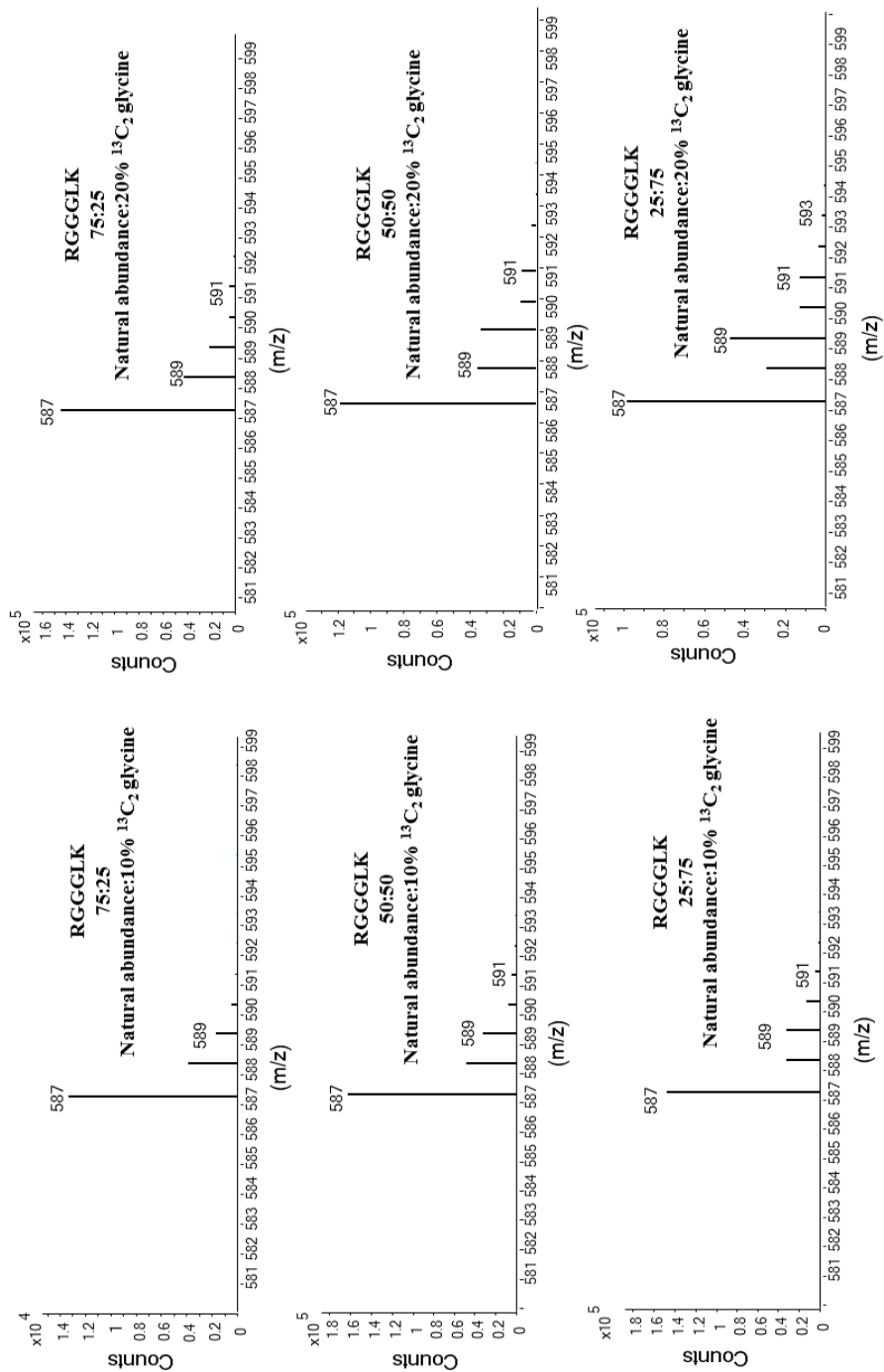
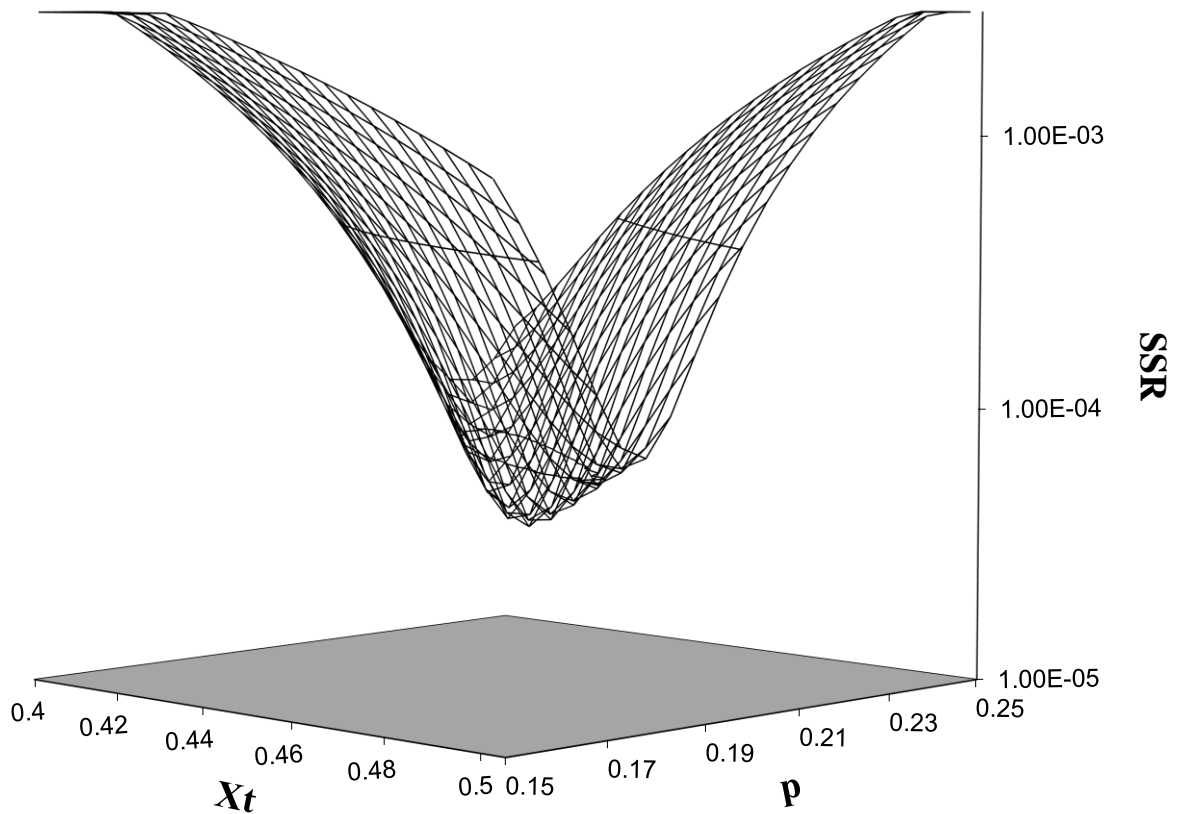


Figure 4: Square sum of residuals (SSR) of the multiple linear regression obtained for different values of the precursor pool enrichment (p) and fractional synthesis (x_t) for a 1:1 mixture of natural and labelled RGGGLK peptide for a 20% precursor pool enrichment of $^{13}\text{C}_2$ -labelled glycine.



E. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de metodologías analíticas basadas en el uso de compuestos orgánicos enriquecidos isotópicamente para su aplicación en Química Clínica y Metabolómica.

En primer lugar, dentro del campo de la Química Clínica el objetivo ha sido el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de especies de interés clínico (creatinina) por dilución isotópica y espectrometría de masas basadas en el empleo de compuestos mínimamente enriquecidos en ^{13}C y regresión lineal múltiple.

Las metodologías existentes basadas en IDMS para el análisis de estas especies de interés clínico están basadas en la utilización de calibrados metodológicos donde el trazador (generalmente marcado en varios átomos de ^{13}C) se adiciona en una cantidad constante de manera análoga a un patrón interno. Con la metodología desarrollada, en primer lugar, con el uso de trazadores mínimamente marcados en ^{13}C se minimizan los efectos isotópicos en el análisis y con el uso de la regresión lineal múltiple se resuelve el solapamiento espectral entre muestra y trazador, proporcionando de manera directa y a partir de la medida de las abundancias isotópicas experimentales en la muestra, las fracciones molares de analito y trazador y evitando la realización de un calibrado metodológico y por lo tanto poder cuantificar la concentración de analito de una manera exacta, precisa y libre de cualquier tipo de interferencias.

En el *artículo I*, se aplicó esta metodología al desarrollo de un método para la determinación de creatinina en muestras de suero humano mediante GC-ID-MS que se pueda aplicar al análisis de rutina en muestras que se encuentren interferidas por la presencia de bilirrubina en las mismas. La determinación de creatinina mediante cromatografía de gases requiere una etapa de derivatización previa debido a que es un compuesto polar y poco volátil. Entre los derivatizantes estudiados (anhídrido trifluoroacético, metil-cloroformato y acetilacetona), la acetilacetona fue el escogido debido a que fue el que proporcionó una mayor sensibilidad. La derivatización con acetilacetona en las metodologías existentes para la determinación de creatinina mediante GC-IDMS requieren el calentamiento de la muestra durante 66h a 85°C para conseguir una derivatización cuantitativa de la misma. Sin embargo, hemos llevado a cabo esta reacción de derivatización usando radiación microondas focalizada obteniendo una drástica reducción del tiempo de reacción. Además no se requiere un

rendimiento cuantitativo de la reacción de derivatización, ya que el uso de creatinina mínimamente marcada en ^{13}C minimiza la ocurrencia de efectos isotópicos.

Se probaron diferentes temperaturas (120°C , 170°C y 200°C) y diferentes tiempos de reacción (2, 4, 10 y 15 min). El mayor rendimiento se obtuvo con 170°C y 15 minutos de reacción, sin embargo se seleccionó un tiempo de reacción de 2 minutos debido a que se obtuvieron sensibilidades similares.

Por lo tanto, con la reducción en el tiempo de derivatización a tan solo 2 minutos y mediante el uso de creatinina mínimamente marcada en ^{13}C y regresión lineal múltiple con el cual se evita la construcción de un calibrado metodológico se consigue una determinación de creatinina en menos de 45 minutos, lo cual nos permitirá utilizar el método desarrollado en el análisis de muestra.

En la Figura 41 se muestra el espectro de masas de la creatinina derivatizada con acetilacetona, en el que se pueden observar dos clusters principales de masa 223 ($\text{C}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{H}_{17}$) y masa 150 ($\text{C}_8\text{H}_3\text{N}_{12}$).

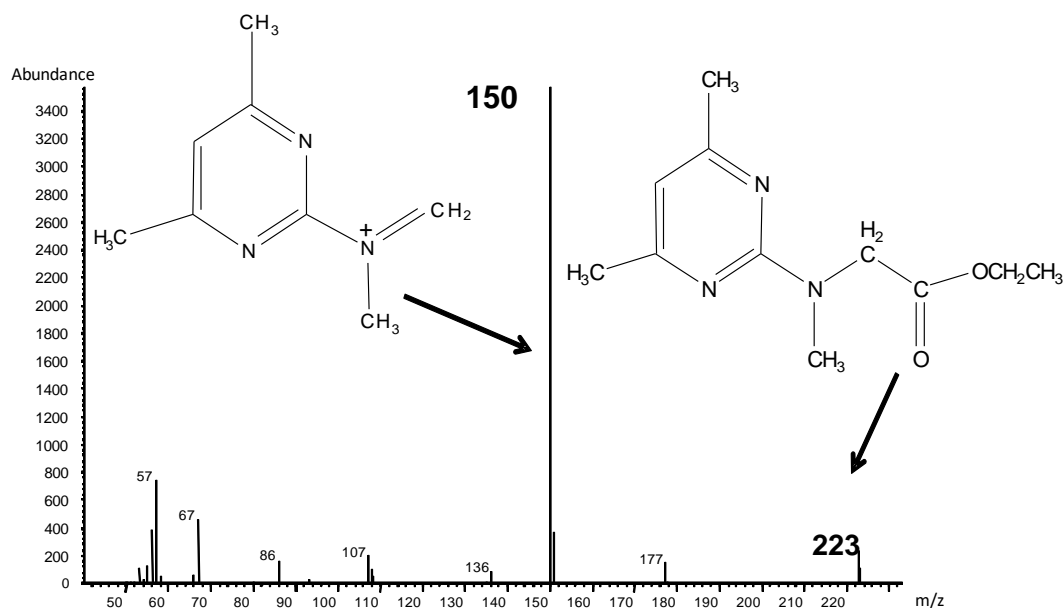


Figura 41: Espectro de masas de la Creatinina derivatizada en el que se pueden observar los dos clusters principales objeto de estudio.

Se evaluó la pureza espectral de ambos clusters seleccionando el cluster de masa 223 para llevar a cabo la cuantificación de creatinina debido a que resultó ser el más puro con un 0.8 % de contribución del ion $[\text{M}-1]^+$. Esta contribución se tuvo en cuenta antes de aplicar regresión lineal múltiple para corregir las abundancias isotópicas teóricas y poder obtener resultados con una mayor exactitud y precisión. Posteriormente se

caracterizó el trazador de $^{13}\text{C}_1$ creatinina en abundancia y concentración mediante IDMS inversa con una precisión del 0.3% RSD.

A continuación se evaluó la precisión del método desarrollado en términos de reproducibilidad y repetibilidad. Para el estudio de la repetibilidad se llevaron a cabo ocho medidas independientes en el mismo día, de un pool de suero no interferido por bilirrubina obteniendo una precisión de 1.1 % R.S.D. Esta precisión obtenida fue mejor que las especificaciones mínimas y deseables de variación biológica (4.5 y 3 % respectivamente). Para estudiar la reproducibilidad del método se realizaron seis medidas independientes en diferentes sesiones a lo largo de un periodo de veinte días del suero control liofilizado Precinorm U. Se obtuvo un valor de precisión de 1% R.S.D, el cual es del mismo orden de magnitud que el obtenido en los estudios de repetibilidad a similares niveles de concentración.

También se evaluó la exactitud del método mediante el análisis de dos materiales de referencia ERMDA-252a y ERMDA-253a consistentes en suero humano congelado certificado en creatinina. La concordancia entre el valor medido y el valor certificado unido a las buenas precisiones alcanzadas de 4.9% para el ERMDA-252a y de 0.2 % para el ERMDA-253a, validaron y demostraron la idoneidad del método desarrollado para el análisis de creatinina en suero humano.

Se demostró, además, si el método desarrollado cumple con los requisitos para ser aplicado como método de rutina, en términos de Imprecisión y Bias calculados en función de la variabilidad biológica para creatinina³⁰⁴. Los valores límite calculados de imprecisión y bias tomando como valor de variación biológica interindividual para creatinina (CV_g) 14.7 fueron $CV_{\text{rou}}=7.64\%$ y $\text{Bias}_{\text{rou}}= 3.67\%$. Esos fueron comparados con los valores de imprecisión y bias obtenidos del análisis de los dos materiales de referencia certificados: ERMDA-252a (CV=5.92% y Bias=2.04) y ERMDA-253a (CV=1.08% y Bias= 3.44%). De acuerdo a estos valores el método desarrollado cumple a la perfección las especificaciones necesarias para poder ser considerado como método de rutina en el análisis de creatinina.

Finalmente, se comparó la metodología desarrollada con otros dos procedimientos utilizados en el análisis de creatinina (Método de Jaffé y Método enzimático) tanto en muestras de suero humano interferidas y no interferidas por bilirrubina.

Primero se analizaron diez muestras de suero humano no interferidas por bilirrubina con concentraciones de creatinina entre 0.37 mg/dL y 14.8 mg/dL mediante el método de Jaffé y mediante la metodología desarrollada basada en GC-IDMS. Se comprobó que no

existen diferencias significativas entre ambos métodos en las muestras que presentan concentraciones de creatinina < 4 mg/dL, donde la desviación media es de tan solo -0.036 mg/dL con unos intervalos al 95% de confianza de -0.076 y 0.04 mg/dL. Sin embargo, en muestras con concentraciones > 5.6 mg/dL, el método de Jaffé presenta una desviación negativa relevante de -0.46 mg/dL con intervalos a un nivel de confianza del 95% de -0.683 y -0.241 mg/dL. Llevando a cabo el test de conjunto de resultados pareados se concluye que el método de Jaffé proporciona resultados significativamente diferentes a los proporcionados mediante la metodología desarrollada en muestras que presentan con una concentración de creatinina > 5.6 mg/dL. Estos resultados concuerdan con otros previamente descritos^{159,305,306}, donde el uso de los métodos enzimáticos en el análisis de rutina de creatinina es cada vez más recomendado.

A continuación se analizaron diecinueve muestras de suero interferidas por bilirrubina mediante el método de Jaffé y mediante la metodología desarrollada basada en GC-IDMS donde el rango de concentraciones de creatinina estaba comprendido entre 0.5 y 3.7 mg/dL y la concentración de bilirrubina en las mismas se encontraba entre 6 y 49 mg/dL. En la Figura 42A se puede observar que la desviación media entre ambos métodos es de solo -0.028 mg/dL con unos intervalos al 95% de confianza de -0.087 y 0.031 mg/dL. Realizando el test de conjunto de resultados pareados se pudo establecer que el método de Jaffé no presenta una interferencia significativa por bilirrubina, independientemente de la concentración de bilirrubina en la muestra. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en muestras no interferidas en el mismo rango de concentraciones de creatinina. Además, en doce de estas diecinueve muestras de suero interferidas por bilirrubina el método enzimático fue comparado con la metodología desarrollada basada en GC-IDMS. En la Figura 42B se muestra la desviación media entre ambos métodos que es de -0.16 mg/dL con unos intervalos al 95% de confianza de -0.088 y -0.0224 . Esta desviación es seis veces mayor que la proporcionada por el método de Jaffé y es demostrado mediante el test de conjunto de resultados pareados que el método enzimático presenta una interferencia negativa significativa por bilirrubina.

