



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

## **Trabajo Fin de Máster**

*Desarrollo de un procedimiento para la  
determinación de la pureza de péptidos mediante  
dilución isotópica y espectrometría de masas trazable al  
Sistema Internacional de Unidades*

**Enrique Parajón Antón**

**Julio 2020, Oviedo**



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (IDMS) .....	3
1.2. CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS MEDIANTE EL USO DE ISÓTOPOS ESTABLES ENRIQUECIDOS .....	7
A. Cuantificación absoluta .....	8
A.1. IDMS con adición de aminoácidos marcados isotópicamente .....	8
A.2. IDMS con adición de péptidos marcados isotópicamente .....	9
A.3. IDMS con adición de proteínas marcadas isotópicamente .....	10
B. Cuantificación relativa .....	11
B.1. Marcaje metabólico .....	11
B.2. Marcaje proteolítico .....	12
B.3. Marcaje químico .....	12
1.3. EL PROCESO DE HIDRÓLISIS EN LA CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS/PROTEÍNAS .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>16</b>
3.1. INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA .....	16
3.1.1. Equipo generador de microondas .....	16
3.1.2. Equipo GC-MS/MS .....	16
3.1.3. Instrumentación secundaria .....	16
3.3. REACTIVOS UTILIZADOS .....	17
3.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	18
3.4.1. Derivatización de los aminoácidos .....	18
3.4.2. Cálculo de la pureza espectral de clústeres isotópicos .....	21
3.4.3. Cálculo del enriquecimiento isotópico en moléculas marcadas .....	22
3.4.4. Validación de la medida de las transiciones en modo SRM .....	22
3.4.5. Purificación de la Ang-I de abundancia natural por colección de fracciones mediante HPLC-semipreparativo .....	23
3.4.6. Caracterización de la Ang-I sintética (marcada en <sup>13</sup> C y de abundancia isotópica natural) por UHPLC-ESI-MS/MS .....	24
3.4.7. Cálculo de la concentración de la Ang-I sintetizada trazable al SI .....	25
3.4.8. Cálculo de la concentración de los aminoácidos marcados en <sup>13</sup> C trazables al SI empleados en la hidrólisis peptídica .....	26
3.4.9. Hidrólisis asistida por microondas focalizado .....	26
3.4.10. Determinación de los aminoácidos hidrolizados y porcentaje de recuperación del método. ....	28

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
4.1. CONFIRMACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS DERIVATIZADOS POR GC-MS .....	29
4.2. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ESPECTRAL DE LOS AMINOÁCIDOS DERIVATIZADOS .....	33
4.3. DETERMINACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO DE LOS AMINOÁCIDOS MARCADOS EN <sup>13</sup> C DERIVATIZADOS Y ELECCIÓN DEL REACTIVO SILANIZANTE.....	35
4.4. VALIDACIÓN DE LA MEDIDA DE LAS TRANSICIONES EN SRM PARA LOS AMINOÁCIDOS DERIVATIZADOS CON MTBSTFA.....	38
4.5. MEDIDA DE LA DISTRIBUCIÓN ISOTÓPICA DE ANG-I (MARCADA EN <sup>13</sup> C Y DE ABUNDANCIA NATURAL) MEDIANTE UHPLC-ESI-MS/MS .....	41
4.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL PATRÓN DE ANG-I SINTETIZADO EN EL LABORATORIO. ....	42
4.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS MARCADOS EN <sup>13</sup> C.....	43
4.8. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE HIDRÓLISIS .....	45
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>51</b>



## Abreviaturas y acrónimos

<b>Ang-I</b> .....	Angiotensina I.
<b>AQUA</b> .....	Absolute Quantification- Cuantificación absoluta.
<b>BSTFA</b> .....	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida.
<b>CPS</b> .....	Cuentas por Segundo.
<b>CRM</b> .....	Certified Reference Material- Material de referencia certificado.
<b>EI</b> .....	Electron Ionization- Ionización electrónica.
<b>ESI</b> .....	Electrospray Ionization- Ionización por electrospray.
<b>GC</b> .....	Gas Chromatography- Cromatografía de gases.
<b>HPLC</b> .....	High Performance Liquid Chromatography- Cromatografía líquida de alta resolución.
<b>ICAT</b> .....	Isotope Code Affinity Tagging- Marcaje por afinidad con codificación isotópica.
<b>IDMS</b> .....	Isotope Dilution Mass Spectrometry- Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas.
<b>IPD</b> .....	Isotope Pattern Deconvolution- Deconvolución de perfiles isotópicos.
<b>iTRAQ</b> .....	Isobaric Tags for Absolute and Relative Quantification- Etiquetado isobárico para la cuantificación absoluta y relativa.
<b>LC</b> .....	Liquid Chromatography- Cromatografía líquida.
<b>MS</b> .....	Mass Spectrometry- Espectrometría de masas.
<b>MS/MS</b> .....	Espectrometría de masas en tándem.
<b>MTBSTFA</b> .....	N-metil-N-(tertbutildimetilsilil)trifluoroacetamida.
<b>NIST</b> .....	National Institute of Standards and Technology- Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.
<b>PI</b> .....	Product Ion Scan- Barrido de iones producto.
<b>PICCA</b> .....	Peptide Impurity Corrected Amino Acid- Análisis de aminoácidos en péptidos con corrección de impurezas.
<b>PSAQ</b> .....	Protein Standard Absolute Quantification- Cuantificación absoluta estándar de proteínas.
<b>QqQ</b> .....	Triple cuadrupolo.

- QconCAT**.....Multiplexed Absolute Quantification for Proteomics Using Concatenated Signature Peptides- Cuantificación absoluta múltiple utilizando péptidos concatenados.
- rhGH**.....Recombinant Human Growth Hormone- Hormona del crecimiento humana recombinante.
- SI**.....Sistema Internacional de Unidades.
- SILAC**.....Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture- Marcaje isotópico estable de aminoácidos en cultivo celular.
- SIM**.....Selected Ion Monitoring- Monitoreo selectivo de iones.
- SRM**.....Selected Reaction Monitoring- Monitoreo selectivo de reacciones.
- SSR**.....Sum of Squared Residuals- Suma cuadrática de residuales.
- t-BDMCS**.....Tertbutildimetilclorosilano.
- TBDMS**.....Grupo tertbutildimetilsililo.
- TMCS**.....Trimetilclorosilano.
- TMS**.....Grupo trimetilsililo.
- TMTs**.....Tandem Mass Tags- Etiquetas de masas en tándem.
- UHPLC**.....Ultra High Performance Liquid Chromatography- Cromatografía líquida de ultra alta resolución.
- UV-VIS**.....Ultravioleta-visible.

## 1. Introducción

En la actualidad, existe una gran demanda en determinaciones analíticas de péptidos y proteínas cuyo análisis facilite el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de ciertos tipos de enfermedades. Las metodologías empleadas para dicho fin necesitan patrones de péptidos o proteínas cuya pureza debe ser certificada con un alto grado de exactitud y precisión. Las casas comerciales que suministran péptidos y proteínas certifican el valor de pureza mediante un rango (por ejemplo,  $\geq 90\%$  o  $\geq 95\%$ ), el cual es obtenido frecuentemente mediante análisis por HPLC.

Los laboratorios clínicos utilizan CRMs para llevar a cabo metodologías analíticas que permitan la cuantificación de biomarcadores clínicos, como por ejemplo las angiotensinas (hipertensión), la hormona paratiroidea (enfermedad renal crónica), o la insulina y el péptido C (diabetes) [1].

Los Institutos Nacionales de Metrología distribuyen los CRMs acompañados con un certificado de la pureza y su incertidumbre asociada, cuyo valor es obtenido principalmente mediante el procedimiento del balance de masas. Este procedimiento proporciona una medida del componente principal del material mediante la identificación y determinación de todas las impurezas que acompañan al material, restándolas del 100%. En el caso de péptidos y proteínas, el uso del procedimiento del balance de masas no proporciona la información necesaria acerca de las posibles estructuras que pueden adoptar los complejos proteicos estudiados. Esto provoca que la calidad final del material radique en la determinación de la secuencia de aminoácidos que forman la estructura primaria, lo cual puede no llegar a correlacionar la cantidad de material con su verdadera actividad biológica en el medio de estudio. Además, el procedimiento del balance de masas requiere de elevadas cantidades de péptidos o proteínas puros, cuya cantidad es normalmente escasa [1].

Una alternativa que utiliza una cantidad menor de muestra es la basada en la corrección de las impurezas en péptidos mediante análisis de aminoácidos (PICAA). Su fundamento se basa en cuantificar los aminoácidos liberados en procesos completos de hidrólisis del material peptídico y corregir la cantidad de aminoácidos liberados correspondientes a impurezas de estructuras peptídicas similares [1]. La metodología analítica escogida en la cuantificación de los

## 1. Introducción

---

aminoácidos es el IDMS, debido a que es un método analítico absoluto que proporciona resultados directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades.