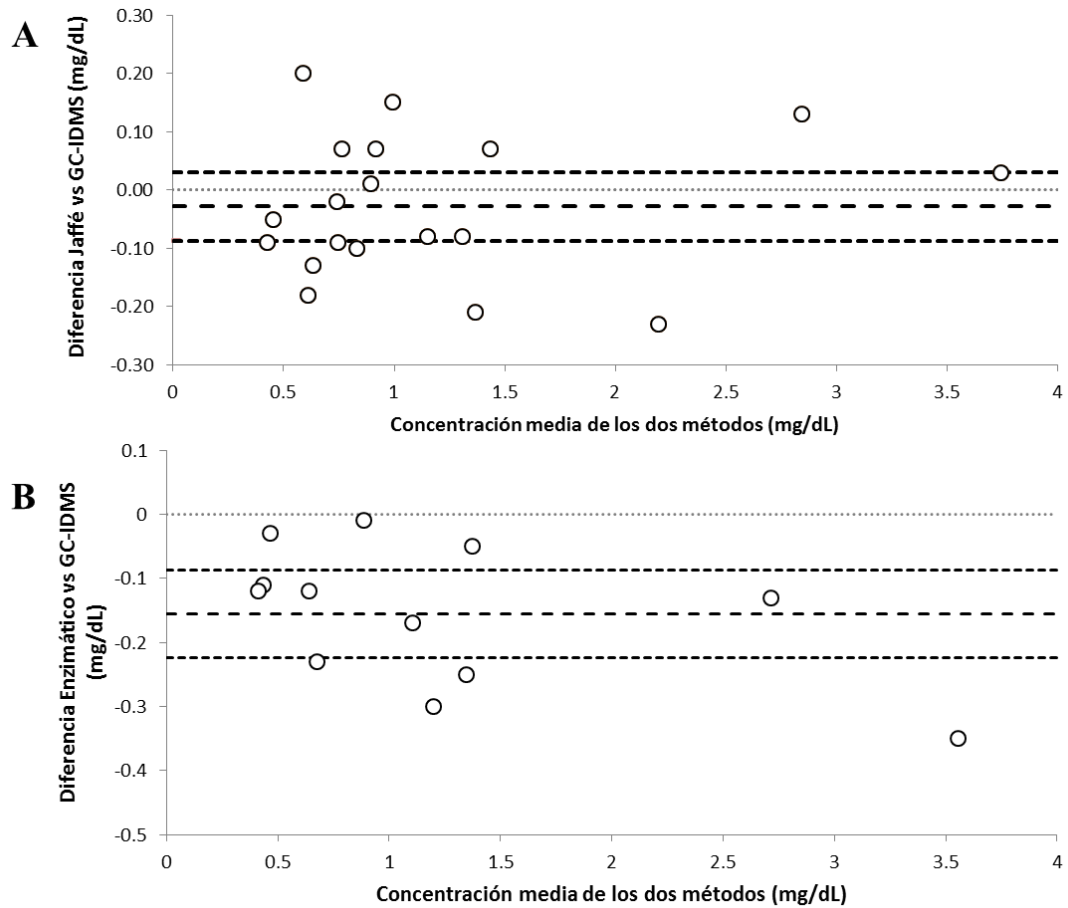


Figura 42: A) Diagrama Bland-Altman en el que se muestra la diferencia relativa entre la metodología desarrollada basada en GC-IDMS y el método de Jaffé en muestras interferidas por bilirrubina. B) Diagrama Bland-Altman en el que se muestra la diferencia relativa entre la metodología desarrollada basada en GC-IDMS y el método enzimático en muestras interferidas por bilirrubina. En ambas figuras la desviación media y los correspondientes intervalos al 95 % de confianza se representan con líneas punteadas.

Aunque más caro que el método de Jaffé, los métodos enzimáticos son actualmente los más recomendados para el análisis de creatinina debido a que se encuentran menos interferidos. Sin embargo, nuestros resultados muestran lo contrario en las muestras que se encuentran interferidas por bilirrubina, donde se ha obtenido una interferencia negativa seis veces mayor en los métodos enzimáticos que en el método de Jaffé. Estos resultados se encuentran en consonancia con estudios previos donde se demuestran que la interferencia negativa por bilirrubina en los métodos enzimáticos es mayor que la producida en el método de Jaffé^{136,139,307}.

Esta contrariedad en los resultados proporcionados en la determinación de creatinina en muestras interferidas por bilirrubina refleja la necesidad de un método fiable y exacto, como alternativa a los métodos de rutina existentes en este tipo de muestras. En este

primer capítulo hemos comprobado la capacidad del método desarrollado basado en marcaje mínimo en ^{13}C de creatinina y regresión lineal múltiple, nos permite realizar la cuantificación de creatinina en muestras de suero humano con un gran exactitud y precisión al disminuir los efectos isotópicos, utilizando una instrumentación convencional como es GC-EI-MS y sin necesidad de construir rectas de calibrado. Esto supone un ahorro considerable de tiempo de análisis, haciendo idónea la metodología para implementarla en análisis de rutina en muestras interferidas por bilirrubina donde su análisis mediante los métodos existentes pudiera dar a errores en la determinación de la concentración de creatinina.

Tanto en la metodología desarrollada en el **artículo I** basada en GC-EI-MS, así como el resto de métodos existentes basados en ID-MS para la determinación de creatinina (Métodos de referencia), no están controladas todas las posibles fuentes de error debido a que en ninguno de los mismos, se contempla la posibilidad de interconversión creatina-creatinina, que daría lugar a desviaciones en la concentración de creatinina.

Para ello, basándonos en la estrategia desarrollada con éxito en el **artículo I** basada en el uso de trazadores isotópicos mínimamente marcados en ^{13}C y regresión lineal múltiple, nos planteamos evaluar su capacidad en determinar y corregir las posibles interconversiones creatina-creatinina.

Así en el **artículo II** se desarrolló, por primera vez una metodología basada en el uso de trazadores isotópicos múltiples mínimamente marcados en ^{13}C ($^{13}\text{C}_1$ -Creatinina y $^{13}\text{C}_2$ -Creatina) y HPLC-ESI-MS-MS para la determinación de las posibles interconversiones creatina-creatinina. Para la medida de la composición isotópica de creatina y creatinina mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se utilizó un modo de adquisición SRM a baja resolución para la medida de iones precursores descrito en la sección C.3.2. La combinación del marcaje mínimo del compuesto con la metodología basada en la disminución de la resolución en el primer cuadrupolo es ideal porque se asegura la transmisión completa del cluster molecular del ion precursor con una gran exactitud y precisión.

En primer lugar se caracterizó en abundancia y concentración los diferentes trazadores isotópicos ($^{13}\text{C}_1$ -Creatinina y $^{13}\text{C}_2$ -Creatina) mediante ID-MS inversa, obteniendo en ambos trazadores una precisión del 0.1% R.S.D.

A continuación se evaluó la precisión de la metodología desarrollada en términos de reproducibilidad. Para ello se realizaron nueve medidas independientes en tres sesiones a lo largo de un periodo de dieciocho días, de dos sueros control liofilizados

(Precicontrol Multi1 y Precicontrol Multi 2). Se obtuvieron valores de precisión de 3.7 y 3.3 % para creatinina y creatina respectivamente en el suero Precicontrol Multi1 y de 3 y 3.6 % para creatinina y creatina en el suero Precicontrol Multi 2. En ambos sueros control se observó una conversión de creatina a creatinina de aproximadamente el 3% mientras que la reacción opuesta se puede considerar despreciable.

Se evaluó, además la exactitud del método mediante el análisis de tres sueros control liofilizados adicionales y dos materiales de referencia ERM-DA-252a y ERM-DA253a consistentes en suero humano congelado certificado en creatinina. Como se puede observar en la Tabla 6 existe total concordancia entre el valor medido y el valor certificado en todos los casos y las precisiones obtenidas variaron en el rango de 0.1-0.9% R.S.D para creatinina y 0.6-3.5% para creatina. Los valores de interconversión obtenidos, muestran una interconversión constante de creatina a creatinina, mientras que la reacción inversa se puede considerar despreciable.

Tabla 6: Comparación del valor certificado de creatinina (mg/dL) en los sueros control liofilizados: Precinorm, Precipath and Calibrator CREJ2 y en los materiales de referencia certificados: ERM-DA252a and ERM-DA253a (suero humano congelado) con los valores experimentales de creatina y creatinina obtenidos mediante doble trazador isotópico y LC-MS/MS (in mg/dL). Se muestran también los factores de interconversión F1 (%creatina-creatinina) y F2 (%creatinina-creatina).

Muestra	Valor certificado creatinina	Rango certificado	Creatinina (mg/dL)	Creatina (mg/dL)	F1 (% Creatina a Creatinina)	F2 (% Creatinina a Creatina)
Precinorm	1.21	1.00-1.42	1.18 ± 0.01	0.33 ± 0.01	3.06 ± 0.05	-0.58 ± 0.01
Precipath	4.05	3.33-4.75	3.96 ± 0.01	4.08 ± 0.01	3.27 ± 0.61	0.57 ± 0.13
CREJ2	4.06	4.01-4.12	4.01 ± 0.03	1.75 ± 0.02	2.91 ± 0.05	0.16 ± 0.01
ERM-DA252a	0.310	0.260-0.360	0.317 ± 0.002	0.096 ± 0.001	2.47 ± 0.15	-0.09 ± 0.01
ERM-DA253a	5.000	4.800-5.200	4.985 ± 0.066	0.426 ± 0.007	2.72 ± 0.04	-0.45 ± 0.03

Esta pequeña interconversión creatina-creatinina observada puede ser atribuida a la reconstitución final de la muestra en la fase móvil, debido a que es la única etapa de preparación de muestra en la que se produce un cambio de pH.

A continuación, para el análisis de seis muestras reales de suero humano, se combinó el uso de trazadores isotópicos mínimamente marcados (¹³C₁-Creatinina y ¹³C₂-Creatina), junto con la metodología desarrollada en este **artículo II** para el análisis de creatina y creatinina mediante HPLC-ESI-MS/MS y la metodología desarrollada en el **artículo I** para el análisis de creatinina mediante GC-EI-MS. Siguiendo la estrategia que se

muestra en la Figura 43, además de determinar las posibles interconversiones creatina-creatinina durante el tratamiento de muestra para el análisis mediante LC-MS/MS, nos permite determinar si existen interconversiones creatina-creatinina durante el procedimiento de separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) incluido en el tratamiento de muestra para el análisis de creatinina mediante GC-MS, y además nos permitirá comprobar si esta separación creatina-creatinina mediante SPE es o no cuantitativa. Una separación cuantitativa de creatina y creatinina es esencial ya que ambos compuestos producen el mismo derivado en todos los procedimientos de derivatización típicos del análisis de creatinina mediante GC-MS^{98,164}.

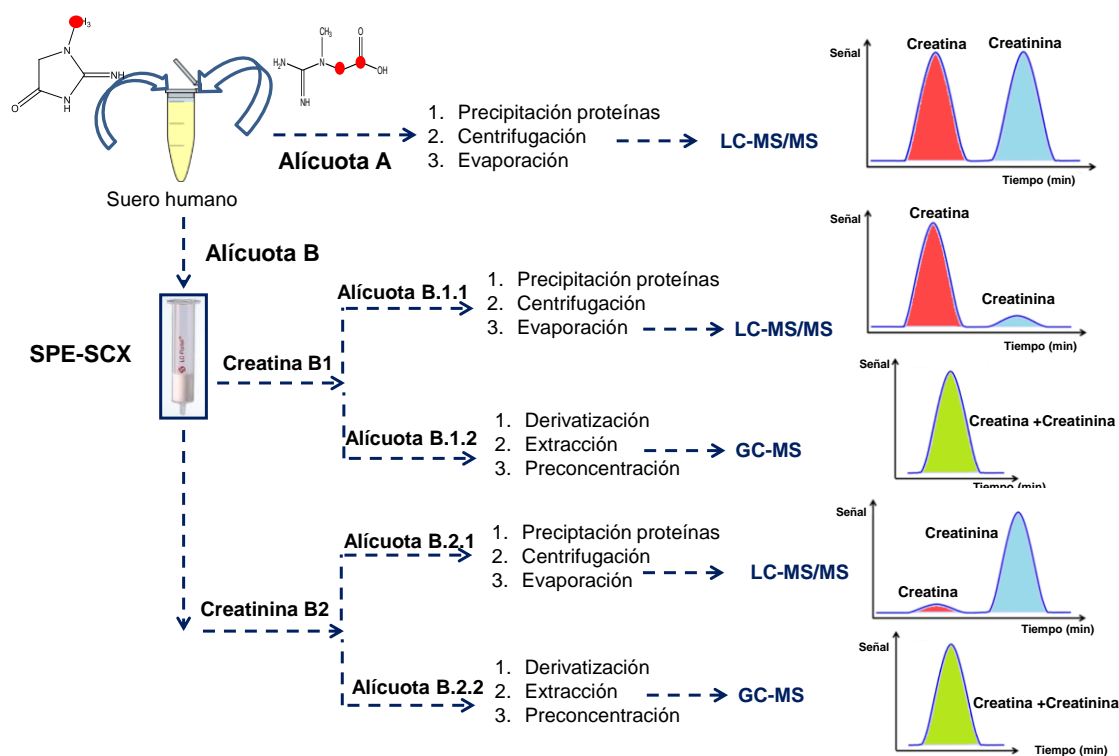


Figura 43: Diagrama que describe el protocolo utilizado para la evaluación de la interconversión durante el procedimiento de muestra mediante LC-MS/MS y GC-MS y durante el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) requerido en los procedimientos basados en GC-MS.

En primer lugar, los resultados obtenidos del análisis de la Alícuota A nos proporcionarán los factores de interconversión en la determinación mediante LC-MS/MS. Los valores obtenidos en las seis muestras, muestran una conversión creatina-creatinina (F1) entre el 1 y el 9% mientras que no se detectó conversión creatinina-creatina. Estos resultados demostraron al contrario que lo ocurrido en los sueros

liofilizados y en los materiales de referencia certificados, que la conversión creatina-creatinina es dependiente de la matriz. Además, esta conversión en dos de las seis muestras analizadas que contienen cantidades similares de creatina y creatinina (~3-4 mg/dL) podría dar lugar a desviaciones significativas en la determinación de creatinina si esta interconversión no se corrige. Los valores de precisión obtenidos fueron comparables con los obtenidos en el análisis de los sueros control y materiales de referencia (valores de R.S.D entre 0.5 y 1.6%).

Del análisis mediante LC-MS/MS de las alícuotas B.1.1 y B.2.1 de creatina y creatinina respectivamente eluídas de los cartuchos de extracción en fase sólida obtendremos información de las interconversiones producidas durante la etapa de separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE). En la mayoría de las muestras, no se detectó pico de creatinina en la alícuota B.1.1 y lo mismo se puede decir para la creatina en la alícuota B.2.1. En ambos casos, los factores de conversión se consideraron despreciables y se calculó la concentración de creatina y creatinina como si solo se hubiera utilizado trazador isotópico sencillo. Las concentraciones obtenidas fueron concordantes con los valores obtenidos en la alícuota A. Únicamente en una de las seis muestras analizadas, en la alícuota B.2.1 se encontraron cantidades detectables de creatina y se pudo y se pudo aplicar los cálculos basados en doble trazador isotópico, los cuales proporcionaron los mismos valores de concentración y de factores de interconversión que los obtenidos en el análisis mediante LC-MS/MS en la alícuota A, demostrando la ausencia de interconversión durante la separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE).

Por último, mediante el análisis de las alícuotas B.1.2 y B.2.2 se evaluó la eficacia de separación “off-line” de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE). Estas alícuotas B.1.2 y B.2.2 de creatina y creatinina respectivamente eluídas de los cartuchos SPE fueron inyectadas independientemente y analizadas mediante GC-MS. Los resultados fueron tratados de dos maneras: mediante trazador isotópico sencillo calculando la concentración de creatinina y creatina de manera independiente en cada fracción o mediante doble trazador isotópico juntando las fracciones B.1.2 y B.2.2 como si fueran un único Cromatograma. De esta manera los factores de interconversión reflejarán la eficiencia del procedimiento de separación mediante extracción en fase sólida (SPE) ya que anteriormente se ha descartado la presencia de interconversiones en dicho proceso de separación. En tres de las seis muestras estudiadas se encontró una separación no cuantitativa de creatina y creatinina, ya que un 22 %, 33 % y 7.5 % de

creatina se encontró en la fracción de creatinina. En estas tres muestras, si comparamos los resultados obtenidos mediante trazador isotópico sencillo y GC-MS con los obtenidos mediante doble trazador isotópico y LC-MS/MS en los dos primeros casos nos encontramos con sobreestimaciones en la concentración de creatinina del 28% y del 9 %, mientras que en el caso de la muestra con un 7.5 % de no separación, no se encontró sobreestimación en la concentración de creatinina (debido a que la concentración de creatina en la muestra es muy baja ~0.25 mg/dL). Sin embargo, otra muestra analizada en la que se obtuvo una presencia de 2.31 % de creatina en la fracción de creatinina, se encontró una sobreestimación en la concentración de creatinina de un 10 %, debido a la gran cantidad de creatina presente en la muestra (3.44%).

Por lo tanto cuando la separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) no es cuantitativa, la sobreestimación en la concentración de creatinina en los métodos basados en GC-ID-MS utilizando trazador isotópico sencillo, no solo dependerá de la eficacia de la separación, sino de la concentración de creatina en la muestra analizada.

Los resultados de este segundo capítulo demostraron la utilidad de los trazadores mínimamente marcados en ^{13}C , en la determinación y corrección de las interconversiones entre compuestos orgánicos. La metodología desarrollada basada en doble trazador isotópico mínimamente marcado y regresión lineal múltiple nos permite determinar de manera simultánea y con gran exactitud y precisión las concentraciones de creatina y creatinina, además de corregir las posibles interconversiones que ocurran durante el procedimiento de tratamiento de muestra. Esta metodología corrige todas las posibles fuentes de error, pudiendo ser evaluado en un futuro como método de referencia en la determinación de la concentración de creatinina. Además se demostró, que la separación de creatina y creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) típica de los métodos basados en GC-ID-MS debe realizarse de manera muy cuidadosa, ya que de lo contrario podría dar lugar a estimaciones por exceso en la concentración de creatinina, especialmente en muestras con altos contenidos de creatina.

Una vez que se evaluó con éxito el uso de compuestos orgánicos enriquecidos isotópicamente en ^{13}C y regresión lineal múltiple en el campo de la Química Clínica, en el desarrollo de nuevas metodologías para el análisis de creatinina mediante GC-MS y HPLC-ESI-MS/MS, nos planteamos su aplicación al campo de la Metabolómica, tanto en el estudio de las rutas metabólicas como en el estudio de la biosíntesis de proteínas.

El uso de compuestos orgánicos enriquecidos en ^{13}C juega un papel clave y esencial en el estudio de las rutas metabólicas y sus regulaciones, ya que aprovechando las diferencias metabólicas existentes entre las células sanas y las cancerígenas (proliferación celular, invasión local, metástasis, Efecto “Warburg”) el marcaje en ^{13}C de las mismas nos permitirá identificar cambios en las rutas metabólicas en células cancerígenas de diferentes tipos de cáncer.

La estrategia de marcaje con ^{13}C utilizada se conoce con el nombre de “Huella dactilar de ^{13}C ”²⁴⁸. La etapa clave de esta metodología es la medida de la distribución isotópica en los metabolitos intracelulares marcados en ^{13}C mediante espectrometría de masas. Esta medida debe ser muy exacta y muy precisa para poder establecer las rutas metabólicas con gran precisión.

Con la metodología desarrollada en el *artículo III* basada en GC-MS y regresión lineal múltiple se persiguió obtener una medida más exacta y precisa de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares que las metodologías existentes. La principal novedad de esta metodología basada en regresión lineal múltiple radica en el cálculo de las abundancias teóricas de todos los posibles isotopólogos natural y marcados en ^{13}C de cada metabolito objeto de estudio haciendo uso de la pureza del cluster objeto de estudio (Sección C.3.1.5), y en donde además se ha utilizado el valor exacto de enriquecimiento en ^{13}C calculado de manera experimental, como se ha explicado en la Sección C.3.1.6, sin asumir el proporcionado por el fabricante, consiguiendo de esta manera una medida exacta y precisa de la distribución isotópica.

Esta metodología se aplicó a líneas celulares sanas y de cáncer de próstata (andrógeno dependientes e independientes) a las que se les ha añadido 2- ^{13}C -Glucosa. En primer lugar, se evaluó la pureza del cluster molecular sobre el que se van a realizar las medidas para los veintiocho metabolitos intracelulares objeto de estudio identificados mediante GC-MS, previa extracción y derivatización de los mismos. Como ya se comentó anteriormente para poder aplicar la regresión lineal múltiple y realizar una correcta medida de las abundancias isotópicas es necesario evaluar detalladamente la pureza del cluster molecular sobre el que se realizan las medidas.

Tabla 7: Pureza espectral de los clúster objeto de estudio para los diferentes metabolitos intracelulares en la fuente de ionización electrónica (EI).

Metabolitos	Cluster (m/z)	Fórmula del fragmento	M+	M-H+	M-2H+	M+H+
Aminoácidos						
L-Prolina	284-293	C ₁₃ H ₂₈ NO ₂ Si ₂	99.35±0.20	0.29±0.03	0.55±0.08	-----
L-Metionina	318-327	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂ S	99.84±0.08	0.13±0.01	0.21±0.01	-----
L-Lisina	429-438	C ₂₀ H ₄₇ N ₂ O ₂ Si ₃	97.56±0.06	1.76±0.04	0.68±0.11	-----
L-Cisteína	404-413	C ₁₇ H ₄₀ NO ₂ Si ₃ S	100.05±0.02	-----	-----	-----
L-Tirosina	464-476	C ₂₃ H ₄₄ NO ₃ Si ₃	99.56±0.05	0.16±0.01	0.44±0.08	-----
L-Glutamato	430-439	C ₁₉ H ₄₂ NO ₄ Si ₃	99.55±0.31	0.09±0.01	0.16±0.01	-----
L-Valina	286-295	C ₁₃ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	99.21±0.07	0.45±0.13	0.17±0.02	-----
L-Aspartato	416-425	C ₁₈ H ₄₀ NO ₄ Si ₃	99.46±0.27	0.21±0.02	0.26±0.07	-----
L-Leucina	300-309	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	99.14±0.14	0.22±0.02	0.20±0.03	0.24±0.04
L-Isoleucina	300-309	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂ Si ₂	99.45±0.05	0.22±0.01	0.13±0.01	0.18±0.06
L-Fenilalanina	334-346	C ₁₇ H ₃₀ NO ₂ Si ₂	99.43±0.19	0.19±0.02	0.26±0.03	-----
Glicina	244-253	C ₁₀ H ₂₄ NO ₂ Si ₂	97.59±0.57	0.49±0.04	0.12±0.02	1.70±0.42
L-Serina	388-397	C ₁₇ H ₄₀ NO ₃ Si ₃	99.10±0.23	0.25±0.03	0.40±0.08	-----
L-Treonina	402-411	C ₁₈ H ₄₂ NO ₃ Si ₃	99.82±0.04	0.34±0.01	0.26±0.02	-----
L-Alanina	258-267	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	99.82±0.11	0.20±0.02	-----	-----
β-Alanina	258-267	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	96.93±0.09	0.10±0.01	2.90±0.09	-----
Ácidos orgánicos						
Urea	229-238	C ₉ H ₂₃ N ₂ O ₂ Si ₂	99.49±0.10	0.16±0.01	0.03±0.01	0.24±0.09
Succinato	287-296	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ Si ₂	99.51±0.18	0.13±0.01	0.07±0.01	0.24±0.08
Fumarato	285-294	C ₁₂ H ₂₃ O ₄ Si ₂	98.64±0.31	0.37±0.16	0.04±0.03	0.94±0.18
Malato	417-426	C ₁₈ H ₃₉ O ₅ Si ₃	99.96±0.05	0.14±0.01	0.21±0.01	-----
Citrato	457-466	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ Si ₃	99.60±0.20	0.20±0.01	0.20±0.01	-----
Lactato	259-268	C ₁₁ H ₂₅ O ₃ Si ₂	99.87±0.08	0.13±0.03	-----	-----
Ribulosa 5P	381-390	C ₁₃ H ₂₈ O ₇ Si ₂ P	91.70±0.60	0.10±0.01	0.10±0.01	6.20±0.60
Ácidos grasos						
Ácido láurico	255-264	C ₁₄ H ₂₉ O ₂ Si	99.52±0.07	0.25±0.04	0.33±0.04	-----
Ácido mirístico	283-292	C ₁₆ H ₃₃ O ₂ Si	99.55±0.05	0.04±0.01	0.46±0.03	-----
Ácido palmítico	311-320	C ₁₈ H ₃₇ O ₂ Si	98.36±0.19	0.05±0.01	0.50±0.03	0.86±0.17
Ácido esteárico	339-348	C ₂₀ H ₄₁ O ₂ Si	97.59±0.19	0.04±0.01	0.65±0.02	1.56±0.20
Colesterol	441-450	C ₂₉ H ₅₁ O ₂ Si	95.89±0.19	0.33±0.05	0.46±0.04	2.34±0.21

En la Tabla 7 se muestran los factores de fragmentación obtenidos en porcentaje para todos los compuestos estudiados. La mayor contribución en todos los clusters se debe al ion M+ y las contribuciones debido a la pérdida de átomos de hidrógeno (M-H⁺, M-2H⁺) y a la ganancia de átomos de hidrógeno (M+H⁺) son muy pequeñas excepto para: L-Lisina donde la contribución del M-H⁺ es aproximadamente 2%, la β-Alanina donde la contribución del M-H⁺ es aproximadamente del 3%; la glicina donde la contribución del M+H⁺ se encuentra sobre el 2% y de especial interés es la Ribulosa-5-Fosfato donde la

contribución del $M+H^+$ alcanza incluso el 6%. Destacar también, el caso de los ácidos grasos en los cuales a medida que aumenta el número de átomos de carbono en el compuesto, aumenta la contribución de $M+H^+$ alcanzando en el caso del colesterol un 2.5%.

A continuación se calculó el enriquecimiento en ^{13}C , tanto en el sustrato específico añadido a las líneas celulares objeto de estudio ($2-^{13}C$ -Glucosa), así como en el resto de compuestos orgánicos enriquecidos en ^{13}C utilizados para llevar a cabo la validación de la metodología utilizando el procedimiento descrito anteriormente en la Sección C.3.1.6. Los valores de precisión fueron excelentes (0.1-0.2% R.S.D) para todos los compuestos. Destacar que los enriquecimientos obtenidos difieren del proporcionado por el fabricante, por lo tanto la incorporación de estos valores calculados experimentalmente, en el cálculo de las abundancias isotópicas teóricas de los diferentes isotopólogos para cada metabolito intracelular, nos proporcionará que la medida de la distribución isotópica sea mucho más exacta y precisa que si en los cálculos se incorporara el valor genérico del 99%, y sin ninguna incertidumbre, de enriquecimiento en ^{13}C proporcionado por el fabricante.

Antes de aplicar la metodología desarrollada en las líneas celulares objeto de estudio, esta fue validada con el objetivo de asegurar la exactitud y precisión en la medida de la distribución isotópica. Se validó con éxito de dos maneras diferentes: **a)** Mediante comparación entre fracciones molares teóricas y las experimentales calculadas con la metodología desarrollada en diferentes mezclas de Glucosa natural y diferentes Glucosas marcadas en diferentes átomos de ^{13}C , donde la fracción molar de Glucosa natural se mantuvo constante entre 18-19%, mientras que la fracción molar de los análogos marcados en ^{13}C se variaron entre 10-40%. Los resultados obtenidos mediante GC-MS y regresión lineal múltiple en todas las mezclas concuerdan perfectamente con los valores de fracción molar teórica calculados de manera gravimétrica. Los valores de desviación obtenidos fueron de 0.1-0.3%.

Debido al bajo valor de fracción molar esperado para los análogos marcados en muestras reales se llevó a cabo una validación adicional para identificar el mínimo valor de incorporación de ^{13}C que se puede calcular de manera exacta con la metodología desarrollada. En ella, los valores de fracción molar de los análogos marcados en ^{13}C se variaron entre 0.015 y 4%. Los resultados observados para todos los isotopólogos concuerdan perfectamente hasta aproximadamente 0.05 % de glucosa marcada. Cabe resaltar, que para los isotopólogos marcados en $^{13}C_3$ y $^{13}C_5$ concuerdan en todo el rango

de valores de fracción molar estudiados. Sin embargo, para los isotopólogos $^{13}\text{C}_1$ y $^{13}\text{C}_2$ no se pueden obtener de una manera exacta valores de fracción molar de 0.037 % y 0.015 %. Estos resultados sugieren que la exactitud obtenida para la incorporación de ^{13}C a niveles muy bajos depende del número de átomos de ^{13}C en el análogo marcado.

A continuación se estudió la mínima cantidad de fracción molar para los análogos de Glucosa marcados en ^{13}C en mezclas binarias. Para ello se prepararon dos tipos de mezclas adicionales: 1) Mezclas de Glucosa natural y Glucosa marcada en un átomo de ^{13}C y 2) Mezclas de Glucosa natural y Glucosa marcada en todos los átomos de ^{13}C , donde la fracción molar del análogo marcado varió entre 0.015 y 0.35 %.

En ambos casos (*Tabla 8*), el procedimiento desarrollado proporciona valores exactos medidos experimentalmente cuando el valor de fracción molar es mayor de 0.07%. Cuando se usa el análogo marcado en $^{13}\text{C}_6$, aunque no están en concordancia, los valores experimentales obtenidos son muchos parecidos a los valores teóricos. Y además, el valor de desviación estándar, para el valor de fracción molar de 0.07% cuando se usa Glucosa marcada en todos los átomos de ^{13}C (0.0022) es diez veces menor que cuando se usa Glucosa marcada en un átomo de ^{13}C (0.022). Esto demuestra, que la influencia del número de átomos de ^{13}C , afecta no solo a la exactitud sino también a la precisión en la medida de las fracciones molares.

Otros procedimientos descritos en la literatura, son capaces de validar valores de fracción molar en el rango de 1.7 % y 0.3 %, por lo tanto nuestros valores validados de fracción molar de 0.07%, son los valores más bajos de fracción molar validados que se reportan en la literatura.

Tabla 8: Comparación de las fracciones molares teóricas con las fracciones molares calculadas experimentalmente con la metodología desarrollada en mezclas de Glucosa natural y Glucosa 2-¹³C y en mezclas de Glucosa natural y Glucosa-¹³C₆.

Mezclas de Glucosa natural y Glucosa-2- ¹³ C		X ¹³ C ₁ (%)
1	Teórica	0.3830±0.0049
	Experimental	0.3150±0.0648
2	Teórica	0.1540±0.0019
	Experimental	0.1833±0.0548
3	Teórica	0.0778±0.0010
	Experimental	0.0650±0.0220
4	Teórica	0.0369±0.0005
	Experimental	-0.2483±0.1144
5	Teórica	0.0148±0.0002
	Experimental	-0.2640±0.0840
Mezclas de Glucosa natural y Glucosa- ¹³ C ₆		X ¹³ C ₅ (%)
1	Teórica	0.3692±0.0047
	Experimental	0.3503±0.0143
2	Teórica	0.1565±0.0020
	Experimental	0.1574±0.0082
3	Teórica	0.0738±0.0009
	Experimental	0.0717±0.0022
4	Teórica	0.0349±0.0004
	Experimental	0.0167±0.0114
5	Teórica	0.0146±0.0002
	Experimental	0.0032±0.0067

Este tipo de validación también se llevó a cabo en diferentes mezclas de Glicina natural y análogos marcados en uno y dos átomos de ¹³C, donde la fracción molar de Glicina natural se varió entre 20 y 99 %, mientras que la fracción molar de los análogos marcados en ¹³C se variaron entre 1 y 50 %. Los resultados obtenidos mediante GC-MS y regresión lineal múltiple en los diferentes tipos de mezclas concuerdan perfectamente con los valores de fracción molar teórica calculados graviméricamente.

Con el objetivo de mimetizar los valores de fracción molar esperados en muestra real se prepararon dos grupos de mezclas adicionales: 1) Mezclas de Glicina natural y Glicina marcada en un átomo de ¹³C y 2) Mezclas de Glicina natural y Glicina marcada en dos átomos de ¹³C. En todas ellas, los valores de fracción molar de los análogos marcados en ¹³C se variaron entre 0.1 y 0.7 %. Los resultados obtenidos (muestran que nuestro método no es capaz de proporcionar valores exactos de fracción molar menores de 0.7

% en ambos tipos de muestra. Estos resultados muestran que la mínima cantidad de incorporación de ^{13}C detectada en este metabolito intracelular, es diez veces superior a la obtenida para la Glucosa. Una posible razón para este resultado, es que el cluster escogido para la medida de la Glucosa es puro, mientras que la pureza espectral de la Glicina muestra la presencia de un 2% del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ con una alta incertidumbre experimental, la cual se traslada a las medidas de fracción molar calculadas, en particular a las mezclas de Glicina natural y Glicina marcada en un átomo de ^{13}C .

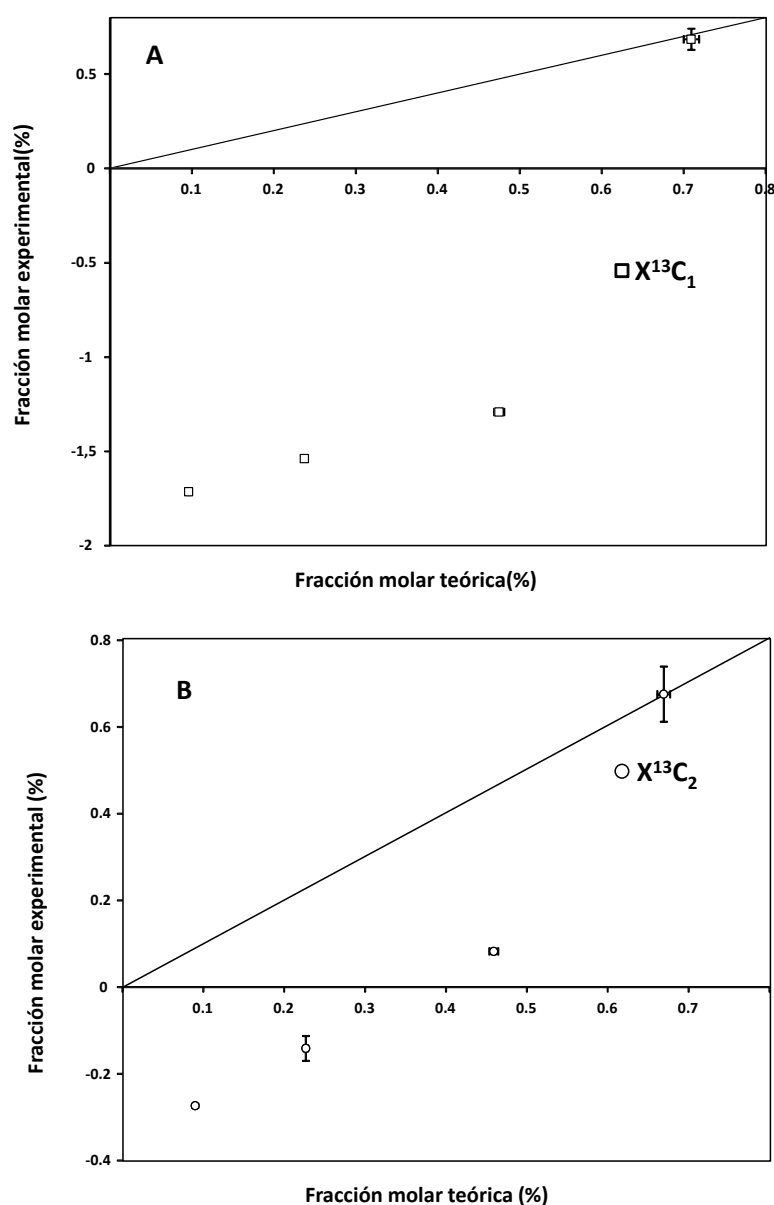


Figura 44: Comparación de las fracciones molares teóricas con las fracciones molares calculadas experimentalmente con la metodología desarrollada en mezclas de A) Glicina natural y Glicina-2- ^{13}C y B) Glicina natural y Glicina- $^{13}\text{C}_2$.

b) Mediante comparación de los resultados obtenidos mediante GC-MS y regresión lineal múltiple y los obtenidos mediante GC-C-IRMS en función de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en mezclas de Glucosa natural y diferentes Glucosas marcadas en diferentes átomos de ^{13}C donde como se puede observar en la Figura 45 existe una perfecta concordancia entre los mismos y en donde los resultados obtenidos mediante la metodología desarrollada alcanzaron niveles de precisión del 0.001-0.21 % R.S.D, mejores a los obtenidos en la medida de la relación isotópica de carbono mediante GC-C-IRMS (0.3-2.5%).