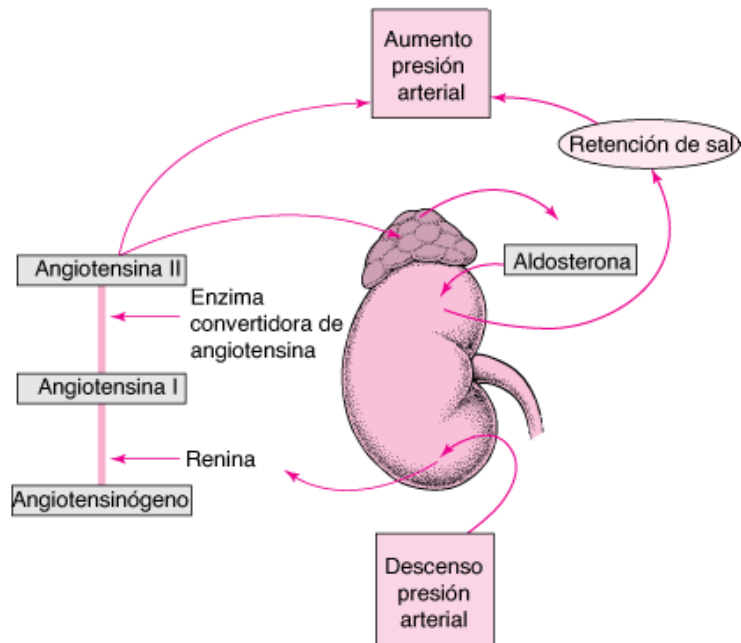
Antes de su detección por espectrometría de masas, es necesario separar los aminoácidos mediante una etapa cromatográfica. Se han utilizado distintos tipos de separaciones basadas en HPLC como separaciones de fase reversa, interacción hidrofílica e intercambio iónico. Cuando se utiliza la cromatografía de gases con detección mediante MS es necesario aplicar un proceso previo de derivatización [1].

Adicionalmente al PCAA, también es común encontrar metodologías de análisis de pureza de péptidos como la resonancia magnética nuclear cuantitativa o la determinación de nitrógeno por análisis elemental "CHN/O" [1].

Un artículo de Josephs et al. [2] emplea y compara las cuatro técnicas anteriormente comentadas para evaluar la pureza del péptido angiotensina I (Ang-I), con un certificado de pureza obtenido mediante análisis por HPLC. Todas estas técnicas proporcionaron resultados de pureza de aproximadamente  $800 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}=100\%$ ), los cuales difieren del valor declarado por el fabricante de  $>950 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . En este artículo también se afirma que el método del balance de masas es poco práctico, al haberse utilizado un volumen elevado de material peptídico en todas las determinaciones y al haber empleado una gran cantidad de técnicas analíticas.

El péptido Ang-I analizado en el artículo [2] participa en el sistema hormonal renina-angiotensina-aldosterona, (esquemático en la Figura 1) y está considerado como un biomarcador clínico de hipertensión. Dicho mecanismo consiste en una serie de reacciones enzimáticas que generan un producto, la angiotensina II, que interviene en la regulación de la presión arterial y en la retención de sodio y agua en los riñones. Debido a la importancia que tienen los péptidos de angiotensina en la regulación de la presión arterial, existe una gran demanda de métodos analíticos que proporcionen resultados de pureza exactos y trazables de los péptidos de angiotensina. Uno de estos métodos analíticos es el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS).





**Figura 1.** Representación esquemática del proceso de regulación de la presión arterial mediante el conjunto de reacciones enzimáticas que forman el sistema renina-angiotensina-aldosterona [3].

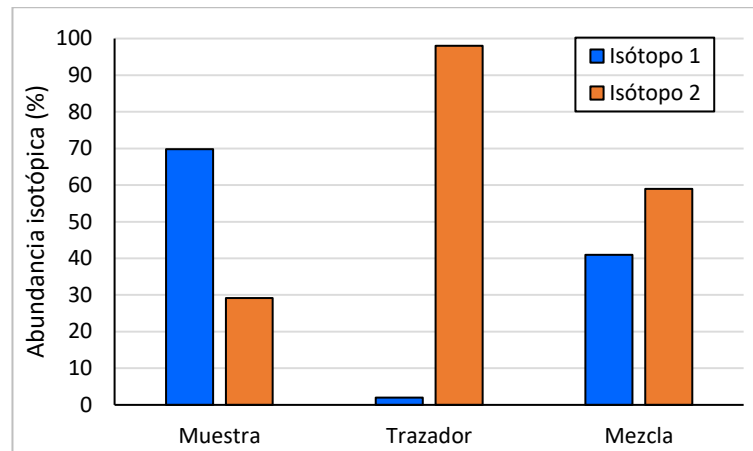
### 1.1. Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS)

El IDMS es un método analítico cuyo fundamento reside en la medida de las abundancias isotópicas de un elemento o molécula en la muestra mediante MS, tras la adición de una cantidad perfectamente conocida de dicho elemento o molécula de composición isotópica enriquecida en un isótopo poco abundante, comúnmente definido como trazador. Está considerado como un método analítico absoluto que proporciona resultados directamente trazables al SI. Además, también destaca por ofrecer resultados analíticos de una gran exactitud y precisión, lo que le convierte en una excelente herramienta para la certificación de CRMs o para la validación de otros métodos analíticos de menor calidad metrológica [4]. El IDMS también ofrece la posibilidad de analizar tanto componentes mayoritarios (%) como ultratrazas ( $<pg \cdot g^{-1}$ ) de elementos y compuestos en varios tipos de matrices [5].

El concepto de la dilución isotópica se encuentra ilustrado en la Figura 2. Para un elemento que posee dos isótopos estables (1 y 2) podemos considerar una muestra que contenga el elemento de abundancia isotópica natural (isótopo 1 mayoritario e isótopo 2 minoritario). Por otro lado, si disponemos de

## 1. Introducción

un trazador enriquecido en el isótopo 2 y se lo añadimos a la muestra, la mezcla presentará una redistribución de las abundancias isotópicas que dependerá de la cantidad de trazador añadida y de la cantidad inicial de muestra.



**Figura 2.** Fundamento de la dilución isotópica para un elemento bi-isotópico.

La concentración del elemento que había originalmente en la muestra se puede determinar a través de la ecuación general de la dilución isotópica, tal y como se muestra en la ecuación E1 [5]:

$$C_{muestra} = C_{trazador} \frac{m_{traz} W_{muestra} A_{trazador}^2}{m_{muestra} W_{trazador} A_{muestra}^1} \left( \frac{R_{mezcla} - R_{trazador}}{1 - R_{mezcla} \cdot R_{muestra}} \right) \quad E1$$

El significado de los distintos parámetros de la ecuación se detalla a continuación:

- $C_{muestra/traz}$  hace referencia a las concentraciones del elemento en la muestra o en el trazador.
- $m_{muestra/traz}$  es la cantidad en peso tomada de muestra o añadida de trazador.
- $W_{muestra/traz}$  es el peso atómico del elemento en la muestra o en el trazador.
- $A_{muestra}^1$  y  $A_{trazador}^2$  son las abundancias del isótopo 1 en la muestra y del isótopo 2 en el trazador, respectivamente.
- $R_{mezcla/traz/muestra}$  como las relaciones isotópicas entre el isótopo 1 y 2 en la mezcla, trazador y muestra, respectivamente.

## 1. Introducción

---

Como podemos apreciar en la ecuación E1, todos los términos son conocidos a excepción del  $R_{mezcla}$ , el cual se determina experimentalmente mediante MS con una elevada exactitud y precisión; y sin la necesidad de un calibrado metodológico que alargue los tiempos de análisis.

Además, el empleo del IDMS trae consigo ventajas adicionales con respecto a otras técnicas analíticas:

1. Cualquier pérdida de materia en la mezcla una vez que la muestra y el trazador hayan alcanzado el equilibrio isotópico no tiene ninguna influencia en el resultado final, puesto que el término  $R_{mezcla}$  es independiente de la concentración. Por lo tanto, las correcciones derivadas de separaciones no cuantitativas, diluciones o preconcentraciones no resultan necesarias.
2. Cualquier factor que ejerza influencia en la sensibilidad de la muestra va a afectar de la misma manera al trazador, por lo que el término  $R_{mezcla}$  es independiente de los efectos de matriz y de los procesos de deriva de la señal.

No obstante, cuando se amplía el concepto del IDMS a determinaciones de moléculas orgánicas surgen varias complicaciones a tener en cuenta. Las diferencias de masa existentes entre trazador y muestra pueden producir diferencias en sus propiedades fisicoquímicas [6]. Estas diferencias se intensifican a medida que aumenta la diferencia de masa relativa entre los isótopos del elemento escogido para el marcaje. Por ello, se recomienda emplear CRMs marcados en elementos no muy ligeros como el C o el N. Por otra parte, la mayoría de los elementos que podemos encontrar en los compuestos orgánicos poseen más de un isótopo estable, de tal forma que los espectros de masas obtenidos van a consistir en un conjunto de clústeres en el que no solo se incluye la masa nominal (M), sino que aparecerán contribuciones de los isótopos menos abundantes como  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o  $^{15}\text{N}$  en masas M+1, M+2, M+3, etc. Con lo cual, la adición de un compuesto marcado isotópicamente a la muestra genera una serie de solapamientos espectrales.

## 1. Introducción

Para solucionar el problema de los solapamientos espectrales se suele optar por una herramienta matemática capaz de desglosar las contribuciones individuales de cada uno de los fragmentos en un espectro de masas. Este modelo matemático se denomina deconvolución de perfiles isotópicos (IPD, por sus siglas en inglés), está basado en la regresión lineal múltiple y en él se asume que la distribución isotópica de un determinado clúster se puede expresar como una combinación lineal de los perfiles isotópicos del analito y el trazador, reflejado en la ecuación E2. Como se puede deducir en la definición anterior, trabajar con el modelo de la IPD implica el uso de abundancias isotópicas en vez de relaciones isotópicas, tal y como se ha planteado en el modelo clásico.

$$\begin{bmatrix} A_{mezcla}^1 \\ A_{mezcla}^2 \\ A_{mezcla}^3 \\ \vdots \\ A_{mezcla}^{n-1} \\ A_{mezcla}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{muestra}^1 & A_{traz}^1 \\ A_{muestra}^2 & A_{traz}^2 \\ A_{muestra}^3 & A_{traz}^3 \\ \vdots & \vdots \\ A_{muestra}^{n-1} & A_{traz}^{n-1} \\ A_{muestra}^n & A_{traz}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{marc} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \vdots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{E2}$$

Donde:

- $A_{mezcla}^n$  son las abundancias isotópicas experimentales de la mezcla.
- $A_{muestra/traz}^n$  son las abundancias isotópicas teóricas de la muestra o del trazador, respectivamente.
- $e^n$  es el término aleatorio asociado a los residuales de la regresión lineal.

Aplicando la regresión lineal múltiple, expresada en la ecuación E2, es posible obtener las fracciones molares de trazador y analito,  $x_{muestra}$  y  $x_{traz}$ , mediante un ajuste por mínimos cuadrados. Además, teniendo en cuenta que la relación de ambas fracciones molares es equivalente a la relación de moles, según la ecuación E3 [6]:

$$\frac{x_{muestra}}{x_{traz}} = \frac{N_{muestra}}{N_{traz}} \quad \text{para } N_i = \text{número de moles (trazador y muestra)}. \quad \text{E3}$$

Es posible determinar la cantidad muestra añadida a la mezcla y su concentración en la disolución inicial, puesto que los términos subrayados en amarillo en la ecuación son conocidos.

## 1. Introducción

---

Para que todos los resultados obtenidos mediante IDMS sean de la máxima calidad metrológica, es necesario que se cumplan una serie de requisitos fundamentales [4]:

1. El equilibrio isotópico entre trazador y muestra tiene que ser completo. Esto se consigue fácilmente en muestras líquidas mediante agitación, pero en muestras sólidas, en las que es necesario realizar procedimientos de digestión o extracción para llevar al analito a la disolución de manera cuantitativa, no resulta tan sencillo alcanzar dicho equilibrio.
2. Una vez se haya alcanzado el equilibrio isotópico, tanto el compuesto enriquecido isotópicamente como su análogo de abundancias naturales deben comportarse de forma idéntica a lo largo de todo el proceso analítico. Normalmente no suelen encontrarse problemas relacionados con este requisito en moléculas orgánicas, a excepción del marcaje múltiple de especies con átomos de deuterio.
3. Cualquier pérdida no cuantificable de trazador o muestra antes de haberse alcanzado el equilibrio isotópico ocasionaría una importante fuente de error.
4. La cantidad de trazador añadido a la muestra debe encontrarse dentro de un rango determinado. Cualquier exceso o defecto en la adición ocasionaría un aumento en la incertidumbre del resultado.
5. Es necesario realizar un control exhaustivo del blanco determinando su concentración en un experimento individual de IDMS con el fin corregir cualquier tipo de contaminación.
6. Las señales obtenidas mediante MS involucradas en los cálculos del IDMS deben estar libres de interferencias espectrales y de factores que afecten la exactitud de las relaciones isotópicas.

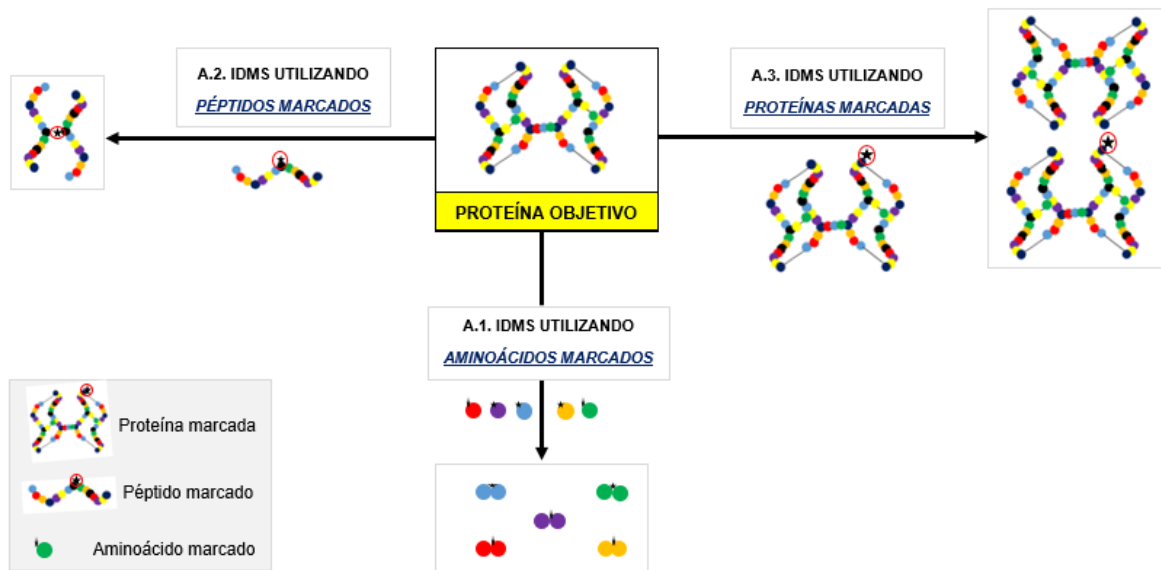
### **1.2. Cuantificación de péptidos y proteínas mediante el uso de isótopos estables enriquecidos**

El elevado crecimiento que ha experimentado la espectrometría de masas y los procedimientos de preparación de muestra, separación o procesamiento de datos ha traído consigo un gran avance en el área de la proteómica cuantitativa. Desde su primera aparición en la literatura científica [7], el uso de análogos marcados isotópicamente como patrones internos se ha convertido en una de

las metodologías más utilizadas en la cuantificación de proteínas. Dichas metodologías se dividen en dos grandes grupos:

*A. Cuantificación absoluta*

La cuantificación absoluta se refiere a determinaciones exactas y precisas de la concentración de proteínas o péptidos en una muestra. Este tipo de metodologías se pueden dividir en tres estrategias que se diferencian en función del tipo de trazador isotópico escogido. Dichas metodologías se encuentran esquematizadas en la Figura 3 [6].



**Figura 3.** Estrategias empleadas en el IDMS para la cuantificación absoluta de una proteína objetivo.

*A.1. IDMS con adición de aminoácidos marcados isotópicamente*

La concentración de los péptidos o proteínas se obtiene a través de la cuantificación de los aminoácidos liberados tras una etapa de hidrólisis de la muestra a la que se añaden aminoácidos marcados isotópicamente, los cuales se obtienen comercialmente como CRMs con un valor de pureza certificado por Institutos Nacionales de Metrología. Esto hace que las determinaciones por IDMS mediante aminoácidos marcados generen resultados directamente trazables al SI, siempre y cuando la hidrólisis previa del péptido o proteína sea completa. El apartado 1.3 del presente Trabajo Fin de Máster proporciona más detalles sobre el proceso de hidrólisis de péptidos y proteínas.

## 1. Introducción

---

La cromatografía líquida suele ser el método más utilizado para la separación de los aminoácidos liberados tras el proceso de hidrólisis [1]. No obstante, también es común encontrar trabajos en la bibliografía que utilizan la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS), tras realizar una etapa de derivatización para aumentar la volatilidad de los aminoácidos [8].

La principal limitación del uso de aminoácidos marcados isotópicamente en la cuantificación de péptidos y proteínas es que solamente es aplicable al análisis de patrones. Por lo tanto, esta estrategia no se puede emplear en análisis de muestras que contengan diferentes péptidos o proteínas. Como consecuencia, su principal aplicación es el análisis de pureza en patrones proteicos o peptídicos para conseguir trazabilidad al SI y obtener así CRMs [9]. Ejemplos de materiales de referencia caracterizados por este método son el péptido C [10], la insulina porcina [11] o la angiotensina II [12].

### *A.2. IDMS con adición de péptidos marcados isotópicamente*

Esta estrategia de cuantificación absoluta de proteínas tiene como objetivo la determinación de uno o varios péptidos proteotípicos liberados tras una etapa de digestión enzimática de la proteína. Para la correcta cuantificación de las proteínas es necesario que los péptidos elegidos sean específicos de la proteína, que la digestión enzimática sea completa y que la pureza del péptido enriquecido isotópicamente sea conocida. El principal problema de este método radica en que no es hasta después de la hidrólisis cuando el patrón interno tiene las mismas propiedades fisicoquímicas que el analito. Con lo cual, los posibles errores sistemáticos en las etapas de preparación de muestra o digestión enzimática no se corrigen, afectando a la exactitud del resultado. Otro problema frecuente, muy común de encontrar en la bibliografía, es que las digestiones enzimáticas (realizadas generalmente con tripsina) sean incompletas. Además, el uso de muestras con matrices complicadas de purificar como suero o plasma reducen la recuperación de los péptidos proteolíticos [13].

## 1. Introducción

---

Existen dos metodologías clásicas en el empleo de péptidos marcados en experimentos de IDMS: AQUA (Absolute Quantification) y QconCAT (Multiplexed Absolute Quantification for Proteomics Using Concatenated Signature Peptides).

El método AQUA utiliza péptidos sintéticos marcados isotópicamente, generalmente disponibles comercialmente. Estos péptidos son añadidos tras la digestión enzimática y se utilizan como patrones internos en análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [10]. Un ejemplo común de su aplicación son las determinaciones de las formas fosforiladas y desfosforiladas de las proteínas [14].

En la estrategia QconCAT los péptidos marcados isotópicamente se concatenan en una sola proteína artificial. Esta proteína se marca metabólicamente con isótopos estables en *E. coli*, se purifica y se añade a la muestra proteica antes de la proteólisis [15]. Esta metodología tiene la ventaja de poder cuantificar múltiples proteínas de forma simultánea, puesto que se pueden incluir varios péptidos concatenados que sean específicos de las proteínas objetivo. Por ejemplo, Anderson et al. [16] fueron capaces de determinar un total de 53 proteínas presentes en el plasma humano. El factor más diferencial en la exactitud de esta estrategia es el proceso de calibración de los péptidos concatenados [17].