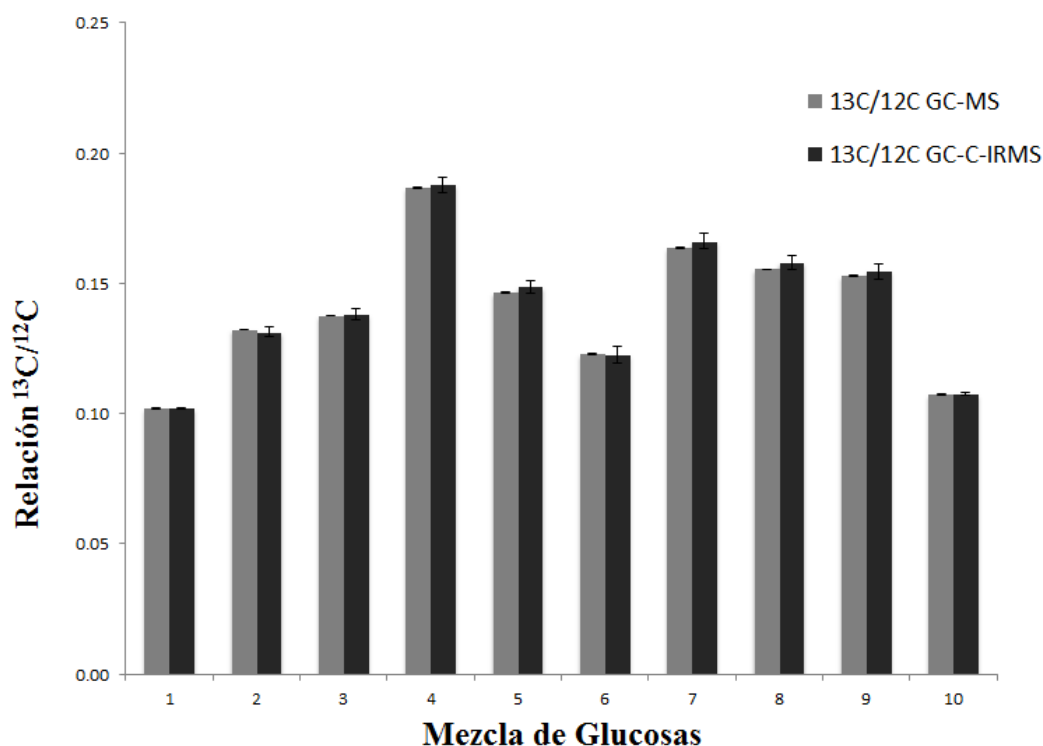


Figura 45: Comparación de los resultados obtenidos mediante GC-MS y GC-C-IRMS en función de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Además este tipo de validación se llevó a cabo en muestras reales de cuatro de las líneas celulares estudiadas (PNT1A, PC3, LNcap, MOCK). Esta validación se llevó a cabo en cuatro de los metabolitos intracelulares estudiados (Serina, Malato, L-Aspartato, L-Glutamato). Estos metabolitos fueron escogidos debido a que los picos cromatográficos obtenidos en el GC-C-IRMS no estaban interferidos, poseían una buena resolución (condición indispensable para conseguir una medida exacta y precisa de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) además de poseer una alta incorporación de ^{13}C . Los resultados obtenidos mediante las dos técnicas concuerdan perfectamente para los cuatro metabolitos

intracelulares en las cuatro líneas celulares con precisiones entre el 0.8-12.9% R.S.D en los resultados obtenidos mediante GC-MS y regresión lineal múltiple en función de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Debido a que GC-C-IRMS es una técnica instrumental altamente específica en la medida de relaciones isotópicas de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), se puede asegurar que con la metodología desarrollada se alcanza una gran exactitud y precisión en la medida de la distribución isotópica.

Por último, se demostró la aplicación potencial de la metodología desarrollada a la medida de la distribución isotópica en los veintiocho metabolitos intracelulares objeto de estudio en siete líneas celulares sanas y enfermas de cáncer de próstata las cuales comprenden los tres estadios en el desarrollo del cáncer (sano, inicio del cáncer y metástasis). La incorporación de ^{13}C se observó en 16 de los 28 metabolitos estudiados, observando además en cinco de ellos (L-Alanina, Glicina, Serina, Fumarato, Succinato) diferencias en el marcaje en ^{13}C entre líneas celulares. Esas diferencias en el marcaje en ^{13}C nos permitió identificar cambios en las rutas metabólicas en función del grado de desarrollo del tumor, lo que nos condujo a fenotipos alterados en las células de cáncer de próstata (en los que está implicado el gen supresor de tumores P53). Estos estudios constituyen el inicio de diferentes estudios de respuesta de esas células a diferentes fármacos, que en un futuro puedan revelar grandes resultados en “terapias diana personalizadas” en la lucha contra el cáncer.

En este tercer capítulo de Tesis se ha demostrado que la metodología desarrollada basada en GC-MS y regresión lineal múltiple, donde se tiene en cuenta la pureza espectral del cluster y el enriquecimiento exacto en ^{13}C calculado experimentalmente en el cálculo de las composiciones isotópicas teóricas de los diferentes isotopólogos, permite una medida exacta y precisa de la distribución isotópica en los diferentes metabolitos intracelulares objeto de estudio permitiendo establecer con gran precisión las rutas metabólicas desde el substrato específico marcado en ^{13}C añadido a los cultivos celulares (2- ^{13}C -Glucosa) a los diferentes metabolitos intracelulares.

Una vez que se ha evaluado con éxito la aplicación de la regresión lineal múltiple al estudio de la comprensión de las rutas metabólicas, se evaluó en otro campo importante de estudio dentro de la Metabolómica: la biosíntesis de proteínas.

En la actualidad, la estrategia más usada para el estudio de la biosíntesis de proteínas utilizando isótopos estables, es lo que se conoce como MIDA (Mass Isotopomer Distribution Analysis). MIDA^{283,294} es un método basado en el uso de la combinatoria de probabilidades donde los aminoácidos presentes en el pool precursor se combinan

para dar lugar a una proteína que posee como mínimo tres subunidades del aminoácido que se ha añadido. Debido a que el pool precursor es una mezcla de aminoácido natural existente y de aminoácido marcado en ^{13}C que se ha administrado, la proteína estará formada por diferentes especies: Todos los aminoácidos naturales; con un aminoácido marcado; dos aminoácidos marcados.....etc, cuya probabilidad vendrá descrita por la distribución binomial de probabilidades en función del enriquecimiento en el pool precursor. La estrategia general para aplicar MIDA es generar a partir de la proteína un péptido que contenga al menos tres repeticiones del aminoácido suministrado.

El principal problema para aplicar MIDA es los complejos y tediosos cálculos matemáticos necesarios para el cálculo del enriquecimiento en el pool precursor así como la cantidad de péptido marcado que se ha formado.

Por lo tanto en el **artículo IV** se describe una estrategia de cálculo novedosa, rápida y sencilla para MIDA basada en regresión lineal múltiple. En este método, se añade un aminoácido marcado en ^{13}C ($^{13}\text{C}_2$ -Glicina) y su incorporación al péptido de interés es descrita, como en MIDA, por la distribución binomial de probabilidades. La principal diferencia es el cálculo del enriquecimiento en el pool precursor (p) y de la cantidad de péptido formado durante el experimento de marcaje (Xt), donde nuestro método permite un cálculo simultáneo de ambos parámetros mediante regresión lineal múltiple.

En primer lugar se procedió a la síntesis del péptido tríptico modelo sobre el que se van a llevar a cabo los estudios. Se seleccionó el péptido tríptico (RGGGLK) que posee tres subunidades de Glicina. La síntesis del mismo se llevó a cabo mediante síntesis en fase sólida (Fmoc) con tecnología microondas, de manera que se aceleró el proceso de síntesis consiguiendo la síntesis pura del péptido deseado en tan solo 45-50 minutos. En la Figura 46 se muestra el espectro de masas en modo SCAN del péptido RGGGLK objeto de estudio, donde se pueden observar las especies mayoritarias: la especie mono cargada a m/z 587.3 y la doble cargada a m/z 294. Todas las medidas fueron realizadas usando el fragmento molecular del ion M^+ (587.3-597.3).

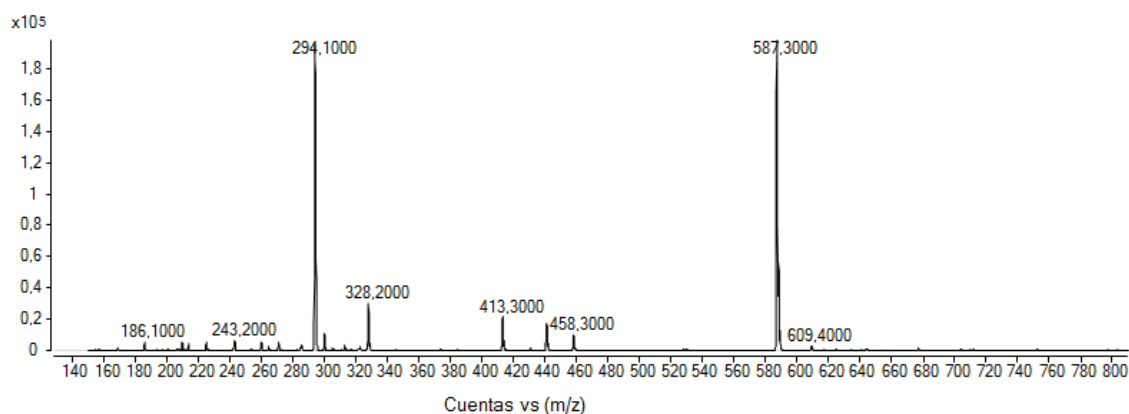


Figura 46: Cromatograma y espectro de masas en modo SCAN del péptido RGGGLK sintetizado a partir de Glicina natural.

Como ya se comentó en anteriores capítulos de Tesis, para poder aplicar regresión lineal múltiple se requiere una medida exacta de la distribución isotópica del péptido. Hay dos factores que pueden afectar a la medida de la distribución isotópica en analizadores de tipo cuadrupolo: la pureza del cluster objeto de estudio o la contribución de la masa M-1 (cola del pico de masa M hacia la masa baja)¹⁷³ debido a una falta de resolución del cuadrupolo. Debido a la utilización de la fuente de ionización de electrospray la pureza del cluster no es un problema, sin embargo la contribución de la cola de los picos hacia la masa baja (M-1) tiene que ser evaluada, obteniéndose una pequeña contribución del 0.3% debido a la cola del pico a la masa M-1 cuando se trabaja en el modo normal de resolución del cuadrupolo (0.7 FWHM). Esta contribución es muy pequeña y no es necesario tenerla en cuenta en el cálculo de las abundancias isotópicas para cada tipo de péptido con 0, 1, 2 o 3 subunidades de aminoácido marcado.

Para el cálculo de las abundancias isotópicas teóricas de cada péptido con 0, 1, 2 o 3 subunidades de aminoácido marcado es muy importante una determinación exacta y precisa del enriquecimiento en el aminoácido Fmoc-N-Glicina-¹³C₂ llevado a cabo de manera experimental utilizando el procedimiento descrito anteriormente en la Sección C.3.1.6 en lugar de asumir el genérico proporcionado por el fabricante (97-99%). El enriquecimiento obtenido fue del 99% con precisiones del 0.1% R.S.D.

A continuación se procedió a evaluar la estrategia de cálculo desarrollada “in vitro” en cuatro péptidos RGGGLK sintetizados a partir de 10, 20, 30 y 40% de ¹³C₂-Glicina simulando diferentes enriquecimientos en el pool precursor. En la Tabla 9 se pueden observar que los resultados obtenidos para el enriquecimiento en el pool precursor (*p*) y la cantidad de péptido marcado (*X_i*) concuerdan con los valores teóricos esperados,

además de obtener desviaciones del mismo orden que las obtenidas utilizando el procedimiento de cálculo clásico de MIDA²⁹⁴.

Tabla 9: Parámetros de la biosíntesis de proteínas para los cuatro péptidos RGGGLK sintetizados *in vitro* a partir de diferentes enriquecimientos de ¹³C₂-Glicina.

Teórico (<i>p</i>)	Medido (<i>p</i>)	Error (%)	Teórico (<i>Xt</i>)	Medido (<i>Xt</i>)	Error (%)
0.0983	0.0920±0.0008	-6.40	1	0.9868±0.0109	-1.32
0.2021	0.2002±0.0011	-0.94	1	0.9688±0.0039	-3.12
0.2999	0.3001±0.0019	0.06	1	0.9760±0.0053	-2.40
0.3971	0.3977±0.0007	0.15	1	0.9847±0.0013	-1.53

**p*: “precursor pool enrichment”; *Xt*: cantidad de péptido marcado

*Error (%) fue calculado usando la ecuación: $(p \text{ medido} - p \text{ teórico}) : p \text{ teórico} \times 100$

Por último, se evaluó la estrategia de cálculo desarrollada “in vivo”. “In vivo” el péptido marcado sintetizado se mezclará en el sistema biológico con péptido natural existente previamente. Para simular una síntesis de proteínas “in vivo” y evaluar la aplicabilidad de la medida de la cantidad de péptido RGGGLK marcado sintetizado se prepararon mezclas de péptido de abundancia natural y de péptido de sintetizado a partir de un 10% o 20% de ¹³C₂-Glicina en relaciones 1:1, 1:3 y 3:1 para simular la existencia de un 75%, 50% y 25% de péptido marcado. En los resultados que se muestran en la Tabla 10, se observa que los dos valores de enriquecimiento en el pool precursor (*p*) que son evaluados, son independientes de la cantidad de péptido marcado presente en las diferentes mezclas y concuerdan perfectamente con los valores esperados. Los valores de cantidad de péptido marcado formado (*Xt*) en ambos tipos de muestra también concuerdan con los valores esperados mostrando desviaciones máximas ligeramente superiores al 10%. Destacar además que la metodología desarrollada proporciona valores únicos e inequívocos para el enriquecimiento en el pool precursor (*p*) y la cantidad de péptido marcado sintetizado (*Xt*).

Tabla 10: *Parámetros de la biosíntesis de proteínas obtenidos en la simulación in vivo utilizando diferentes mezclas de péptido RGGGLK de abundancia natural y péptido RGGGLK sintetizado a partir 10 % o 20% ¹³C₂-Glicina.*

Mezclas Ratio Nat: 10% ¹³C₂ glicina	Teórico (p)	Medido (p)	Error (%)	Teórico (Xt)	Medido (Xt)	Error (%)
3:1	0.0983	0.0958±0.0048	-2.54	0.2639	0.2564±0.0075	-2.84
1:1	0.0983	0.0956±0.0032	-2.74	0.5181	0.5129±0.0089	-1.00
1:3	0.0983	0.0943±0.0011	-4.07	0.7619	0.7641±0.0060	0.29
Mezclas Ratio Nat: 20% ¹³C₂ glicina	Teórico (p)	Medido (p)	Error (%)	Teórico (Xt)	Medido (Xt)	Error (%)
3:1	0.2021	0.2083±0.0036	3.06	0.2388	0.2133±0.0026	-10.69
1:1	0.2021	0.2059±0.0024	1.88	0.4852	0.4496±0.0031	-7.34
1:3	0.2021	0.2040±0.0016	0.94	0.7382	0.7055±0.0051	-4.43

Con la metodología desarrollada en el **artículo IV** basada en regresión lineal múltiple y HPLC-MS se ha conseguido una nueva estrategia de cálculo para MIDA simple y novedosa que nos permite un cálculo rápido, sencillo y simultáneo tanto del enriquecimiento en el pool precursor y la cantidad de péptido marcado sintetizado en lugar de los cálculos clásicos de MIDA basados en complejos y tediosos cálculos matemáticos.

Se puede considerar la metodología desarrollada en este último capítulo de Tesis, como un procedimiento de cálculo mejorado para MIDA que proporciona mejor exactitud y precisión en comparación con los procedimientos clásicos de cálculo.

F. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de la investigación realizada en esta Tesis Doctoral se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Se ha desarrollado una metodología para la determinación de creatinina en suero humano mediante dilución isotópica y GC-EI-MS haciendo uso de creatinina mínimamente marcada en ^{13}C y regresión lineal múltiple.

Esta estrategia de análisis permite la cuantificación de creatinina de una manera directa sin llevar a cabo la construcción de un calibrado metodológico suponiendo un ahorro en tiempo y consumo de reactivos. Además mediante el uso de microondas focalizadas se consiguió acelerar la reacción de derivatización de creatinina con acetilacetona de 66 horas a tan solo 2 minutos. Con todo ello se consiguió una determinación libre de interferencias usando un equipo convencional de GC-MS en tan solo 45 minutos facilitando su aplicación al análisis de rutina.

Mediante comparación de la metodología desarrollada con los métodos aplicados en rutina (Jaffé y Enzimáticos) en muestras de suero interferidas por bilirrubina se observó que los métodos enzimáticos presentaban una desviación seis veces mayor que el Método de Jaffé a pesar de que los métodos enzimáticos son cada vez más recomendados en el análisis de rutina debido a que están menos interferidos por bilirrubina.

Por lo tanto, la principal aplicación de esta metodología será en el análisis de rutina para muestras de suero humano interferidas por bilirrubina donde el efecto de esa interferencia muestra resultados contradictorios en los métodos habituales para el análisis en rutina de creatinina.

2. Se ha demostrado, por primera vez, la capacidad de compuestos marcados en ^{13}C para ser utilizados en metodologías basadas en IDMS utilizando trazadores isotópicos múltiples. La metodología desarrollada basada en doble trazador isotópico mínimamente marcado ($^{13}\text{C}_1$ -creatinina y $^{13}\text{C}_2$ -Creatina), regresión lineal múltiple y LC-MS/MS es capaz de determinar de manera exacta y precisa la concentración de creatina y creatinina a la vez que permite evaluar y corregir las potenciales interconversiones creatina-creatinina durante el proceso de preparación de la muestra.

Se ha observado una pequeña y sistemática interconversión de creatina en creatinina la cual se puede atribuir a la reconstitución de la muestra en fase móvil antes de su análisis

por LC-MS/MS y debe de ser tomada en cuenta en determinaciones que requieran de una gran exactitud, especialmente en muestras con un alto contenido en creatina.

Además, mediante combinación de las dos metodologías desarrolladas en esta Tesis Doctoral para el análisis de creatinina basadas en GC-MS y LC-MS/MS, se evaluó las posibles desviaciones que puedan tener lugar debido a la falta de eficacia en la separación creatina-creatinina mediante extracción en fase sólida (SPE) típica de los métodos basados en GC-IDMS. Los resultados mostraron que dicha separación debe de llevarse a cabo de manera muy cuidadosa, ya que muestras con un alto contenido en creatina podrían dar lugar a importantes sobreestimaciones en la concentración de creatinina.

3. Se ha desarrollado y validado una metodología para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares mediante regresión lineal múltiple y GC-EI-MS, donde el uso de la pureza espectral (debido a la ganancia o pérdida de átomos de hidrógeno en la fuente de ionización electrónica, o a la falta de resolución del analizador de masas) y del valor exacto del enriquecimiento en ^{13}C calculado experimentalmente se han incorporado en el cálculo de las abundancias isotópicas teóricas para todos los posibles isotopólogos de cada metabolito, permitiendo corregir todos los errores sistemáticos y obtener una medida exacta y precisa de la distribución isotópica.

La comparación con valores teóricos obtenidos en mezclas preparadas gravimétricamente y con los valores experimentales obtenidos mediante GC-C-IRMS basadas en la medida de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ demostraron satisfactoriamente la exactitud y precisión de la metodología propuesta.

Nuestros resultados mostraron que la pureza espectral del clúster objeto de estudio y el número de átomos de ^{13}C del análogo marcado, afectan fuertemente a la cantidad mínima de incorporación de ^{13}C que se puede cuantificar de una manera exacta.

Usando nuestras condiciones experimentales el método propuesto nos permite cuantificar de una manera exacta valores de fracción molar en mezclas de Glucosa natural y análogos marcados en ^{13}C , de 0.07 % en mezclas binarias y quinarias. Estos valores son los valores de fracción molar más bajos validados, que se han reportado en la literatura. Además, se ha demostrado que la metodología propuesta nos permite discriminar diferentes rutas metabólicas en líneas celulares de cáncer de próstata.

4. Se ha desarrollado un novedoso y simple procedimiento de cálculo para MIDA basado en regresión lineal múltiple y LC-MS. Este procedimiento desarrollado nos permite el cálculo simultáneo del enriquecimiento en el pool precursor (p) y de la cantidad de péptido formado durante el procedimiento de marcaje (Xt) de una manera rápida y sencilla en lugar de los procedimientos matemáticos tediosos que involucra los cálculos clásicos de MIDA.

La metodología desarrollada fue aplicada a un péptido tríptico modelo (RGGGLK) y validada “in vitro” mediante el análisis de cuatro péptidos modelo sintetizados a partir de un 10%, 20%, 30% y 40% de $^{13}\text{C}_2$ -Glicina y validada simulando condiciones “in vivo”, combinando diferentes proporciones de péptido de abundancia natural y péptido sintetizado a partir de 10% o 20% $^{13}\text{C}_2$ -Glicina con resultados altamente satisfactorios, pudiendo considerar la metodología desarrollada un procedimiento mejorado para el cálculo en MIDA con una mejor exactitud y precisión en comparación con los métodos clásicos de cálculo.

G. TRABAJOS FUTUROS

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se pueden proponer algunas sugerencias para investigaciones futuras:

1. La metodología desarrollada para el análisis de creatinina mediante IDMS basada en el uso de trazadores isotópicos mínimamente marcados en ^{13}C y regresión lineal múltiple propuesta en esta Tesis Doctoral nos proporciona resultados directamente trazables al sistema internacional de unidades y puede ser aplicada al análisis de rutina debido a la reducción en el tiempo de análisis al evitar el calibrado metodológico. Por lo tanto, en trabajos futuros esta estrategia se podría evaluar y extender al análisis de otros parámetros clínicos en los que el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) carece de métodos de análisis de rutina fiables como son los casos de la 25-hidroxyvitamina D y 1,25- hidroxyvitamina D, Aldosterona o la medida de la actividad plasmática de la renina.

2. El empleo de doble trazador isotópico mínimamente marcado en ^{13}C y regresión lineal múltiple proporciona la determinación simultánea de creatina y creatinina donde todas las posibles fuentes de error están corregidas. Por tanto, podría ser evaluado como candidato a método de referencia y poder ser incorporado en la base de datos de la Comisión Conjunta para la Trazabilidad en la medicina de laboratorio (JCTLM). Esta metodología podrá posteriormente ser utilizada en la certificación de materiales de referencia en creatina y creatinina, ya que únicamente existen materiales de referencia certificados en creatinina.

3. La metodología desarrollada para la medida de la distribución isotópica en metabolitos intracelulares basada en regresión lineal múltiple proporcionó resultados prometedores debido a la detección de fenotipos metabólicos alterados en líneas celulares de cáncer de próstata. Por lo tanto, en trabajos futuros esta metodología se podría extender a estudios “in vivo” en ratones enfermos de cáncer de próstata, midiendo la distribución isotópica de los diferentes metabolitos intracelulares tanto en muestras de orina como en diferentes tejidos cancerosos.

4. El procedimiento de cálculo alternativo para MIDA propuesto en esta Tesis Doctoral, basado en regresión lineal múltiple proporcionó unos resultados de gran exactitud y precisión al aplicarlo a un péptido triptico modelo en estudios “in vitro” y simulando

condiciones “in vivo” constituyendo un método mejorado para el cálculo en MIDA respecto a los métodos clásicos de cálculo. Por lo tanto, sería de una gran relevancia evaluar este procedimiento de cálculo en estudios “in vivo” con ratones, para diferentes proteínas con una gran interés desde el punto de vista biológico.

H. FACTOR DE IMPACTO

H.1. Informe sobre el factor de impacto de las publicaciones presentadas

El trabajo científico desarrollado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en revistas científicas del campo específico de la Química Analítica y de la Tecnología de Laboratorio Médico. Todas las publicaciones se encuentran en revistas internacionales indexadas en el JCR (*Journal Citation Report*), la mayoría dentro del primer cuartil de su categoría. En la Tabla siguiente se muestran los datos de impacto y de categoría de las revistas en las que se pueden encontrar las publicaciones presentadas.

REVISTA	FI	CATEGORIA	PUESTO	FUENTE
<i>Clínica Chimica Acta</i>	2.850	<i>Tecnología de Laboratorio Médico</i>	6 de 32	JCR 2012
<i>Analytical Chemistry</i>	5.825	<i>Química Analítica</i>	4 de 76	JCR 2013
<i>Journal of mass Spectrometry*</i>	2.541	<i>Química Analítica</i>	24 de 75	JCR 2015
<i>Analytical Chemistry</i>	5.886	<i>Química Analítica</i>	4 de 75	JCR 2015

* Segundo cuartil de su categoría

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ F. W. Aston. **A new Mass-Spectrograph and the whole number rule.** *Proc. Roy. Soc. A*, 1927, 115, 487.
- ² G. Münzenberg. **Development of mass spectrometer from Thomson and Aston to present.** *Int. J. Mass. Spectrom.* 2013, 349-350, 9.
- ³ K. Wien. **100 years of ion beams: Willy Wien's canal rays.** *Braz. J. Phys.* 1999, 29, 401.
- ⁴ G. Squires. **Francis Aston and the mass spectrograph.** *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1998, 3893.
- ⁵ J. J. Thomson. **Rays of positive electricity.** *Proc. R. Soc. Lond. A.* 1913, 89, 1.
- ⁶ P. Alcarlo, R. Redondo-Ortega, J. Toledo. **Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales.** Universidad Autónoma de Madrid, Servicio de publicaciones, 2008.
- ⁷ J. J. Thomson, F. W. Aston, F. Soddy, T. R. Merton, F. A. Lindemann. **Discussion on isotopes.** *Proc. R. Soc. Lond. A.* 1921, 99, 87.
- ⁸ J. Hughes. **Making isotopes matter: Francis Aston and the mass-spectrograph.** *Dinamics.* 2009, 29, 131
- ⁹ F. Soddy. **The origins of the conceptions of isotopes.** *Nobel Lecture.* 1922, December 12.
- ¹⁰ C. J. Allègre. **Isotope Geology.** Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- ¹¹ J. S. Becker. **Mass spectrometry of long-lived radionuclides.** *Spectrochimica Acta Part B*, 2003, 58, 1757.
- ¹² A. Nier. **The isotopic constitution of uranium and the half-lives of the uranium isotopes.** *Phys. Rev.* 1939, 55, 150.
- ¹³ A. Nier, R. W. Thompson, B. F. Murphey. **The isotopic constitution of lead and the measurement of geological time. III.** *Phys. Rev.* 1941, 60, 112.
- ¹⁴ Z. A. Stos-Gale, N. H. Gale. **Metal provenancing using isotopes and the Oxford archaeological lead isotope database (OXALID).** *Archaeol Anthropol Sci.* 2009,1, 195.
- ¹⁵ M. Komárek, V. Ettler, V. Chrástný, M. Mihaljevič. **Lead isotopes in environmental sciences: a review.** *Environ. Int.* 2008, 34, 562.

- ¹⁶ L. A. Ortega, I. Guede, I. Aranguren, M. C. Zuluaga, A. Alonso, X. Murelaga, J. Niso, M. Loza, J. A. Quiros. **Estudio isotópico del Sr en restos óseos del cementerio altomedieval de Dulantzi (Alegría-Dulantzi, Álava).** *Macla. Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*. 2012, 16, 42.
- ¹⁷ C. M. R. Almeida, M. T. S. V. Vasconcelos. **Does the winemaking process influence the wine $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$? A case study.** *Food Chem*. 2004, 85, 7.
- ¹⁸ G. Fortunato, K. Mucic, S. Wunderli, L. Pillone, J. O. Bosset, G. Gremaud. **Application of strontium abundance ratios measured by MC-ICP-MS for food authentication.** *J. Anal. At. Spectrom*. 2004, 19, 227.
- ¹⁹ S. García-Ruiz, M. Moldovan, G. Fortunato, S. Wunderli, J. I. García Alonso. **Evaluation of strontium isotope abundance ratios in combination with multielemental analysis as a possible tool to study the geographical origin of ciders.** *Anal. Chim. Acta*. 2007, 590, 55.
- ²⁰ W. Seelmann-Eggebert, G. Pfenning, H. Münzel, H. Klewe-Nebenius. **Chart of Nuclides.** Institut für Radiochemie. 1981.
- ²¹ W.E. Burcham. **Física Nuclear.** Editorial Reverté, 2003.
- ²² E. W. Washburn, H. C. Urey. **Concentration of the isotope of the hydrogen by the fractional electrolysis of water.** *Proc. N. A. S.* 1932, 18, 496.
- ²³ P. Maier-Komor. **Uranium isotope separation from 1941 to the present.** *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A*. 2010, 613, 465.
- ²⁴ Y. V. Martynenko. **Electromagnetic isotope separation method and its heritage.** *Phys. Usp*. 2009, 52, 1266.
- ²⁵ D. E. Wooldridge, W. R. Smythe. **The separation of gaseous isotopes by diffusion.** *Phys. Rev*. 1936, 50, 233.
- ²⁶ R. F. Humphreys. **Separation of bromine isotopes by centrifuging.** *Phys. Rev*. 1939, 56, 684.
- ²⁷ J. W. Beams, F. B. Haynes. **The separation of isotopes by centrifuging.** *Phys. Rev*. 1936, 50, 491.
- ²⁸ W. H. Furry, R. C. Jones. **On the theory of isotope separation by thermal diffusion.** *Phys. Rev*. 1939, 55, 1083.
- ²⁹ R. C. Jones, W. H. Furry. **The separation of isotopes by thermal diffusion.** *Rev. Mod. Phys*. 1946, 18, 151.
- ³⁰ D. C. Dumitrache, B. De Schutter, A. Huesman, E. Dulf. **Modeling, analysis and simulation of a cryogenic distillation process for ^{13}C .** *J. Process. Contr*. 2012, 22, 798.

- ³¹ H. L. Li, Y. L. Ju, L. J. Li, D. G. Xu. **Separation of isotope ^{13}C using high-performance structured packing.** *Chem. Eng. Prog.* 2010, 49, 255.
- ³² H. L. Johnston. **The Preparation of Deuterium-Free Water. Deuterium Content of Ordinary Water and the Atomic Weight of Hydrogen. Electrolytic Separation of the Oxygen Isotopes.** *J. Am. Chem. Soc.* 1935, 57, 484.
- ³³ W. H. Hall, H. L. Johnston. **Concentration of the heavier isotopes of oxygen in commercial electrolytic cells.** *J. Am. Chem. Soc.* 1935, 57, 1515.
- ³⁴ B. Topley, H. Eyring. **Electrolytic separation of hydrogen isotopes and the mechanism of the cathode process.** *J. Am. Chem. Soc.* 1933, 55, 5058.
- ³⁵ R. G. Denning. **Laser isotope separation techniques.** *Phys. Technol.* 1978, 9, 242.
- ³⁶ D. M. Bremer, S. Datta, R. N. Zare. **Laser isotope separation. Photochemical scavenging of chlorine-37 by bromobenzene.** *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 4554.
- ³⁷ C. B. Moore. **The application of lasers to isotope separation.** *Acc. Chem. Res.* 1973, 6, 323.
- ³⁸ M. Chirac, I. Lupan, F. Popa, N. Palibroda, O. Popescu. **Enzymatic synthesis of some ^{15}N labelled amino acids.** *Isot. Environ. Health. Stud.* 2010, 46, 249.
- ³⁹ D. W. Barnett, M. J. Pangiot, R. W. Curley Jr. **Stereoselective route to ^{15}N -labeled-deuterated amino acids: synthesis of (2S,3R)-[3-2H, ^{15}N]-phenylalanine.** *Tetrahedrom. Asymmetry.* 2002, 13, 1893.
- ⁴⁰ K. Ozawa, P. S. C. Wu, N. E. Dixon, G. Otting. **^{15}N -Labelled proteins by cell-free protein synthesis Strategies for high-throughput NMR studies of proteins and protein–ligand complexes.** *FEBS. J.* 2006, 273, 4154.
- ⁴¹ Q. Zhang, N. P. Botting, C. Kay. **A gram scale synthesis of a multi- ^{13}C -labelled anthocyanin,[6,8,10,30,50- $^{13}\text{C}5$]cyanidin-3-glucoside, for use in oral tracer studies in humans.** *Chem. Commun.* 2011, 47, 10596.
- ⁴² D. L. Bolt, J. C. Bradley, M. A. Re. **The preparation of ^{13}C -labeled standards of polycyclic aromatic hydrocarbons and other micropollutants: synthetic and QA/QC considerations.** *Chemosphere.* 1997, 34, 905.
- ⁴³ M. Karlsen, H. Liu, J. E. Johansen, B. H. Hoff. **Synthesis of [$^{13}\text{C}_4$]-labeled Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol as Internal Standards for Reducing Ion Suppressing/Alteration Effects in LC/MS-MS Quantification.** *Molecules.* 2014, 19, 13526.
- ⁴⁴ M. Karlsen, H. Liu, J. E. Johansen, B. H. Hoff. **Economical Synthesis of ^{13}C -Labeled Opiates, Cocaine Derivatives and Selected Urinary Metabolites by Derivatization of the Natural Products.** *Molecules.* 2015, 20, 5329.

- ⁴⁵ L. Somoano-Blanco, P. Rodriguez-Gonzalez, S. Garcia Fonseca, J. I. García Alonso. **Determination of Polychlorinated Biphenyls in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry Using ³⁷Cl-Labeled Analogues.** *Anal. Chem.* 2015, 87, 7840.
- ⁴⁶ A. González-Gago, J. M. Marchante-Gayón, M. Ferrero, J. I. García Alonso. **Synthesis of ⁸¹Br-Labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Characterization Using GC(EI)MS and GC(ICP)MS.** *Anal. Chem.* 2010, 82, 2879.
- ⁴⁷ J. Giner Martinez-Sierra, F. Moreno Sanz, P. Herrero Espílez, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso. **Biosynthesis of sulfur-34 labelled yeast and its characterisation by multicollector-ICP-MS.** *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 1105.
- ⁴⁸ C. G. J. Petersen, **The yearly immigration of young plaice into the Limfjord from the German Sea.** *Report of the Danish Biological Station.* 1895, 6, 5.
- ⁴⁹ F. Szabadvary. **“George Hevesy”.** *J. Radioanal. Chem.* 1968, 1, 97.
- ⁵⁰ G. de Hevesy, R. Hobbie. **Lead content of rocks.** *Nature*, 1931, 128, 1038.
- ⁵¹ O. Chiewitz, G. Hevesy. **Radioactive Indicators in the Study of Phosphorus Metabolism in Rats.** *Nature.* 1935, 136, 754.
- ⁵² D. Rittenberg, G. L. Foster. **A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with the application to the determination of amino acids and fatty acids.** *J. Biol. Chem.* 1940, 133, 737.
- ⁵³ J. D. Fassett. **Inorganic trace analysis by isotope dilution mass spectrometry.** *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 1988, 93, 417.
- ⁵⁴ A. P. De Leenheer, L. M. Thienpont, **Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics and toxicology.** *Mass Spectrom. Rev.* 1992, 11, 249.
- ⁵⁵ R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, C. E. Taylor. **Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements.** *Anal. Chem.* 1980, 52, 2283.
- ⁵⁶ T. Walczyk, **TIMS versus multicollector-ICP-MS: coexistence or struggle for survival?.** *Annal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 229.
- ⁵⁷ V. Brun, C. Masselon, J. Garin, A. Dupis. **Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics.** *J. Proteom.* 2009, 72, 740.
- ⁵⁸ J. Vogl. **Characterisation of reference materials by Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 475.
- ⁵⁹ M. J. T. Milton, T. J. Quinn. **Primary methods for the measurement of amount of substance.** *Metrología.* 2001, 38, 289.