### A.3. IDMS con adición de proteínas marcadas isotópicamente

Su primera aparición en la literatura científica [18] bautizó a esta estrategia como PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification), en la que se añadían proteínas marcadas a muestras de aguas de consumo y orinas para la cuantificación de toxinas (superantígenos) presentes en *Staphylococcus aureus*. Utilizar proteínas marcadas isotópicamente como patrones internos está considerado como el método que mejor relaciona las propiedades fisicoquímicas de los analitos y de los patrones internos. Esto es debido a que los patrones internos se pueden añadir en las primeras etapas de los experimentos de IDMS para compensar digestiones incompletas o pérdidas ocurridas a lo largo de las distintas etapas de preparación de muestra. La cuantificación de las proteínas se realiza tras una digestión enzimática donde se determinan uno o varios péptidos proteotípicos. Cuando se usan péptidos marcados como patrones internos (A.2.), solo ciertos péptidos proteolíticos son analizados. Esta estrategia, sin embargo, permite la determinación de varios péptidos



## 1. Introducción

---

proteotípicos, lo que incrementa el nivel de confianza de la cuantificación. Un ejemplo de proteína cuantificada por PSAQ sería rhGH en muestras de suero a una concentración de  $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  [19].

Aun siendo el método que a priori es capaz de proporcionar la mayor calidad metrológica de los resultados, existen varias limitaciones que frenan su uso. En primer lugar, la síntesis de proteínas marcadas isotópicamente es un proceso muy complicado. En segundo lugar, la certificación de la pureza de dichas proteínas se realiza mediante análisis de aminoácidos tras una hidrólisis completa. En tercer lugar, se necesita conocer con certeza todos los niveles de estructuración de la proteína analizada, puesto que cualquier diferencia estructural entre las proteínas marcadas y las naturales provocaría una pérdida de exactitud en los resultados, debido a interacciones inespecíficas dentro de la matriz o a diferentes recuperaciones en etapas de purificación que requieren de reconocimiento estructural, como inmunofluorescencia o inmuncaptura [19]. Todos estos inconvenientes hacen que el uso de proteínas marcadas como patrones internos sea una metodología lenta y cara.

### B. Cuantificación relativa

A diferencia de la cuantificación absoluta, mediante la cual es posible obtener resultados de concentración de manera exacta y precisa, la cuantificación relativa efectúa comparaciones de abundancias proteicas entre dos estados tras una modificación en el proteoma con isótopos estables enriquecidos. Al emplear marcas isotópicas, cualquier problema relacionado con la preparación de muestra o la respuesta del MS no afectará a las comparaciones con el análogo natural, asegurando la calidad del resultado. Las marcas isotópicas se pueden añadir como patrones internos de tres formas:

#### B.1. Marcaje metabólico

La estrategia del marcaje metabólico consigue introducir la marca isotópica en todas las proteínas de una muestra mediante las etapas del crecimiento y la división celular. En sus inicios, el marcaje metabólico se efectuaba con cultivos bacterianos en medios enriquecidos en  $^{15}\text{N}$  [7]. Sin embargo, el procedimiento más empleado en la actualidad es el SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture). La manera más común de efectuar un SILAC es añadiendo aminoácidos ( $^{13}\text{C}_6$ -arginina y  $^{13}\text{C}_6$ -lisina) al medio de cultivo para asegurar que

## 1. Introducción

---

todos los péptidos liberados de una digestión trípica de las proteínas contengan al menos un aminoácido marcado, con un incremento de masa constante en comparación con el péptido natural. La cuantificación relativa se consigue comparando las intensidades en los clústeres de los péptidos marcados y las de los no marcados en el espectro de masas [20].

Aunque el SILAC sea el método más empleado, el marcaje metabólico de  $^{15}\text{N}$  es muy frecuente en análisis de los proteomas de bacterias y levaduras, aunque menos común en organismos superiores [21]. La preferencia en el uso del SILAC respecto al marcaje en  $^{15}\text{N}$  es debido a que en la técnica del SILAC se añaden una serie definida de marcas isotópicas al péptido, no así en la estrategia del marcaje en  $^{15}\text{N}$  donde el número de marcas de  $^{15}\text{N}$  varía entre péptido y péptido, complicando en exceso el tratamiento de datos.

### B.2. Marcaje proteolítico

El método más utilizado dentro de esta categoría es el marcaje en  $^{18}\text{O}$ . Su fundamento reside en el intercambio que tiene lugar en los grupos carboxilo de los fragmentos proteolíticos, donde dos átomos de  $^{16}\text{O}$  se intercambian por dos átomos de  $^{18}\text{O}$  en presencia de una enzima intercambiadora de oxígeno y  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  [22]. Este procedimiento se puede combinar con otros métodos de marcaje para cuantificar glucopéptidos y sitios de glucosilación [23]. La principal desventaja que ofrece el marcaje en  $^{18}\text{O}$  es el fenómeno de reconversión del  $^{18}\text{O}$  en  $^{16}\text{O}$  que ocasiona un marcaje incompleto de los péptidos, complicando el proceso de cuantificación.

### B.3. Marcaje químico

El marcaje químico introduce las marcas isotópicas a través de una reacción química con los grupos funcionales de los péptidos o proteínas. Los grupos funcionales más utilizados suelen ser las aminas primarias de las lisinas o los grupos tiol de las cisteínas. El marcaje químico tiene la ventaja de ser compatible con la mayoría de muestras como células, tejidos y fluidos corporales. El primer reactivo empleado, ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags), añadía una marca química tras la reacción de los grupos tiol de las cisteínas. Sin embargo, la exclusividad de la reacción hace que dicho reactivo sea ineficaz en análisis más profundos de proteínas [24].

## 1. Introducción

---

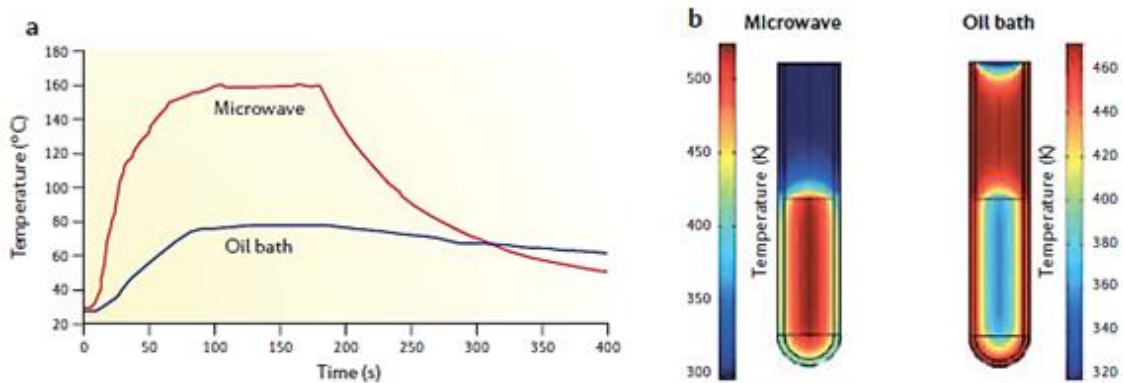
Los métodos más comunes en la actualidad son el TMTs (Tandem Mass Tags) y el iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification), capaces de incorporar marcas isobáricas en los péptidos mediante reacción con las aminas primarias y con los extremos N-terminales de todos los péptidos. Estos reactivos se diseñan de tal forma que los péptidos marcados tienen siempre la misma masa (isobárico), sin embargo, las fragmentaciones de las marcas isobáricas generan una serie de iones (comúnmente denominados “reporteros”), únicos para cada muestra y detectados en los espectros de MS/MS a  $m/z$  bajas. La concentración relativa se obtiene por comparación de intensidades de dichos iones reporteros. La utilización de reactivos iTRAQ o TMTs ofrece la posibilidad de marcar hasta ocho muestras diferentes sin añadir complejidad alguna al espectro de masas, puesto que se asegura siempre la masa constante de los péptidos marcados. Tampoco aumenta la complejidad en la separación, puesto que todos los péptidos marcados coeluyen de manera precisa [25].

### 1.3. El proceso de hidrólisis en la cuantificación de péptidos/proteínas

Como se ha comentado anteriormente, una estrategia muy común en la cuantificación absoluta de patrones peptídicos o proteicos se basa en la liberación de los aminoácidos constituyentes tras una etapa de hidrólisis. Los procesos de hidrólisis tradicionales se realizan en medio ácido (HCl 6N), a temperaturas de entre 90 y 150 °C, durante 20-72 horas [1]. En algunos casos, los péptidos con uniones Val-Val, Ile-Ile o Ile-Val han necesitado unas condiciones de hidrólisis incluso más fuertes. Existen aminoácidos como Asn, Gln, Try, Tyr, Ser o Thr que no son capaces de soportar las condiciones de hidrólisis, mientras que la Cys o la Met solo pueden recuperarse en su forma ácida. Por ello, en muchas ocasiones se utilizan grupos protectores, como el fenol, cuya adición previa a la hidrólisis consigue mitigar las degradaciones de algunos aminoácidos [26]. Los aminoácidos que se escogen en las determinaciones suelen ser Val, Leu, Ile, Pro, Phe y Ala por su mayor estabilidad durante los procesos de hidrólisis.

## 1. Introducción

Estos últimos años, el uso de equipos de microondas ha alcanzado un gran auge en aplicaciones como la síntesis de péptidos, las digestiones enzimáticas o las hidrólisis ácidas. Los equipos de microondas, generalmente focalizados, son capaces de elevar rápidamente la temperatura de una disolución en apenas unos minutos, acelerando las reacciones químicas. Según la ecuación de Arrhenius, un incremento de 10 °C en la temperatura duplica la velocidad de la reacción. En comparación con las hidrólisis clásicas, cuya duración era de 20-72 horas, las hidrólisis asistidas por microondas permiten reducir drásticamente los tiempos de hidrólisis [8]. Esto se debe a que las microondas producen un calentamiento en el interior de la muestra mucho más eficiente que los métodos tradicionales, en los que se utilizan agentes externos para calentar las disoluciones y la temperatura aumenta por conductancia. Un ejemplo de esta diferencia se presenta en la Figura 4 con una muestra de etanol [27].



**Figura 4. a)** Diferencias en la temperatura de una muestra de etanol (punto de ebullición a 78°C) calentada mediante irradiación microondas en un vial sellado durante 3 minutos (temperatura máxima fijada a 160 °C) y mediante un baño de aceite en un vial sin sellar durante 3 minutos a 100 °C. **b)** Perfiles de temperatura del vial previo con etanol tras 1 minuto de calentamiento mediante irradiación microondas y mediante un baño de aceite [27].

## 2. Objetivos

De lo expuesto con anterioridad, se plantea como objetivo principal del presente TFM el desarrollo de un método mediante el cual se cuantifique de manera absoluta un péptido y cuyos resultados sean directamente trazables al SI, de tal forma que se obtenga un resultado de pureza exacto y preciso. El péptido elegido para la cuantificación será la Angiotensina I (Ang-I), al estar considerado como un biomarcador clínico de hipertensión. Para dicho fin, se propone un procedimiento de hidrólisis de la Ang I (sintetizada en el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo) basado en IDMS, en el que se añaden como patrones internos una serie de aminoácidos CRM marcados isotópicamente (Val, Leu, Ile, Pro y Phe).

La hidrólisis de la Ang-I se llevará a cabo en un equipo generador de microondas con el fin de acortar los tiempos de reacción de las hidrólisis. Los experimentos de hidrólisis se realizarán en colaboración con el Grupo de Investigación de Síntesis Orgánica Selectiva de la Universidad de Oviedo.

La separación cromatográfica de los aminoácidos se efectuará mediante CG tras una etapa previa de derivatización con un reactivo silanzante y la determinación de los aminoácidos se realizará mediante espectrometría de masas en tándem.

Con el fin de lograr el objetivo principal anteriormente comentado, se han fijado una serie de objetivos parciales:

- 1) Optimizar el método de cuantificación de los aminoácidos por GC-MS/MS y escoger el reactivo derivatizante más adecuado para la correcta medida de la composición isotópica de los aminoácidos.
- 2) Purificar, caracterizar y validar la concentración de la Ang-I sintética mediante UHPLC-IDMS/MS utilizando el material de referencia certificado Ang-I NIST CRM 998 y una Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$  sintetizada en el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos.
- 3) Validar la concentración de los aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$  por GC-IDMS/MS con aminoácidos de abundancia natural certificados.
- 4) Validar las condiciones óptimas de hidrólisis mediante el análisis de la Ang-I sintética, empleando un equipo de microondas focalizadas, con el fin de obtener una hidrólisis cuantitativa.

### **3. Experimental**

#### **3.1. Instrumentación utilizada**

##### *3.1.1. Equipo generador de microondas*

El proceso de hidrólisis peptídica se llevó a cabo en un sistema de microondas focalizadas Biotage Initiator™, el cual genera ondas microondas de alta frecuencia (2,45 GHz) mediante un magnetrón, ofreciendo un calentamiento focalizado y uniforme. Durante el proceso de calentamiento, la mezcla se agita continuamente con un agitador magnético, con el fin de garantizar una temperatura homogénea en la reacción. Dependiendo del disolvente utilizado, este equipo es capaz de calentar disoluciones a temperaturas próximas a 150 °C en apenas 30 segundos, hasta un máximo de 250 °C o una presión de 20 bares.

##### *3.1.2. Equipo GC-MS/MS*

Las medidas analíticas de los aminoácidos derivatizados se efectuaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent 7890A dotado de una columna capilar Agilent DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) compuesta de (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano. Este cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 7000 QqQ equipado con una fuente de ionización electrónica, utilizando He como gas portador.

##### *3.1.3. Instrumentación secundaria*

Todas las disoluciones utilizadas se prepararon gravimétricamente en una balanza analítica MS205DU semi-micro (Mettler Toledo), utilizando como disolvente agua ultrapura (18,2 MΩ·m) generada por un sistema de purificación Milli-Q Gradient A10 (Millipore). La homogeneización de las muestras se llevó a cabo con un agitador de tipo Vortex (VELP Scientifica). Durante el proceso de derivatización se utilizó un termoagitador Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf) para el control de la temperatura y un dispositivo generador de ultrasonidos UP200S (Hielscher) para favorecer la reacción. Para hacer vacío en los viales de hidrólisis se utilizó una bomba de vacío (LBX Instruments).

### 3. Experimental

---

El proceso de purificación de la Ang-I sintetizada previamente en nuestro laboratorio se efectuó con un sistema HPLC Agilent 1260 Infinity II con colector de fracciones, autoinyector con bucle de inyección de 100  $\mu$ L y detección UV-VIS. Para la separación cromatográfica se empleó una columna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm x 9,4 mm x 5  $\mu$ m).

La caracterización analítica de la Ang-I se llevó a cabo con un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas QqQ Agilent 6460 con fuente de ionización ESI-Jet Stream. Con dicho equipo se usó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8  $\mu$ m).

#### 3.3. Reactivos utilizados

Los aminoácidos de abundancia natural L-valina (99,4 $\pm$ 0,1%), L-leucina (99,5 $\pm$ 0,1%), L-isoleucina (98,9 $\pm$ 0,2%), L-prolina (99,8 $\pm$ 0,2%) y L-fenilalanina (99,7 $\pm$ 0,1%), todos ellos CRMs y comercializados por Fluka Analytical; se emplearon en la etapa de optimización del método cromatográfico y como trazadores isotópicos para determinar la concentración por dilución isotópica de los siguientes aminoácidos marcados: L-valina-1- $^{13}$ C ( $\geq$ 99%), L-leucina-1- $^{13}$ C ( $\geq$ 99%), L-isoleucina-1- $^{13}$ C ( $\geq$ 98%), L-prolina-1- $^{13}$ C ( $\geq$ 99%) y L-fenilalanina-1- $^{13}$ C ( $\geq$ 99%); de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Se utilizó el material de referencia certificado CRM 998 Angiotensina I (DRVYIHPFHL; 99,9 $\pm$ 0,1%) del NIST en los procesos de validación de las Angiotensinas I de abundancia natural y marcada isotópicamente ( $^{13}$ C<sub>1</sub>-Val), sintetizadas previamente en el Grupo de Investigación.

Se utilizó ácido fórmico (>98%) de Sigma-Aldrich (al 0,1% v/v en agua Milli-Q) como medio de disolución de péptidos y aminoácidos.

Los reactivos silanizantes empleados en el proceso de derivatización, suministrados por Sigma-Aldrich, fueron: MTBSTFA con 1% t-BDMCS ( $\geq$ 95%) y BSTFA con 1% TMCS. También se utilizó clorhidrato de metoxiamina (98%) y piridina ( $\geq$ 98%).

Se utilizó un acetonitrilo de alta pureza ( $\geq$ 99,9%) en la preparación de las fases móviles cromatográficas y fue adquirido a Fischer Scientific.

Para la hidrólisis de los péptidos se utilizó HCl 37% p/p (Merck) purificado mediante un proceso de destilación "sub-boiling".

### **3.4. Procedimientos experimentales**

#### **3.4.1. Derivatización de los aminoácidos**

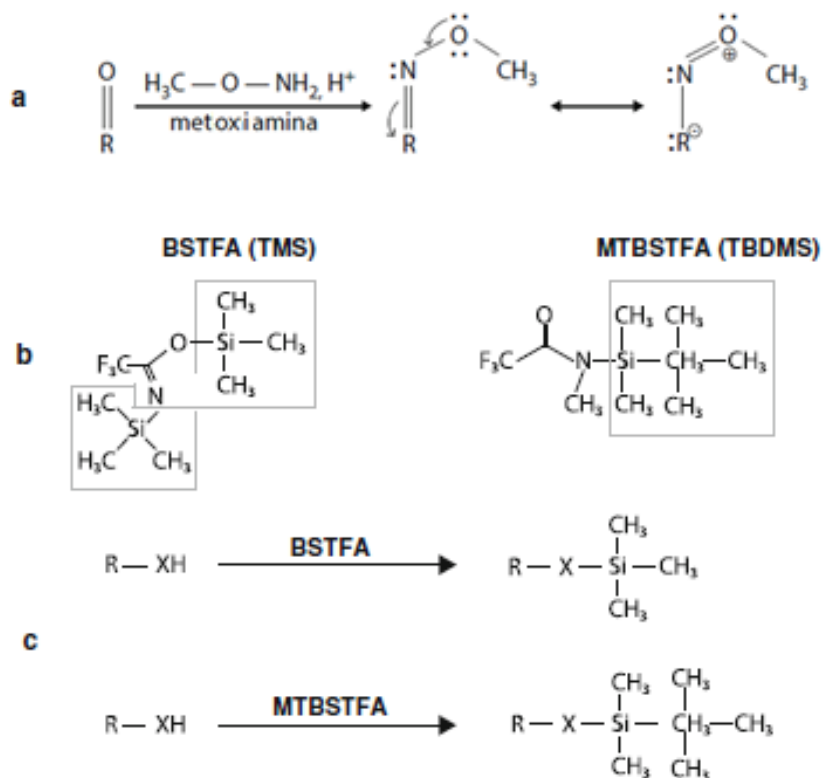
Los aminoácidos carecen de la volatilidad necesaria para ser analizados directamente por GC, al poseer grupos funcionales de naturaleza polar. Estos grupos funcionales se pueden modificar mediante reacciones de derivatización con el fin de conseguir compuestos más volátiles. El procedimiento experimental utilizado se optimizó en el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo y consta de tres fases [28]:

- 1) Secado de la muestra:** En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se pipetea la mezcla de aminoácidos y se deja secar en una corriente de N<sub>2</sub>. Con este paso se consigue eliminar el agua y así evitar la hidrólisis del derivatizante.
- 2) Oximación del grupo carbonilo:** Se añade a la mezcla anterior 50 µL de una disolución al 0,2% p/v de clorhidrato de metoxiamina en piridina y se agita con en el vortex. Este paso aporta una mayor estabilidad química a los productos.
- 3) Sililación de los grupos amino y carboxilo:** 50 µL del reactivo derivatizante (ya sea MTBSTFA o BSTFA) se agregan a la disolución previa y se dejan reaccionar en el termoagitador durante 30 minutos a 60 °C con agitación suave. Los productos derivatizados tienen una estabilidad química de al menos 24 horas.