- ⁶⁰ P. Rodríguez-González, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review.** *Spectrochim. Acta, B.* 2005, 60, 151.
- ⁶¹ A. Sanz-Medel. **Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends.** *Spectrochim. Acta, B.* 1998, 53, 197.
- ⁶² A. Schwarz, K.G. Heumann. **Two-dimensional on-line detection of brominated and iodinated volatile organic compounds by ECD and ICP-MS after GC separation.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 374, 212.
- ⁶³ H. Hintelman, R. D. Evans. **Application of stable isotopes in environmental tracer studies-Measurement of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation.** *Fresenius. J. Anal. Chem.* 1997, 358, 378.
- ⁶⁴ A. Castillo, P. Rodriguez-González, G. Centineo, A. F. Roig-Navarro, J. I. Garcia Alonso. **Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by Molecular Mass Spectrometry: Simultaneous Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Fish Tissues.** *Anal. Chem.* 2010, 82, 2773.
- ⁶⁵ P. Rodriguez-González, S. Bouchet, M. Monperrus, E. Tessier, D. Amoroux. **In situ experiments for element species-specific environmental reactivity of tin and mercury compounds using isotopic tracers and multiple linear regression.** *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013, 20, 1269.
- ⁶⁶ L. Hinojosa Reyes, G. M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholtz, H. M. Skip Kingston. **Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 2123.
- ⁶⁷ J. Ruiz Encinar, P. Rodriguez Gonzalez, J. I. García Alonso, A. Sanz Medel. **Evaluation of Extraction Techniques for the Determination of Butyltin Compounds in Sediments Using Isotope Dilution-GC/ICPMS with ¹¹⁸Sn and ¹¹⁹Sn-Enriched Species.** *Anal. Chem.* 2002, 74, 270.
- ⁶⁸ P. Rodriguez-González, J. Ruiz Encinar. J. I. García Alonso. A. Sanz-Medel. **Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by isotope dilution mass spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrum.* 2004, 19, 685.
- ⁶⁹ P. Rodriguez-González, A. Rodriguez-Cea, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Species-Specific Isotope Dilution Analysis and Isotope Pattern Deconvolution for Butyltin Compounds Metabolism Investigations.** *Anal. Chem.* 2005, 77, 7724.
- ⁷⁰ D. Hou, H. M. "Skip" Kingston. **Correction of Species Transformations in the Analysis of Cr(VI) in Solid Environmental Samples Using Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *Anal Chem.* 2000, 72, 5047.

- ⁷¹ N. Fabregat-Cabello, P. Rodríguez-González, A. Castillo, J. Malherbe, A. F. Roig-Navarro, S. E. Long, J. I. García Alonso. **Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 12542.
- ⁷² H. M. “Skip” Kingston, D. Huo, Y. Lu, S. Chalk. **Accuracy in species analysis: speciated isotope dilution mass spectrometry (SIDMS) exemplified by the evaluation of chromium species.** *Spectrochim. Acta. B.* 1998, 53, 299.
- ⁷³ C. Toews, J. Kern, H. M. Kingston, M. Rahman. **Sensitivity analysis for speciated isotope dilution mass spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25, 196.
- ⁷⁴ L. Ourdane, Z. Mester, J. Mejia. **General Equation for Multiple Spiking Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 2009, 81, 5075.
- ⁷⁵ K. Lunoe, J. G. Martínez-Sierra, B. Gammelgaard, J. I. García-Alonso. **Internal correction of spectral interferences and mass bias for selenium metabolism studies using enriched stable isotopes in combination with multiple linear regression.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 2749.
- ⁷⁶ P. Rodríguez-Lucena, A. Benedicto, J. J. Lucena, J. A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J. I. García Alonso, L. Hernández-Apaolaza. **Use of the stable isotope ⁵⁷Fe to track the efficacy of the foliar application of lignosulfonate/Fe³⁺ complexes to correct Fe deficiencies in cucumber plants.** *J. Sci. Food. Agric.* 2011, 91, 395.
- ⁷⁷ I. Caramés-Pasarón, J. A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J.I. García Alonso. **Development of a Dual-Isotope Procedure for the Tagging and Identification of Manufactured Products: Application to Explosives.** *Anal. Chem.* 2012, 84, 121.
- ⁷⁸ G. Huelga-Suarez, M. Moldovan, A. García-Valiente, E. García-Vázquez, J. I. García Alonso. **Individual-Specific Transgenerational Marking of Fish Populations Based on a Barium Dual-Isotope Procedure.** *Anal. Chem.* 2012, 84, 127.
- ⁷⁹ J. Wieling, **LC-MS-MS experiences with internal standards.** *J. Chromatographia.* 2002, 55, 107.
- ⁸⁰ P. Schadewalt, H. W. Hammen, K. Loganathan, A. B. Leidecker, U. Wendel. **Analysis of concentration and ¹³C enrichment of D- galactosa in human plasma.** *Clin. Chem.* 2000, 46, 612.
- ⁸¹ S. S. C. Tai, B. Xu, L. T. Sniegowski, M. J. Welch. **Development and Evaluation of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of 19 Norandrosterone in Human Urine Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 2006, 78, 3393.
- ⁸² J. Mejia, G. Centineo, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, J. A. Caruso. **Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters.** *J. Mass. Spectrom.* 2005, 40, 807.

- ⁸³ G. Centineo, E. Blanco González, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples.** *J. Mass. Spectrom.* 2006, 41, 77.
- ⁸⁴ M. Rychlik, S. Asam. **Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 617.
- ⁸⁵ R. Kock, B. Delvoux, H. Greiling. **Determination of total cholesterol in serum by liquid chromatography–isotope dilution mass spectrometry.** *Clin. Chem.* 1997, 43, 1896.
- ⁸⁶ M. Desage, R. Guilluy, J. L. Brazier, H. Chaudron, J. Girard, H. Cherpin. **Gas chromatography with mass spectrometry or isotope-ratio mass spectrometry in studying the geographical origin of heroin.** *Anal. Chim. Acta.* 1991, 247, 249.
- ⁸⁷ J. F. Pickup, K. McPherson. **Theoretical Considerations in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry for Organic Analysis.** *Anal. Chem.* 1976, 48, 1885.
- ⁸⁸ A. Takatsu, S. Nishi. **Total Cholesterol in Serum Determined by Isotope Dilution/Mass Spectrometry with Liquid- Chromatography separation.** *Clin. Chem.* 1987, 33, 1113.
- ⁸⁹ O. Pelletier, L. A. Wright, W. C. Breckenridge. **Isotope Dilution/Mass Spectrometry of Serum Cholesterol with [3, 4 -¹³C]: Proposed definitive method.** *Clin. Chem.* 1987, 33, 1411.
- ⁹⁰ E. H. Edwards, M. M. Kimberley, S. D. Pyatt, S. L. Stribling, K. D. Dobbin, G.L Myers. **Proposed serum cholesterol reference measurement procedure by Gas-Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *Clin. Chem.* 2011, 57, 614.
- ⁹¹ J. A. Jonckheere, A. P. Leenheer. **Statistical evaluation of calibration curve nonlinearity in isotope dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 1983, 55, 153.
- ⁹² J. F. Sabot, H. Pinatel. **Calculation of the confidence range in Order to obtain a linear calibration graph in stable isotope dilution mass spectrometry: Application to reference methods and pharmacological studies.** *Analyst.* 1993, 118, 831.
- ⁹³ International Organization for Standardization. **International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms, VIM.** 3rd edn, Ginebra, Suiza, 2012.
- ⁹⁴ J. Buttner. **Reference methods as basis for accurate measuring systems. Concepts and limitations.** *Fresenius. J. Anal. Chem.* 1990, 337, 4.
- ⁹⁵ D. Stamm. **Reference materials and reference methods in clinical chemistry.** *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1979, 17, 283.
- ⁹⁶ J. P. Cali. **Rationale for reference methods in clinical chemistry.** *Pure & Appl. Chem.* 1976, 45, 63.

⁹⁷ Bureau International des Poids et Mesures. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>. [Acceso 16 de Octubre de 2015].

⁹⁸ M. J. Welch, A. Cohen, H. S. Hertz, K. J. Ng, R. Schaffer, P. Van Der Lijn, E. V. White. **Determination of Serum Creatinine by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Candidate Definitive Method.** *Anal. Chem.* 1986, 58, 1681.

⁹⁹ P. Stokes, G. O'Connor. **Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum.** *J. Chromatogr. B.* 2003, 794, 125.

¹⁰⁰ L. Siekmann, K. P. Hüskes, H. Breuer. **Determination of Cholesterol in Serum using Mass Fragmentography - a Reference Method in Clinical Chemistry.** *Z. Anal. Chem.* 1976, 279, 145.

¹⁰¹ S. S. C. Tai, M. Bedner, K. W. Phinney. **Development of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of 25-Hydroxyvitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D2 in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 2010, 82, 1942.

¹⁰² A. Kessler, L. Siekmann. **Measurement of Urea in Human Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry: A Reference Procedure.** *Clin. Chem.* 1999, 45, 1523.

¹⁰³ P. Ellerbe, A. Cohen, M. J. Welch, E. V. White. **Determination of Serum Uric Acid by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a New Candidate Definitive Method.** *Anal. Chem.* 1990, 62, 2173.

¹⁰⁴ P. Ellerbe, L. T. Sniegosky, M. J. Welch. **Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Candidate Definitive Method for Determining Total Glycerides and Triglycerides in Serum.** *Clin. Chem.* 1995, 41, 397.

¹⁰⁵ A. Botha, S. Ellison, T. Linsinger, A. Van der Veen. **Outline for the revision of ISO Guide 35.** *Accred. Qual. Assur.* 2013, 18, 115.

¹⁰⁶ D. M. Bunk. **Reference Materials and Reference Measurement Procedures: An Overview from a National Metrology Institute.** *Clin Biochem Rev.* 2007, 18, 131.

¹⁰⁷ J. Pauwels, A. Lamberty, H. Schimmel. **Quantification of the expected shelf-life of certified reference materials.** *Fresenius J Anal Chem.* 1998, 361, 395.

¹⁰⁸ T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. Lamberty, H. G. Schimmel, A. M. H. Van der Veen, L. Siekmann. **Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs.** *Fresenius J Anal Chem.* 2001, 370, 183.

¹⁰⁹ R. Kaarls, T. J. Quinn. **The Comité Consultatif pour la Quantité de Matière: a brief review of its origin and present activities.** *Metrologia.* 1997, 34, 1.

- ¹¹⁰ R. I. Wielgosz. **International comparability of chemical measurement results.** *Anal Bioanal Chem.* 2002, 374, 767.
- ¹¹¹ E. Liotta, R. Gottardo, L. Bonizzato, J. P. Pascali, A. Bertraso, F. Tagliaro. **Rapid and direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis.** *Clinica Chimica Acta.* 2009, 409, 52.
- ¹¹² F. Cerlotti, J. C. Boyd, G. Klein, J. Henry, J. Queraltó, V. Kairlsto, M. Panteghini. **Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application.** *Clin. Chem.* 2008, 54, 559.
- ¹¹³ A. S. Levey, K. U. Eckardt, Y. Tsukamoto, A. Levin, J. Coresh, J. Rossert, D. De Zeeuw, T. H. Hostetter, N. Lameire, G. Eknoyan. **Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application.** *Kidney. Int.* 2005, 67, 2089.
- ¹¹⁴ M. Peake, M. Whiting. **Measurement of Serum Creatinine – Current Status and Future Goals.** *Clin. Biochem Rev.* 2006, 27, 173.
- ¹¹⁵ S. Matsuo, E. Imai, M. Horio, Y. Yasuda, K. Tomita, K. Nitta, K. Yamagata, Y. Tomino, H. Yokoyama, A. Hishida. **Revised Equations for Estimated GFR From Serum Creatinine in Japan.** *Am. J. Kidney Dis.* 2009, 53, 982.
- ¹¹⁶ A. S. Levey, J. Coresh, T. Greene, L. A. Stevens, Y. Zhang, S. Hendriksen, J. W. Kusek, F. Van Lente. **Using Standardized Serum Creatinine Values in the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for Estimating Glomerular Filtration Rate.** *Ann Intern Med.* 2006, 145, 247.
- ¹¹⁷ National Kidney disease education program. Information of health professionals Creatinine standardization program. <http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/index.htm> [Acceso el 21 de Octubre de 2015].
- ¹¹⁸ A. S. Levey, J. P. Bosh, J. B. Lewis, T. Greene, N. Rogers, D. Roth. **A More Accurate Method to Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation.** *Ann. Intern. Med.* 1999, 130, 461.
- ¹¹⁹ A. S. Levey, T. Greene, J. W. Kusek, G. J. Beck. **A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine[Abstract].** *Ann. Inter. Med.* 1999, 130, 461.
- ¹²⁰ G. L. Myers, W. G. Miller, J. Coresh, J. Fleming, N. Greenberg, T. Greene, T. Hostetter, A. S. Levey, M- Panteghini, M. Welch, J. H. Eckfeldt. **Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement: A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program.** *Clin. Chem.* 2006, 52, 5.
- ¹²¹ J. R. Delanghe, M. M. Speeckaert. **Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for?.** *NDT Plus.* 2011, 4, 83.
- ¹²² S. Narayanan, H. D. Appleton. **Creatinine: A review.** *Clin. Chem.* 1980, 26, 1119.

- ¹²³ O. Folin. **Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harne.** *Z. Physiol. Chem.* 1904, 41, 223.
- ¹²⁴ I. Greenwald. **Chemistry of Jaffe's reaction for creatinine II. Effect of substitution in the creatinine molecule and a possible formula for the red tautomer.** *J. Am. Chem. Soc.* 1925, 47, 1443.
- ¹²⁵ J. T. Clarke. **Colorimetric determination and distribution of urinary creatinine and creatine.** *Clin. Chem.* 1961, 7, 271.
- ¹²⁶ A. R. Butler. **The Jaffé reaction. Identification of the coloured species.** *Clin. Chim. Acta.* 1975, 59, 227.
- ¹²⁷ J. Vasiliades. **Reaction of Alkaline Sodium Picrate with Creatinine: I. Kinetics and Mechanism of Formation of the Mono-Creatinine Picric Acid Complex.** *Clin. Chem.* 1976, 22, 1664.
- ¹²⁸ R. M. Archibald. **Reactions of creatinine with alkaline picrate.** *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 612.
- ¹²⁹ R. W. Bosnes, H. H. Taussky. **On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffé reaction.** *J. Biol. Chem.* 1945, 158, 581.
- ¹³⁰ R. S. Hare. **Endogenous creatinine in serum and urine.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950, 74, 148.
- ¹³¹ J. A. Owen, B. Iggo. **The Determination of Creatinine in Plasma or Serum, and in Urine; a Critical Examination.** *Biochem. J.* 1954, 58, 426.
- ¹³² J. A. Weber, A. P. Van Zanten. **Interferences in Current Methods for Measurements of Creatinine.** *Clin. Chem.* 1991, 37, 695.
- ¹³³ S. S. Chaudhary, J. P. Shah, R. V. Mahato. **Interference of Bilirubin in Creatinine Value Measurement by Jaffe Kinetic Method.** *Ann. Clin. Chem. Lab. Med.* 2015, 1, 25.
- ¹³⁴ C. L. Davis, T. A. Gonwa, A. H. Wilkinson. **Pathophysiology of Renal Disease Associated With Liver Disorders: Implications for Liver Transplantation. Part I.** *Liver. Transplant.* 2002, 8, 91.
- ¹³⁵ N. A. Daugherty, K. B. Hammond, I. M. Osberg. **Bilirubin interference with the kinetic Jaffé method for serum creatinine.** *Clin. Chem.* 1978, 24, 392.
- ¹³⁶ G. Dimeski, B. McWhinney, B. Jones, R. Mason, A. Carter. **Extent of bilirubin interference with Beckman creatinine methods.** *Ann. Clin. Biochem.* 2008, 45, 91.
- ¹³⁷ R. F. Watkins, C. S. Feldkamp, R. J. Thibert, B. Zak. **Interesting Interferences in a Direct Serum Creatinine Reaction.** *Microchem. J.* 1976, 21, 370.

- ¹³⁸ J. P. Sah, S. Jaiswal. **Interference of Bilirubin in Serum Creatinine Value Measurement by Jaffe's Kinetic Method.** *J. Health. Allied. Sci.* 2012, 2, 61.
- ¹³⁹ L. J. Owen, B. G. Keevil. **Does Bilirubin Cause Interference in Roche Creatinine Methods?.** *Clin. Chem.* 2007, 53, 370.
- ¹⁴⁰ M. L. Knapp, O. **Investigations into negative interference by jaundiced plasma in kinetic Jaffé methods for plasma creatinine determination.** *Ann. Clin. Biochem.* 1987, 24, 85.
- ¹⁴¹ J. M. Guy, E. F. Legg. **Bilirubin interference of creatinine with the Hitachi 737 analyzer.** *Clin. Chem.* 1990, 36, 1851.
- ¹⁴² A. C. Halstead, A. A. Nanji. **Artifactual lowering of serum creatinine levels in the presence of hyperbilirubinemia.** *JAMA.* 1984, 251, 38.
- ¹⁴³ L. D. Bowers, E. T. Wong. **Kinetic serum creatinine assays II. A critical evaluation and review.** *Clin. Chem.* 1980, 26, 555.
- ¹⁴⁴ N. O'Leary, A. Pembroke, P. F. Duggan. **A Simplified Procedure for Eliminating the Negative Interference of Bilirubin in the Jaffé reaction for Creatinine.** *Clin. Chem.* 1992, 38, 1749.
- ¹⁴⁵ M. L. Heinegard, P. D. Mayne. **Development of an automated kinetic Jaffe method designed to minimise bilirubin interference in plasma creatinine assays.** *Clin. Chim. Acta.* 1987, 168, 239.
- ¹⁴⁶ G. Rajs, M. Mayer. **Oxidation Markedly Reduces Bilirubin Interference in the Jaffe creatinine Assay.** *Clin. Chem.* 1992, 38, 2411.
- ¹⁴⁷ P. H. Lolekha, N. Sritong. **Comparison of Techniques for Minimizing Interference of Bilirubin on Serum Creatinine Determined by the Kinetic Jaffe Reaction.** *J. Clin. Lab. Anal.* 1994, 8, 391.
- ¹⁴⁸ P. Srisawasdi, U. Chaichanajareernkul, N. Teerakanjana, S. Vanavanan, M. H. Kroll. **Exogenous Interferences with Jaffe Creatinine Assays: Addition of Sodium Dodecyl Sulfate to Reagent Eliminates Bilirubin and Total Protein Interference with Jaffe Methods.** *J. Clin. Lab. Anal.* 2010, 24, 123.
- ¹⁴⁹ D. Hardeman, E. T. Backer. **Ultrafiltration of Serum to eliminate bilirubin Interference in the Kinetic Jaffe determination of Creatinine.** *Clin. Chem.* 1991, 37, 1991.
- ¹⁵⁰ S. Boot, N. LaRoche, E. F. Legg. **Elimination of bilirubin interference in creatinine assays by routine techniques: comparisons with a high performance liquid chromatography method.** *Ann. Clin. Biochem.* 1994, 31, 262.

- ¹⁵¹ R. Vaishya, S. Aroa, B. Singh, V. Mallika. **Modification of Jaffe`s kinetic method decreases bilirubin interference: A preliminary report.** *Indian. J. Clin. Biochem.* 2010, 25, 64.
- ¹⁵² D. Heinegard, G. Tiderström. **Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method.** *Clin. Chim. Acta.* 1973, 43, 305.
- ¹⁵³ P. Fossati, L. Prencipe, G. Berti. **Enzymic Creatinine Assay: A New Colorimetric Method Based on Hydrogen Peroxide Measurement.** *Clin. Chem.* 1983, 29, 1494.
- ¹⁵⁴ H. Crocker, M. D. S. Shephard, G. H. White. **Evaluation of an enzymatic method for determining creatinine in plasma.** *J. Clin. Pathol.* 1988, 41, 576.
- ¹⁵⁵ E. Tanganelli, L. Prencipe, D. Bassi, S. Cambiaghi, E. Murador. **Enzymic Assay of Creatinine in Serum and Urine with Creatinine Iminohydrolase and Glutamate Dehydrogenase.** *Clin. Chem.* 1982, 28, 1461.
- ¹⁵⁶ G. A. Moss, R. J. L. Bondar, D. M. Buzzelli. **Kinetic Enzymatic Method for Determining Serum Creatinine.** *Clin. Chem.* 1975, 21, 1422.
- ¹⁵⁷ W. G. Miller, G. L. Myers, E. R. Ashwood, A. A. Kileen, E. Wang, L. M. Thienpont, L. Siekmann. **Creatinine measurement: State of the art in accuracy and interlaboratory harmonization.** *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005, 129, 297.
- ¹⁵⁸ N. Greenberg, W. L. Roberts, L. M. Bachmann, E. C. Wright, R. N. Dalton, J. J. Zakowski, W. G. Miller. **Specificity Characteristics of 7 Commercial Creatinine Measurement Procedures By Enzymatic and Jaffe Method Principles.** *Clin. Chem.* 2012, 58, 391.
- ¹⁵⁹ M. Panteghini. **Enzymatic assays for creatinine: Time for action.** *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2008, 68, 84.
- ¹⁶⁰ I. Drion, C. Cobbaert, K. H. Groenier, C. Weykamp, H. J. G. Bilo, J. F. M. Wetzels, N. Kleefstra. **Clinical evaluation of analytical variations in serum creatinine measurements: why laboratories should abandon Jaffe techniques.** *Nephrology.* 2012, 13, 133.
- ¹⁶¹ A. Boutten, A. S. Bargnoux, M. C. Carlier, P. Delanaye, E. Rozet, V. Delatour, E. Cavalier, A. M. Hansen, M. Froissart, J. P. Cristol, L. Pieroni. **Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation.** *Clin. Chem. Acta.* 2013, 419, 132.
- ¹⁶² Myers GL, Miller WG, Coresh J, et al. **Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program.** *Clin. Chem.* 2006, 52, 5.

- ¹⁶³ N. G. Dodder, S. S. C. Tai, L. T. Sniegowski, N. F. Zhang, M. J. Welch. **Certification of Creatinine in a Human Serum Reference Material by GC-MS and LC-MS.** *Clin. Chem.* 2007, 53, 1694.
- ¹⁶⁴ D. Stöckl, H. Reinauer. **Candidate Reference Methods for Determining Target Values for Cholesterol, Creatinine, Uric Acid, and Glucose in External Quality Assessment and Internal Accuracy Control. I. Method Setup.** *Clin. Chem.* 1993, 39, 993.
- ¹⁶⁵ I. Björkhem, R. Biomstrand, G. Öhman. **Mass fragmentography of creatinine proposed as a reference method.** *Clin. Chem.* 1977, 23, 2114.
- ¹⁶⁶ E. Graham, A. Wakefield. **The kinetics of the conversion of creatine into creatinine in hydrochloric acid solutions.** *J. Am. Chem. Soc.* 1923, 45, 2242.
- ¹⁶⁷ C. Lempert. **The Chemistry of glycoamidines.** *Chem. Rev.* 1959, 59, 667.
- ¹⁶⁸ G. Edgar, H. E. Shiver. **The equilibrium between creatine and creatinine in aqueous solution. The effect of hydrogen.** *J. Am. Chem. Soc.* 1925, 47, 1179.
- ¹⁶⁹ K. Bloch, R. Schoenheimer. **The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen.** *J. Biol. Chem.* 1939, 131, 111.
- ¹⁷⁰ RELA - IFCC External Quality assessment scheme for Reference Laboratories in Laboratory Medicine. <http://www.dgkl-rfb.de:81/>. [Acceso el 12 de Septiembre de 2016].
- ¹⁷¹ M. J. Welch, C. P. Phinney, R. M. Parris, W. E. May, G. S. Heo, A. Henrion, G. O`Conner, H. Schimmel. **CCQM-K12: Key comparison on the determination of creatinine in human serum. Final Report.** Marzo 2003.
- ¹⁷² L. H. Shi, B. J. Kim, H. S. Lee, S. R. Park, M. Balderas Escamilla, M. Pérez Urquiza, H. Kato, C. Quan, H. Li. **CCQM-K12.1: Subsequent Key Comparison on the Determination of Creatinine in Serum. Final report.** Septiembre 2006.
- ¹⁷³ J. I. García Alonso, P. Rodríguez González. **Isotope dilution Mass Spectrometry.** Royal Society of Chemistry, Cambridge UK. 2013.
- ¹⁷⁴ D. Valkenborg, I. Mertens, F. Lemiére, E. Witters, T. Burzykowski. **The isotopic distribution conundrum.** *Mass. Spectrom. Rev.* 2012, 31, 96.
- ¹⁷⁵ J. L. Margavare, R. B. Polanski. **Relative abundance calculations for isotopic molecular species.** *J. Chem. Educ.* 1962, 39, 335.
- ¹⁷⁶ W. Bleakney. **A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor.** *Phys. Rev.* 1929, 34, 157.
- ¹⁷⁷ S. A. Scherbatskoy, T. H. Gilmartin, G. Swift. **The capacitative commutator.** *Rev. Sci. Instrum.* 1947, 18, 415.

- ¹⁷⁸ E. De Hoffmann, V. Stroobant. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. Tercera Edición, Wiley, 2007.
- ¹⁷⁹ M. C. B. Moraes, J. G. A. Brito-Neto, V. F. Juliano, C. L. do Lago. **Eliminating interferences of M-nH ions in isotope patterns from low resolution mass spectra**. *Int. J. Mass. Spectrom.* 1998, 178, 129.
- ¹⁸⁰ J. Mejia, J. A. Caruso. **Deconvolution of Isobaric Interferences in Mass Spectra**. *Am. Soc. Mass. Spectrom.* 1998, 178, 129.
- ¹⁸¹ J. I. Brauman. **Least Squares Analysis and Simplification of Multi-Isotope Mass Spectra**. *Anal. Chem.* 1966, 38, 607.
- ¹⁸² W. N. Paul Lee, L. O. Byerley, E. A. Bergner. **Mass Isotopomer Analysis: Theoretical and Practical Considerations**. *Biol. Mass. Spectrom.* 1991, 20, 451.
- ¹⁸³ C. K. Fagerquist, R. A. Neese, M. K. Hellerstein. **Molecular Ion Fragmentation and Its Effects on Mass Isotopomer Abundances of Fatty Acid Methyl Esters Ionized by Electron Impact**. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 190, 10, 430.
- ¹⁸⁴ M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn. **Interpreting mass spectra of multiply charged ions**. *Anal. Chem.* 1989, 61, 1702.
- ¹⁸⁵ J. B. Fenn, M. Mann, C. K., S. F. Wong, C. M. Whitehouse. **Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules**. *Science*. 1989, 246, 64.
- ¹⁸⁶ M. Yamashita, J. B. Fenn. **Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme**. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 4451.
- ¹⁸⁷ M. Yamashita, J. B. Fenn. **Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source**. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 4671.
- ¹⁸⁸ M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson. **Molecular Beams of Macroions**. *J. Chem. Phys.* 1968, 49, 2240.
- ¹⁸⁹ J. V. Iribarne, B. A. Thomson. **On the evaporation of small ions from charged droplets**. *J. Chem. Phys.* 1976, 64, 2287.
- ¹⁹⁰ G. A. Valaskovic, J. P. Murphy, M. S. Lee. **Automated Orthogonal Control System for Electrospray Ionization**. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2004, 15, 1201.
- ¹⁹¹ K. A. Mortier, G. F. Zhang, C. H. Van Peteghem, W. E. Lambert. **Adduct Formation in Quantitative Bioanalysis: Effect of Ionization Conditions on Paclitaxel**. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2004, 585.
- ¹⁹² J. T. Watson, O. D. Sparkman. **Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. Cuarta Edición, Wiley, 2007.

- ¹⁹³ R. E. Finnigan. **Quadrupole mass spectrometers: From development to commercialization.** *Anal Chem.* 1994, 66, 969A.
- ¹⁹⁴ M. Dauner, U. Sauer. **GC-MS Analysis of Amino Acids Rapidly Provides Rich Information for Isotopomer Balancing.** *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 642.
- ¹⁹⁵ A. J. Dempster. **A new method of positive ray analysis.** *Phys. Rev.* 1918, 11, 316.
- ¹⁹⁶ W. Bartky, A. J. Dempster. **Path of charged particles in electric and magnetic fields.** *Phys. Rev.* 1929, 33, 1019.
- ¹⁹⁷ E. De Hoffman. **Tandem mass spectrometry: a primer.** *J. Mass. Spectrom.* 1996, 31, 129.
- ¹⁹⁸ D. W. Koppenaal, C. J. Barinaga, M. B. Denton, R. P. Sperline, G. M. Hieftje, G. D. Schilling, F. J. Andrade, J. H. Barnes. **Mass spectrometry detectors.** *Anal. Chem.* 2005, 1, 419A.
- ¹⁹⁹ W. J. Fies. **A method for measuring the gain of an electron multiplier.** *Int. J. Mass. Spectrom. Ion. Proc.* 1988, 82, 111.
- ²⁰⁰ A. K. Naieni, F. Bahrami, N. Yasrebi, B. Rashidian. **Design and study of an enhanced Faraday cup detector.** *Vacumm.* 2005, 83, 1095.
- ²⁰¹ M. R. B. Ghadikolaee, E. T. Ghadikolaee. **Design of a New Faraday Cup to Measure the Beam Current of an Ion Source with Residual Gas.** *J. Fusion. Energ.* 2012, 31, 569.
- ²⁰² W. J. Griffiths, K. Karu, M. Hornshaw, G. Woffendin, Y. Wang. **Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments.** *Eur. J. Mass. Spectrom.* 2007, 13, 45.
- ²⁰³ R. Madsen, T. Lundstelt, J. Trygg. **Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis.** *Anal. Chim. Acta.* 2010, 659, 23.
- ²⁰⁴ J. F. Xiao, B. Zhou, H. W. Reason. **Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based Metabolomics.** *Trends. Anal. Chem.* 2012, 32, 1.
- ²⁰⁵ E. S. Rosenblum, M. R. Viant, B. M. Braid, J. D. Moore, C. S. Friedman, R. S. Tjeerdema. **Characterizing the metabolic actions of natural stresses in the California red abalone, *Haliotis rufescens* using ¹H NMR metabolomics.** *Metabolomics.* 2005, 1, 199.
- ²⁰⁶ W. J. Griffiths, T. Koal, Y. Wang, M. Kohl, D. P. Enot, H. P. Deigner. **Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5426.
- ²⁰⁷ M. S. Monteiro, M. Carvalho, M. L. Bastos, P. G. De Pinho. **Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges.** *Curr. Med. Chem.* 2013, 20, 257.

- ²⁰⁸ O. Fiehn. **Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks.** *Comp. Funct. Genom.* 2001, 2, 155.
- ²⁰⁹ H. C. Urey, J.R. Huffman, H. G. Thode, M. Fox. **Concentration of N15 by Chemical Methods.** *J. Chem. Phys.* 1937, 5, 856.
- ²¹⁰ R. Schoenheimer, D. Rittenberg. **Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism.** *Science.* 1935, 16, 156.
- ²¹¹ R. Schoenheimer, D. Rittenberg. **Studies in protein metabolism. The metabolic activity of body proteins investigated with L-Leucine containing two isotopes.** *Nutr. Rev.* 1939, 26, 703.
- ²¹² S. Ruben, M. D. Kamen. **Long-Lived Radioactive Carbon: C 14.** *Phys. Rev.* 1941, 59, 349.
- ²¹³ M. Cohn. **Some early tracer experiments with stable isotopes.** *Protein Sci.* 1995, 4, 2444.
- ²¹⁴ C. H. Wang, I. Stern, C. M. Gilmour, S. Klungsoyr, D. J. Reed, J. J. Bialy, B. E. Chritensen, V. H. Cheldelin. **Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method.** *J. Bacteriol.* 1958, 76, 207.
- ²¹⁵ H. H. Hiatt. **Studies of ribose metabolism. Pathways of ribose synthesis in man.** *J Clin Invest.* 1958, 37, 1461.
- ²¹⁶ J. E. Cremer. **Amino acid metabolism in rat brain studied with ¹⁴C-labelled glucose.** *J. Neurochem.* 1964, 11, 165.
- ²¹⁷ H. Spencer, R. Eisenger, D. Laszlo. **Metabolic and Radioactive Tracer Studies in Carcinoma of the Prostate.** *Am. J. Med.* 1958, 29, 282.
- ²¹⁸ B. Zumoff, J. Fishman, T. F. Gallagher, L. Hellman. **Estradiol metabolism in Cirrhosis.** *J. Clin. Invest.* 1968, 47, 20.
- ²¹⁹ C. H. Gray, J. M. Greenaway, N. J. Holness, D. A. Shaw. **The metabolism of 4-¹⁴C cortisol in a patient with cushing's syndrome.** *J. Endocrin.* 1962, 24, 199.
- ²²⁰ V. Moses, M. J. H. Smith. **Anti-Inflammatory Drugs and Intermediary Metabolism.** *Biochem. J.* 1961, 78, 424.
- ²²¹ D. M. Bier, K. J. Arnold, W. R. Sherman, W. H. Holland, W. F. Holmes, D. M. Kipnis. **In-vivo Measurement of Glucose and Alanine Metabolism with Stable Isotopic Tracers.** *Diabetes.* 1977, 26, 1005.
- ²²² K. Sonntag, L. Eggeling, A. A. De Graff, H. Sahm. **Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in Corynebacterium glutamicum Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy.** *Eur. J. Biochem.* 1993, 213, 1325.

- ²²³ J. L. Brazier, B. Ribon, M. Desage. **Study of Theophylline Metabolism in Premature Human Newborns Using Stable Isotope Labelling.** *Biomed. Mass Spectrom.* 1980, 7, 189.
- ²²⁴ H. C. Curtius, J. A. Vollmin, K. Baerlocher. **Study of Metabolic Pathways in Vivo Using Stable Isotopes.** *Anal. Chem.* 1973, 45, 1107.
- ²²⁵ R. J. Evans, D. Wang, F. A. Agblevor, H. L. Chum, S. D. Baldwin. **Mass spectrometric studies of the thermal decomposition of carbohydrates using ¹³C-labeled cellulose and glucose.** *Carbohydr. Res.* 1996, 281, 219.
- ²²⁶ C. J. Packard. **The role of stable isotopes in the investigation of plasma lipoprotein metabolism.** *Baillere. Clin. Endoc.* 1995, 9, 755.
- ²²⁷ R. G. Douglas, J. H. F. Shaw. **Metabolic effects of cancer.** *Br. J. Surg.* 1990, 77, 246.
- ²²⁸ N. J. Haskins. **The Application of Stable Isotopes in Biomedical Research.** *Biomed. Mass. Spectrom.* 1982, 9, 269.
- ²²⁹ J. V. Leonard, S. J. R. Heales. **The investigation of inborn errors in vivo using stable isotopes.** *Eur. J. Pediatr.* 1994, 153, S81.
- ²³⁰ F. Magkos, B. Mittendorfer. **Stable isotope-labeled tracers for the investigation of fatty acid and triglyceride metabolism in humans in vivo.** *Clin. Lipidol.* 2009, 4, 215.
- ²³¹ D. J. Creek, A. Chokkathukalam, A. Jankevics, K. E. V. Burgess, R. Breiling, M. P. Barret. **Stable Isotope-Assisted Metabolomics for Network-Wide Metabolic Pathway Elucidation.** *Anal. Chem.* 2012, 84, 8442.
- ²³² B. Wu, B. Zhang, X. Feng, J. R. Rubens, R. Huang, L. M. Hicks, H. B. Pakrasi, Y. J. Tang. **Alternative isoleucine synthesis pathway in cyanobacterial species.** *Microbiology.* 2010, 156, 596.
- ²³³ S. Pu, H. Yang, P. J. H. Jones. **Using stable isotopes to trace diet-induced shifts in pathways of lipid metabolism.** *Lipid Technol.* 2013, 25, 63.
- ²³⁴ I. W. Bogoraz, T. S. Lin, J. C. Liao. **Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation.** *Nature,* 2013, 502, 693.
- ²³⁵ M. Hasokawa, M. Shinohara, H. Tsugawa, T. Bamba, E. Fukusaki, S. Nishiumi, K. Nishimura, M. Yoshida, T. Ishida, K. Hirata. **Identification of Biomarkers of Stent Restenosis with Serum Metabolomic Profiling Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry.** *Circulation J.* 2012, 76, 1864.
- ²³⁶ E. Trushina, T. Dutta, X. M. T. Persson, M. M. Mielke, R. C. Petersen. **Identification of Altered Metabolic Pathways in Plasma and CSF in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Using Metabolomics.** *Plos. One.* 2013, 8, 1.