El proceso de derivatización empleado se encuentra detallado desde un punto de vista químico en la Figura 5.

La mezcla derivatizada se inyecta en el GC-EI-MS/MS utilizando las condiciones de la Tabla 1. El modo de adquisición del cuadrupolo (o cuadrupolos en caso de tándem MS) se modifica en función del tipo de estudio que se vaya a realizar.





**Figura 5.** Proceso de derivatización. **a)** Oximación del grupo carbonilo tras el secado de la muestra. **b)** Estructura molecular del BSTFA y del MTBSTFA (Se resaltan los grupos sustituidos en la reacción para cada derivatizante). **c)** Reacciones de sililación con los reactivos derivatizantes, pudiendo ser X=O, N o S. [28].

**Tabla 1.** Condiciones experimentales del sistema GC-EI-MS utilizadas para la separación cromatográfica de los aminoácidos derivatizados y su determinación por espectrometría de masas.

<i>Reactivo derivatizante</i>	<b>MTBSTFA</b>	<b>BSTFA</b>
<i>Parámetros cromatográficos</i>		
<b>Flujo de gas portador</b>	2 mL/min	2 mL/min
<b>Modo de inyección</b>	Splitless (1 min t. de purga)	Splitless (1 min t. de purga)
<b>Volumen de inyección</b>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Temperatura del inyector</b>	250°C	270°C
<b>Programa de temperatura del horno</b>	100°C (1 min) 100°C $\rightarrow$ 295°C a 15°C/min  Post-run a 300°C (3 min) Tiempo total: 17 min	70°C (1 min) 70°C $\rightarrow$ 160°C a 15°C/min 160°C $\rightarrow$ 300°C a 50°C/min Post-run a 300°C (3 min) Tiempo total: 13 min
<b>Temperatura de la interfase</b>	325°C	325°C
<i>Parámetros de la fuente de ionización</i>		
<b>Temperatura de la fuente</b>	250°C	250°C
<b>Potencial de ionización</b>	70 eV	70 eV
<b>Temperatura del cuadrupolo</b>	150°C	150°C

### 3. Experimental

#### 3.4.2. Cálculo de la pureza espectral de clústeres isotópicos

La fuente de ionización electrónica no solamente produce iones moleculares de los analitos, sino que éstos, dependiendo de su estabilidad, pueden sufrir procesos de fragmentación y pérdidas o ganancias de átomos de hidrógeno ( $M \pm nH$ )<sup>+</sup>. Además, la baja resolución de masas característica del cuadrupolo da lugar a contribuciones no deseadas de una masa  $M$  en picos de masas adyacentes, generalmente a  $M-1$  [29]. La combinación de ambos factores hace que la distribución isotópica de los diferentes clústeres de los analitos no sea pura, sino una combinación lineal de todos los procesos comentados anteriormente. Para determinar la magnitud de dichas contribuciones se miden las distribuciones isotópicas de varios de clústeres en modo SIM.

Para un determinado clúster se monitorizan las masas  $M - 2, M - 1, M \dots M + 5$ . Seguidamente, se calculan las abundancias experimentales ( $A_{exp}^i$ ) como el cociente del área de pico obtenida para cada masa entre el sumatorio de las áreas de todos los picos medidos.

A continuación, se calculan las abundancias teóricas ( $A_{teo}^i$ ). En este Trabajo Fin de Máster, se utilizó el algoritmo propuesto por Kubinyi [30]. Dicho algoritmo se incorporó a una hoja de cálculo Excel como un macro de Visual Basic que permite calcular la distribución isotópica de moléculas con átomos de C, H, O, N y Si (entre otros).

Las abundancias teóricas y experimentales se pueden relacionar mediante la ecuación E4 [29].

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{M-2} \\ A_{exp}^{M-1} \\ A_{exp}^M \\ \vdots \\ A_{exp}^{M+5} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & A_{teo}^M \\ 0 & 0 & 0 & A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} \\ 0 & 0 & A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} & A_{teo}^{M+2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ A_{teo}^{M+3} & A_{teo}^{M+4} & A_{teo}^{M+5} & A_{teo}^{M+6} & A_{teo}^{M+7} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{M+2(H)} \\ x_{M+1(H)} \\ x_M \\ x_{M-1(H)} \\ x_{M-2(H)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ \vdots \\ e_7 \end{bmatrix} \quad \text{E4}$$

Donde  $x_{M \pm n(H)}$  ( $n = 0, 1$  y  $2$ ) son las fracciones molares o contribuciones al espectro experimental de las distintas pérdidas o ganancias de átomos de hidrógeno o contribuciones debidas a la falta de resolución del analizador de masas. El término  $e_n$  ( $n = 1, 2 \dots 5$ ) es el vector error de la regresión lineal.

La resolución de la ecuación E4 por regresión lineal múltiple nos proporciona las contribuciones anteriormente explicadas,  $x_{M \pm n(H)}$ .

### 3.4.3. Cálculo del enriquecimiento isotópico en moléculas marcadas

El enriquecimiento isotópico se calcula siguiendo la metodología recogida en una publicación anterior del Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos [29] que proporciona 100 distribuciones isotópicas diferentes de una molécula marcada teniendo en cuenta los valores previos de pureza espectral mediante un proceso de convolución de la ecuación E5.

$$\begin{bmatrix} A_{conv}^{M-2} \\ A_{conv}^{M-1} \\ A_{conv}^M \\ \vdots \\ A_{conv}^{M+5} \end{bmatrix} = x_{M+1(H)} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ \vdots \\ A_{teo}^{M+6} \end{bmatrix} + x_M \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ \vdots \\ A_{teo}^{M+7} \end{bmatrix} + x_{M-1(H)} \begin{bmatrix} 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+3} \\ \vdots \\ A_{teo}^{M+8} \end{bmatrix} + x_{M-2(H)} \begin{bmatrix} A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+3} \\ \vdots \\ A_{teo}^{M+9} \end{bmatrix}$$

**E5**

Estas distribuciones calculadas se comparan por regresión lineal múltiple con las distribuciones isotópicas experimentales de la molécula marcada. El enriquecimiento isotópico de la molécula marcada vendrá dado por el valor que proporcione una suma cuadrática de residuales.

### 3.4.4. Validación de la medida de las transiciones en modo SRM

Otro modo de adquisición empleado en este Trabajo Fin de Máster fue el SRM. Para poder efectuar medidas de interés en modo SRM es necesario conocer la energía óptima de colisión y la estructura de los fragmentos de interés. Esto se consigue trabajando en modo de barrido de iones producto. En dicha configuración, el primer analizador de masas opera en modo SIM, para seleccionar un ion precursor, y el segundo analizador de masas opera en modo SCAN, para analizar los iones productos generados en la celda de colisión.

La validación de las medidas de las transiciones en SRM se determina mediante la comparación de las abundancias isotópicas experimentales frente a las teóricas. Las abundancias teóricas de las transiciones se calculan a través de permutaciones matemáticas con la ayuda del software Isopatrn [31].

### 3. Experimental

#### 3.4.5. Purificación de la Ang-I de abundancia natural por colección de fracciones mediante HPLC-semipreparativo

La Ang-I de abundancia isotópica natural fue sintetizada previamente en el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos y se proporcionó como una disolución de concentración aproximada de 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . El proceso de purificación se llevó a cabo en el equipo HPLC con colector de fracciones utilizando unas condiciones de separación cromatográfica previamente optimizadas por el Grupo de Investigación. Las fases móviles consistieron en agua Milli-Q con ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B), ambas con un contenido de ácido fórmico de 0,1% v/v. La temperatura de la columna cromatográfica se fijó en 35° C, mientras que la longitud de onda seleccionada del detector UV-VIS fue 214 nm. Con estas condiciones se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pinchazo, con un flujo de fase móvil de 0,75 mL/min y con el gradiente recogido en la Tabla 2:

**Tabla 2.** Gradiente empleado en la purificación de la Ang-I mediante cromatografía de líquidos semipreparativo.

t (min)	% B
0	2
15	35
17	80
18	80
21	2
24	2

En estudios previos realizados por el Grupo de Investigación se confirmó la presencia de Ang-I a un tiempo de retención de 14,7 minutos utilizando las condiciones instrumentales descritas. Con lo cual, se procedió a recoger fracciones de cada pinchazo en un intervalo de tiempo lo suficiente amplio para cubrir la señal analítica de la Ang-I, así como las zonas inmediatamente anteriores y posteriores. Se recogieron 8 fracciones por pinchazo de 0,1 minutos que cubrían una ventana de tiempo desde los 14,3 a los 15,1 minutos.

### 3. Experimental

#### 3.4.6. Caracterización de la Ang-I sintética (marcada en $^{13}\text{C}$ y de abundancia isotópica natural) por UHPLC-ESI-MS/MS

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de las fracciones recogidas en el equipo UHPLC-ESI-MS en modo SCAN. Se mantuvieron las fases móviles del proceso de purificación, modificando el gradiente al que aparece en la Tabla 3. Estos parámetros de medida se mantuvieron constantes en todas las mediciones de UHPLC-ESI-MS/MS.

**Tabla 3.** Gradiente empleado en la caracterización de la Ang-I mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

t (min)	% B
0	85
0,5	85
2,5	75
3,5	35
4,5	35
5,5	15
8	15

Se estudió la pureza espectral del clúster correspondiente a la masa monoisotópica del ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  del conjunto de fracciones puras de Ang-I. El procedimiento empleado es idéntico al explicado en el [apartado 3.4.2](#). En este caso, el empleo de una fuente de ionización de tipo electrospray nos obliga a transformar la ecuación matricial E4 en la ecuación E6, puesto que la única contribución al solapamiento espectral que se consideró fue la falta de resolución a masa M-1:

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{M-1} \\ A_{exp}^M \\ \vdots \\ A_{exp}^{M+5} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & A_{teo}^M \\ A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} \\ \vdots & \vdots \\ A_{teo}^{M+5} & A_{teo}^{M+6} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_M \\ x_{M-1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \vdots \\ e_7 \end{bmatrix} \quad \text{E6}$$

Con los valores obtenidos de las fracciones  $x_M$  y  $x_{M-1}$  se siguieron los pasos descritos en el [apartado 3.4.3](#) para calcular el enriquecimiento isotópico de una disolución de Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$ , de concentración similar al de la Ang-I de abundancia natural.

Con el fin de poder efectuar medidas en SRM se midieron las dos disoluciones de Ang-I de abundancia natural y marcada en modo PI. Se

### 3. Experimental

estudiaron a diferentes energías de colisión tres iones cuyas  $m/z$  eran las más intensas. Con la energía de colisión y el ion producto más óptimo de cada precursor, se programó una secuencia en SRM a baja resolución de las dos disoluciones de Ang-I para comparar los resultados experimentales obtenidos con los teóricos, utilizando los valores generados por el software Isopatrn [31].

#### 3.4.7. Cálculo de la concentración de la Ang-I sintetizada trazable al SI.

La cuantificación absoluta de la Ang-I sintética se efectuó mediante análisis por dilución isotópica. En primer lugar, se determina la concentración de la Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$  utilizando un material de referencia certificado cuyo valor de pureza es trazable al SI, el CRM 998 (Ang-I de abundancia isotópica natural).

Al añadir una cantidad conocida de péptidos de abundancia isotópica natural (trazador) sobre una muestra de péptidos marcados en  $^{13}\text{C}$  (analito), se produce un solapamiento de sus distribuciones isotópicas medidas en el espectrómetro de masas. Asumiendo que la distribución isotópica de la mezcla es una combinación lineal de los perfiles isotópicos del trazador y el analito, podemos expresar el perfil isotópico de la mezcla obtenido experimentalmente mediante la ecuación E7, cuando se trabaja en modo SIM, o la ecuación E8, cuando se trabaja en modo SRM [6]:

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^M \\ A_{exp}^{M+1} \\ \vdots \\ A_{exp}^{M+4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^M & A_{marc}^M \\ A_{nat}^{M+1} & A_{marc}^{M+1} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{M+4} & A_{marc}^{M+4} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{marc} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ \vdots \\ e_6 \end{bmatrix} \quad \text{E7}$$

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{T1} \\ A_{exp}^{T2} \\ A_{exp}^{T3} \\ A_{exp}^{T4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{T1} & A_{marc}^{T1} \\ A_{nat}^{T2} & A_{marc}^{T2} \\ A_{nat}^{T3} & A_{marc}^{T3} \\ A_{nat}^{T4} & A_{marc}^{T4} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{marc} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \end{bmatrix} \quad \text{E8}$$

Aplicando una regresión lineal múltiple a las ecuaciones E7 y E8 se obtienen las fracciones molares de trazador y analito,  $x_{nat}$  y  $x_{marc}$ . Además, teniendo en cuenta que la relación de ambas fracciones molares se puede expresar según la ecuación E9 [6]:

$$\frac{x_{nat}}{x_{marc}} = \frac{N_{nat}}{N_{marc}} \quad \text{para } N_i = \text{número de moles (trazador y analito)}. \quad \text{E9}$$

### 3. Experimental

Es posible determinar la cantidad péptidos marcados en  $^{13}\text{C}$  añadidos a la mezcla y su concentración en la disolución inicial, puesto que los términos subrayados en amarillo son conocidos en la ecuación.

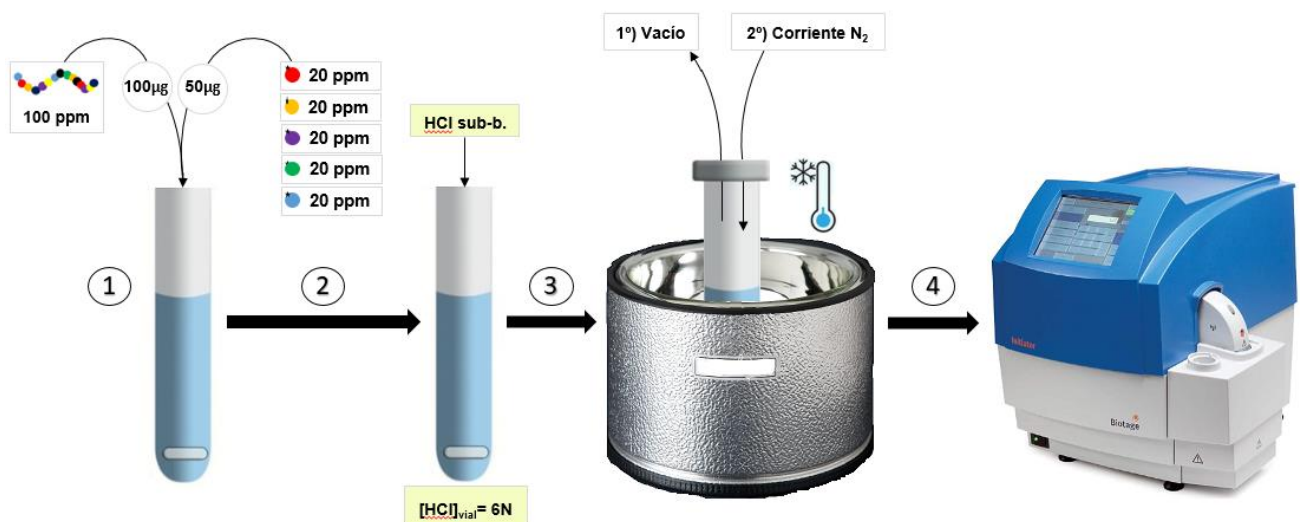
Con el valor de concentración obtenido para la Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$  se repitió el experimento previo, pero esta vez utilizando la Ang-I sintetizada por el Grupo de Investigación (abundancia natural). De esta manera se obtiene un resultado de concentración de la Ang-I trazable al SI.

#### 3.4.8. Cálculo de la concentración de los aminoácidos marcados en $^{13}\text{C}$ trazables al SI empleados en la hidrólisis peptídica

De la misma forma que en el apartado anterior, el perfil isotópico de la mezcla de aminoácidos se puede expresar para cada aminoácido según las ecuaciones E7 y E8, obteniéndose la cantidad del analito en la muestra según la ecuación E9 [6].

#### 3.4.9. Hidrólisis asistida por microondas focalizado

Se siguió un protocolo de hidrólisis previamente empleado en el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos. El protocolo se divide en cuatro partes representadas de forma esquemática en la Figura 6.



**Figura 6.** Representación esquemática del proceso de preparación de la muestra a hidrolizar.



### 3. Experimental

---

- 1) Se coloca en una balanza analítica un vial específico para hidrólisis de tamaño 0,5-2 mL, en el cual se introduce un imán de agitación magnética. Se pipetea 100  $\mu\text{g}$  de una disolución de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Ang-I preparada a partir de la disolución de Ang-I sintética trazable al SI. Seguidamente, se agregan 50  $\mu\text{g}$  de cinco disoluciones de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de los aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$  y de concentración trazable al SI.
- 2) A continuación, se agregan HCl 37% p/p sub-boiling de tal forma que la concentración de HCl en la mezcla sea 6N.

Los siguientes pasos tienen como finalidad la obtención de una atmósfera inerte en el vial.

- 3) La mezcla se cierra herméticamente con un tapón con inserto y se coloca dentro de un recipiente con nitrógeno líquido. Se hace vacío al vial a través del inserto con una jeringuilla conectada a una bomba de vacío. De esta forma, se congela la disolución al instante y evitamos que los vapores accedan a la bomba de vacío. Tras el proceso de vacío, se llena el vial de  $\text{N}_2$  gas con la ayuda de otra jeringuilla conectada a una bombona de  $\text{N}_2$  y el propio capuchón de la jeringuilla para crear una corriente del gas.
- 4) Se retira el vial del  $\text{N}_2$  líquido y se deja atemperar antes de introducirse al equipo generador de microondas.

Las condiciones utilizadas en el equipo microondas, principalmente temperatura y tiempo de hidrólisis, se fueron variando según los resultados obtenidos en el [apartado 4.8](#). Los únicos parámetros que se mantuvieron constantes en todos los experimentos de hidrólisis fueron la agitación constante de la mezcla (en todo momento) y el nivel de absorción del disolvente a “muy alto”. Con este último parámetro indicamos que el disolvente utilizado (agua) es de elevada polaridad, de tal forma que el equipo aplica la energía de la manera más lenta posible. La presión alcanzada en todos los experimentos realizados no superó los 7 bares.

### 3. Experimental

---

#### 3.4.10. Determinación de los aminoácidos hidrolizados y porcentaje de recuperación del método.

Al igual que en el apartado 3.4.8, el número de moles de aminoácidos hidrolizados se calculó mediante análisis por dilución isotópica. Las ecuaciones E7 y E8 se resuelven por regresión lineal múltiple, obteniéndose las fracciones molares de trazador y analito,  $x_{marc}$  y  $x_{nat}$ , respectivamente. En esta ocasión, al resolver la ecuación E9, el término que obtenemos es  $N_{nat}$  ya que los aminoácidos hidrolizados provienen de la Ang-I de abundancia isotópica natural.