- ²³⁷ M. G. Vander Heiden. **Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens.** *Nature. Rev.* 2011, 10, 671.
- ²³⁸ S. C. Gupta, J. H. Kim, S. Prasad, B. B. Aggarwal. **Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals.** *Cancer Metastasis Rev.* 2010, 29, 405.
- ²³⁹ O. Warburg, K. Posener, E. Negelein. **Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.** *Febs. J.* 1924, 152, 309.
- ²⁴⁰ J. Zhang, W. S. Ahn, P. A. Gameiro, M. A. Keibler, Z. Zhang, G. Stephanopoulos. **¹³C Isotope-Assisted Methods for Quantifying Glutamine Metabolism in Cancer Cells.** *Methods. Enzymol.* 2014, 542, 369.
- ²⁴¹ Y. Luo, J. Yoneda, H. Ohmori, T. Ssaki, K. Shimbo, S. Eto, Y. Kato, H. Miyano, T. Kobayshai, T. Sasahira, Y. Chihara, H. Kuniyasu. **Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository.** *Cancer. Res.* 2014, 74, 330.
- ²⁴² T. W. M. Fan, A. N. Lane, R. M. Higashi, M. A. Farag, H. Gao, M. Bousamra, D. M. Miller. **Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by ¹³C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM).** *Mol. Cancer.* 2009, 8, 41.
- ²⁴³ N. Serkova, L. G. Boros. **Detection of Resistance to Imatinib by Metabolic Profiling.** *Am. J. Pharmacogenomics.* 2005, 5, 293.
- ²⁴⁴ T. W. M. Fan, P. Lorkiewicz, K. Sellers, H. N. B. Moseley, R. M. Higashi, A. N. Lane. **Stable isotope-resolved metabolomics and applications for drug development.** *Pharmacol. Ther.* 2012, 133, 366.
- ²⁴⁵ D. M. Harris, L. Li, M. Chen, F. T. Lagunero, V. L. W. Go, L. G. Boros. **Diverse mechanisms of growth inhibition by luteolin, resveratrol, and quercetin in MIA PaCa-2 cells: a comparative glucose tracer study with the fatty acid synthase inhibitor C75.** *Metabolomics.* 2012, 8, 201.
- ²⁴⁶ A. N. Lane, T. W. M. Fan, R. M. Higashi. **Stable Isotope-Assisted Metabolomics in Cancer Research.** *Life.* 2008, 60, 124.
- ²⁴⁷ L. You, B. Zhang, Y. J. Tang. **Application of Stable Isotope-Assisted Metabolomics for Cell Metabolism Studies.** *Metabolites.* 2014, 4, 142.
- ²⁴⁸ J. K. H. Tang, L. You, R. E. Blankenship, Y. J. Tang. **Recent advances in mapping environmental microbial metabolisms through ¹³C isotopic fingerprints.** *J. R. Soc. Interface.* 2012, 9, 2767.
- ²⁴⁹ S. G. Villas-Boas, J. H. Pedersen, M. Akesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen. **Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods.** *Yeast.* 2005, 22, 1155.

- ²⁵⁰ C. A. Sellick, D. Knight, A. S. Croxford, A. R. Maqsood, G. M. Stephens, R. Goodacre, A. J. Dickson. **Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets.** *Metabolomics*. 2010, 6, 427.
- ²⁵¹ W. Lu, B. D. Bennett, J. D. Rabinowitz. **Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics.** *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2008, 871, 236.
- ²⁵² W. S. Ahn, M. R. Antoniewicz. **Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry.** *Metab. Eng.* 2011, 13, 598.
- ²⁵³ J. C. Catham, B. Bouchard, C. Des Rosiers. **A comparison between NMR and GCMS ¹³Cisotopomer analysis in cardiac metabolism.** *Mol. Cell. Biochem.* 2003, 249, 105.
- ²⁵⁴ R. J. Kleijn, J. M. A. Geertman, B. K. Nfor, C. Ras, D. Schipper, J. T. Pronk, J. J. Heijnen, A. J. A. Van Maris, W. A. Van Winden. **Metabolic flux analysis of a glycerol-over producing *Saccharomyces cerevisiae* strain based on GC-MS, LC-MS and NMR-derived ¹³C-labelling data.** *FEMS. Yeast, Res.* 2007, 7, 216.
- ²⁵⁵ J. Choi, M. R. Antoniewicz. **Tandem mass spectrometry: A novel approach for metabolic flux analysis.** *Metab. Eng.* 2011, 13, 225.
- ²⁵⁶ Y. Yuan, T. Hoon, E. Heinzle. **¹³C metabolic flux analysis for larger scale cultivation using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry.** *Metab. Eng.* 2010, 12, 392.
- ²⁵⁷ M. R. Antoniewicz, J. K. Kelleher, G. Stephanopoulos. **Accurate Assessment of Amino Acid Mass Isotopomer Distributions for Metabolic Flux Analysis.** *Anal. Chem.* 2007, 79, 7554.
- ²⁵⁸ J. Y. Jung, M. K. Oh. **Isotope labeling pattern study of central carbon metabolites using GC/MS.** *J. Chromatogr. B.* 2015, 974, 101.
- ²⁵⁹ T. H. Yang, C. J. Bolten, M. V. Coppi, J. Sun, E. Heinzle. **Numerical bias estimation for mass spectrometric mass isotopomer analysis.** *Anal. Biochem.* 2009, 388, 192.
- ²⁶⁰ K. Biemann. **Mass spectrometry: Organic chemical applications.** Capitulo 5. McGraw-Hill. 1962.
- ²⁶¹ C. A. Fernández, C. Des Rosiers, S. F. Previs. **Correction of ¹³C Mass Isotopomer Distributions for Natural Stable Isotope Abundance.** *J. Mass. Spectrom.* 1996, 31, 255.
- ²⁶² C. Des Rosiers, J. A. Montgomery, S. Desrochers, M. Garneau, F. David, O. A. Mamer, H. Brunengraber. **Interference of 3-Hydroxyisobutyrate with Measurements**

of Ketone Body Concentration and Isotopic Enrichment by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 1988, 173, 96.

²⁶³ C. Wittmann, E. Heinzle. **Mass Spectrometry for Metabolic Flux Analysis.** *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 62, 739.

²⁶⁴ W. A. Van Winden, C. Wittmann, E. Heinzle, J. J. Heijnen. **Correcting Mass Isotopomer Distributions for Naturally Occurring Isotopes.** *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 80, 477.

²⁶⁵ M. E. Jennings, D. E. Matthews. **Determination of Complex Isotopomer Patterns in Isotopically Labeled Compounds by Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 2005, 77, 6435.

²⁶⁶ B. Christensen, J. Nielsen. **Isotopomer analysis using GC-MS.** *Metab. Eng.* 1999, 1, 282.

²⁶⁷ L. Di Donato, C. Des Rosiers, J. A. Montgomery, F. David, M. Garneau, H. Brunengraber. **Rates of Gluconeogenesis and Citric Acid Cycle in Perfused Livers, Assessed from the Mass Spectrometric Assay of the ¹³C Labeling Pattern of Glutamate.** *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 4170.

²⁶⁸ C. Des Rosiers, L. Di Donato, B. Comte, A. Laplante, C. Marcoux, F. David, C. A. Fernández, H. Brunengraber. **Isotopomer Analysis of Citric Acid Cycle and Gluconeogenesis in Rat Liver.** *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 10027.

²⁶⁹ J. Katz, P. Walst, W. N. P. Lee. **Isotopomer Studies of Gluconeogenesis and the Krebs cycle with ¹³C-Labeled Lactate.** *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 25509.

²⁷⁰ P. Kiefer, C. Nicolas, F. Letisse, J. C. Portais. **Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry.** *Anal. Biochem.* 2007, 360, 182.

²⁷¹ F. M. H. Jeffrey, J. S. Roach, C. J. Storey, A. D. Sherry, C. R. Malloy. **¹³C Isotopomer Analysis of Glutamate by Tandem Mass Spectrometry.** *Anal. Biochem.* 2002, 300, 192.

²⁷² M. Rühl, B. Rupp, K. Nöh, W. Wiechert, U. Sauer, N. Zamboni. **Collisional Fragmentation of Central Carbon Metabolites in LC-MS/MS Increases Precision of ¹³C Metabolic Flux Analysis.** *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109, 763.

²⁷³ J. Choi, M. T. Grossbach, M. R. Antoniewicz. **Measuring Complete Isotopomer Distribution of Aspartate Using Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.* 2012, 84, 4628.

²⁷⁴ R. Schoenheimer, S. Ratner, D. Rittenberg. **The metabolic activity of body proteins investigated with L-Leucina containing two isotopes.** *J. Biol. Chem.* 1939, 130, 703.

- ²⁷⁵ R. Schoenheimer. **The Dynamic State of Body Constituents.** Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1942.
- ²⁷⁶ E. Borek, L. Ponticorvo, D. Rittenberg. **Protein turnover in micro-organism.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1958, 44, 369.
- ²⁷⁷ H. Eagle, K. A. Piez, R. Fleishman, V. I. Oyama. **Protein turnover in mammalian cell cultures.** *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 592.
- ²⁷⁸ R. C. Huffaker, L. W. Peterson. **Protein turnover in plants and possible means of its regulation.** *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 1974, 25, 363.
- ²⁷⁹ J. M. Pratt, J. Petty, I. Riba-Garcia, H. Duncan, L. Robertson, S. J. Gaskell, S. G. Oliver, R. J. Beynon. **Dynamics of Protein Turnover, a Missing Dimension in Proteomics.** *Mol. Cell. Proteomics.* 2002, 1, 579.
- ²⁸⁰ P. J. Garlick, M. A. McNurlan, V. R. Preedy. **A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of ³H phenylalanine.** *Biochem. J.* 1980, 192, 719.
- ²⁸¹ C. Gerner, S. Vejda, D. Gelbmann, E. Bayer, J. Gotzmann, R. Schulte-Hermann, W. Mikulits. **Concomitant Determination of Absolute Values of Cellular Protein Amounts, Synthesis Rates, and Turnover Rates by Quantitative Proteome Profiling.** *Mol. Cell. Proteomics.* 2002, 1, 528.
- ²⁸² S. G. Lamarre, R. J. Saulnier, P. U. Blier, W. R. Driedzic. **A rapid and convenient method for measuring the fractional rate of protein synthesis in ectothermic animal tissues using a stable isotope tracer.** *Biochem. Mol. Biol.* 2015, 182, 1.
- ²⁸³ M. K. Hellerstein, R. A. Neese. **Mass isotopomer distribution analysis at eight years: theoretical, analytic, and experimental considerations.** *Am. J. Physiol.* 1999, 276, E1146.
- ²⁸⁴ T. Kasumov, S. Ilchenko, L. Li, N. Rachdaoui, R. G. Sadygov, B. Willard, A. J. McCullough, S. Previs. **Measuring protein synthesis using metabolic ²H labeling, high-resolution mass spectrometry, and an algorithm.** *Anal. Biochem.* 2011, 415, 47.
- ²⁸⁵ A. Y. H. Lee, N. A. Yates, M. Ichetovkin, E. Deyanova, K. Southwick, T. S. Ficher, W. Wang, J. Loderstedt, N. Walker, H. Zhou, X. Zhao, C. P. Sparrow, B. K. Hubbard, D. J. Rader, A. Sitlani, J. S. Millar, R. C. Hendrickson. **Measurement of Fractional Synthetic Rates of Multiple Protein Analytes by Triple Quadrupole Mass Spectrometry.** *Clin. Chem.* 2012, 58, 619.
- ²⁸⁶ P. J. Garlick, M. A. McNurlan, G. Caso. **Critical Assessment of Methods Used to Measure Protein Synthesis in Human Subjects.** *Yale. J. Biol. Med.* 197, 70, 65.
- ²⁸⁷ M. J. Rennie, K. Smith, P. W. Watt. **Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach.** *Am. J. Physiol.* 1994, 266, E298.

- ²⁸⁸ R. Busch, Y. K. Kim, R. A. Neese, V. Schade-Serin, M. Collins, M. Awada, J. L. Gardner, C. Beysen, M. E. Marino, L. M. Misell, M. K. Hellerstein. **Measurement of protein turnover rates by heavy water labeling of nonessential amino acids.** *Biochem. Biophys. Acta.* 2006, 1760, 730.
- ²⁸⁹ S. F. Previs, R. Fatica, V. Chandramouli, J. C. Alexander, H. Brunengraber, B. R. Landau. **Quantifying rates of protein synthesis in humans by use of ²H₂O: application to patients with end-stage renal disease.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 286, E665.
- ²⁹⁰ M. Di Buono, P. J. H. Jones, L. Beaumier, L. J. Wykes. **Comparison of deuterium incorporation and mass isotopomer distribution analysis for measurement of human cholesterol biosynthesis.** *J. Lipid. Res.* 2000, 41, 1516.
- ²⁹¹ M. K. Hellerstein, M. Christiansen, S. Kaempfer, C. Kletke, K. Wu, J. S. Reid, K. Mulligan, N. S. Hellerstein, C. H. L. Shackleton. **Measurement of De Novo Hepatic Lipogenesis in Humans Using Stable Isotopes.** *J. Clin. Invest.* 1991, 87, 1841.
- ²⁹² D. Faix, R. Neese, C. Kletke, S. Wolden, D. Cesar, M. Coutlangus, C. H. L. Shackleton, M. K. Hellerstein. **Quantification of menstrual and diurnal periodicities in rates of cholesterol and fat synthesis in humans.** *J. Lipid. Res.* 1993, 345, 2063.
- ²⁹³ A. De Riva, M. J. Deery, S. McDonald, T. Lund, R. Busch. **Measurement of protein synthesis using heavy water labeling and peptide mass spectrometry: Discrimination between major histocompatibility complex allotypes.** *Anal. Biochem.* 2010, 403, 1.
- ²⁹⁴ C. Papageorgopoulos, K. Caldwell, C. Shackleton, H. Schweingrubber, M. K. Hellerstein. **Measuring Protein Synthesis by Mass Isotopomer Distribution Analysis (MIDA).** *Anal. Biochem.* 1999, 267, 1.
- ²⁹⁵ C. Papageorgopoulos, K. Caldwell, H. Schweingrubber, R. A. Neese, C. Shackleton, M. Hellerstein. **Measuring synthesis rates of muscle creatine kinase and myosin with stable isotopes and mass spectrometry.** *Anal. Biochem.* 2002, 309, 1.
- ²⁹⁶ J. Ignacio García Alonso, P. Rodríguez-González, **La dilución isotópica en el análisis de trazas, en Análisis Químico de trazas** (Carmen Cámara, Concepción Pérez-Conde editores) Editorial Síntesis, 2011, España.
- ²⁹⁷ J. Mejía, L. Ouerdane, Z. Mester. **Describing chemical transformations in multiple spiking Isotope dilution: fundamental aspects and definition.** *Analyst.* 2009, 134, 466.
- ²⁹⁸ J. I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González-Antuña. **Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules.** *Anal. Chim. Acta.* 2010, 664, 68.

- ²⁹⁹ J. I. García-Alonso, P. Rodríguez-González. **Response to “Comments on the uncertainties in isotope patterns of molecules” by J. Meija and Z. Mester (doi:10.1016/j.aca.2010.09.029).** *Anal. Chim. Acta.* 2011, 694, 177.
- ³⁰⁰ H. Kubinyi. **Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem.** *Anal. Chim. Acta.* 1991, 247, 107.
- ³⁰¹ J. Meija, J. A. Caruso. **Deconvolution of Isobaric Interferences in Mass Spectra.** *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2004, 15, 654.
- ³⁰² J. Kragten. **Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique.** *Analyst.* 1994, 119, 2161.
- ³⁰³ A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. I. García-Alonso. **Evaluation of minimal labelling for stable isotope dilution in organic analysis.** *Analyst.* 2010, 135, 953.
- ³⁰⁴ D. Stöckl, P. M. Sluss, L. M. Thienpont. **Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis.** *Clin. Chim. Acta.* 2009, 408, 8.
- ³⁰⁵ L. J. Owen, J. E. Wear, B. G. Keevil. **Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods.** *Ann. Clin. Biochem.* 2006, 43, 118.
- ³⁰⁶ S. Vickery, P. E. Stevens, R. N. Dalton, F. Van Lente, E. J. Lamb. **Does the ID-MS traceable MDRD equation work and is it suitable for use with compensated Jaffe´ and enzymatic creatinine assays?.** *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 2439.
- ³⁰⁷ J. Z. Ji, Q. H. Meng. **Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays.** *Clin. Chim. Acta.* 2001, 412, 1550.