La recuperación del método se calcula a través de la ecuación E10:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{N_{nat}^{hid}}{N_{nat}^{teo}} \cdot 100 \quad \mathbf{E10}$$

Siendo  $N_{nat}^{hid}$  los moles de cada aminoácido hidrolizado y  $N_{nat}^{teo}$  los moles teóricos de cada aminoácido sabiendo que un mol de Ang-I genera un mol de cada aminoácido estudiado.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Confirmación de los aminoácidos derivatizados por GC-MS

Se prepararon dos disoluciones de 10 y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de los 5 aminoácidos estudiados (fenilalanina, isoleucina, leucina, prolina y valina) de abundancia isotópica natural y se aplicó el protocolo de derivatización descrito en el [apartado 3.4.1](#) a una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada disolución. La disolución de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  se derivatizó con el reactivo silanzante MTBSTFA, mientras que la disolución de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  se derivatizó con el reactivo silanzante BSTFA. Para esta etapa se trabajó en modo SCAN, realizando barridos secuenciales desde  $m/z=50$  hasta  $m/z=500$ .

Los aminoácidos se identificaron por comparación de los espectros de masas obtenidos con los espectros contenidos en una biblioteca de espectros del NIST. En este procedimiento se asume que las condiciones instrumentales empleadas son lo suficientemente controlables para obtener espectros reproducibles, ya que existen una gran serie de variables que pueden modificar las abundancias de los iones. Los tiempos de retención para cada aminoácido aparecen reflejados en la Tabla 4. En dicha Tabla se utilizaron los resultados obtenidos del [apartado 4.2](#) para una inyección de 5 réplicas de las mezclas de aminoácidos derivatizados en modo SIM para un clúster estudiado.

**Tabla 4.** Tiempos de retención de la valina, leucina, isoleucina, prolina y fenilalanina obtenidos en la separación cromatográfica mediante GC-MS, utilizando dos reactivos derivatizantes: MTBSTFA y BSTFA.

Reactivo derivatizante	MTBSTFA	BSTFA
Aminoácido	Tiempo de retención (min)	
<b>Valina</b>	7,988 $\pm$ 0,004	5,32 $\pm$ 0,01
<b>Leucina</b>	8,279 $\pm$ 0,004	5,81 $\pm$ 0,01
<b>Isoleucina</b>	8,517 $\pm$ 0,004	6,02 $\pm$ 0,01
<b>Prolina</b>	8,834 $\pm$ 0,003	6,08 $\pm$ 0,01
<b>Fenilalanina</b>	10,968 $\pm$ 0,003	7,836 $\pm$ 0,001

#### 4. Resultados y discusión

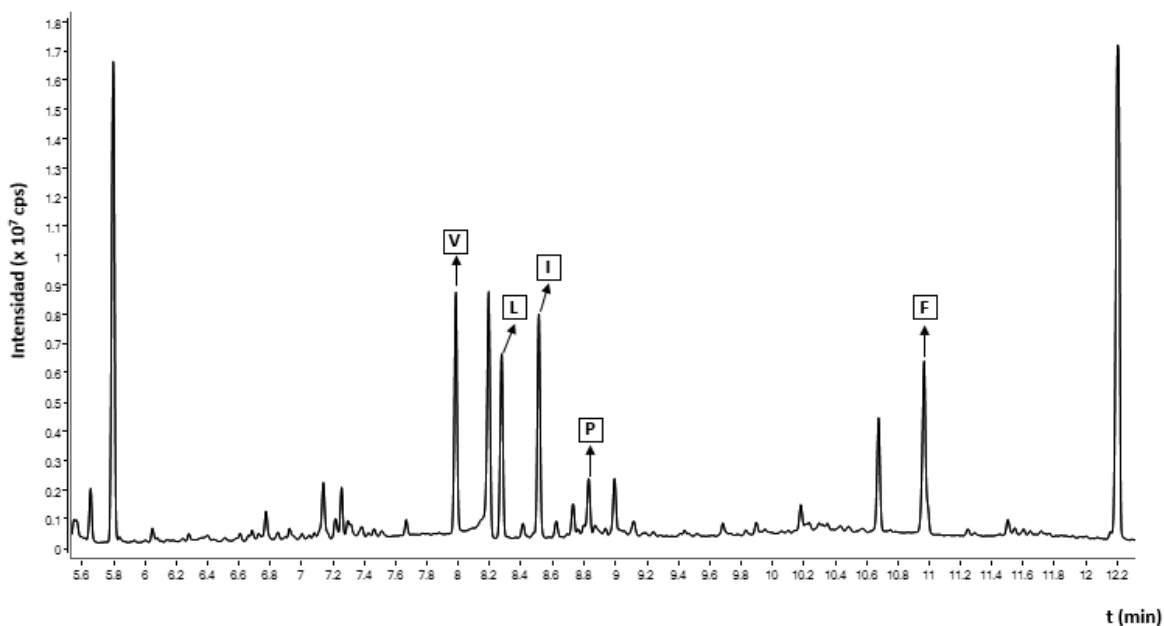
---

En las Figuras 7 y 8 se muestran los cromatogramas GC-MS de la mezcla de aminoácidos derivatizados con los reactivos silanizantes MTBSTFA y BSTFA, respectivamente. A modo de ejemplo, se presentan los espectros de masas GC-MS de un aminoácido (fenilalanina) derivatizado con los reactivos derivatizantes MTBSTFA y BSTFA en las Figuras 9a y 9b, respectivamente.

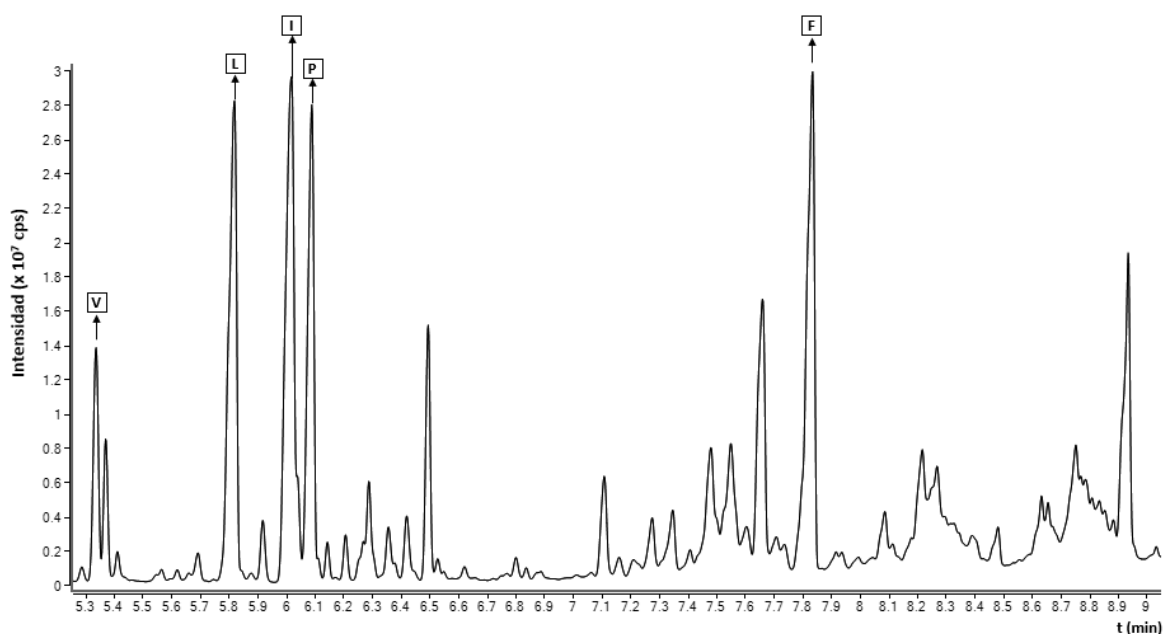
Se puede observar tanto en los espectros de masas como en los cromatogramas que la respuesta analítica de los aminoácidos derivatizados con MTBSTFA es mayor que los derivatizados con BSTFA, teniendo en cuenta que las disoluciones mezcla de aminoácidos difieren en un factor de 5 en la concentración. También se puede apreciar en las Figuras 9a y 9b una mayor cantidad de clústeres a  $m/z$  altas para la fenilalanina derivatizada con MTBSTFA, patrón que también se cumple en los otros cuatro aminoácidos estudiados. En cuanto al número de fragmentos detectados en los espectros de masas, apenas hay diferencias significativas entre los aminoácidos derivatizados. Schummer et al. [32] indican en sus estudios de derivatización de compuestos polares por GC-MS que los compuestos TMS-derivatizados producen una mayor cantidad de fragmentos que los compuestos TBDMS-derivatizados. Esto implica que los métodos analíticos que empleen BSTFA como reactivo silanizante generen una menor respuesta analítica.

Las fragmentaciones observadas se encuentran ampliamente detalladas en la bibliografía [28]. Para los aminoácidos derivatizados con MTBSTFA, el ion molecular (M) rompe en los siguientes iones fragmento: M-57 [pérdida de  $-C(CH_3)_3$ ], M-85 [pérdida de  $-C=O$  y  $-C(CH_3)_3$ ] y M-302 (pérdida de la cadena lateral -R). Cuando se utilizó el BSTFA, los aminoácidos derivatizados fragmentaron de la siguiente forma: M-15 (pérdida de  $-CH_3$ ), M-218 (pérdida de la cadena lateral -R) y M-84 [pérdida de  $-N-Si(CH_3)_3$ , solo para la prolina].

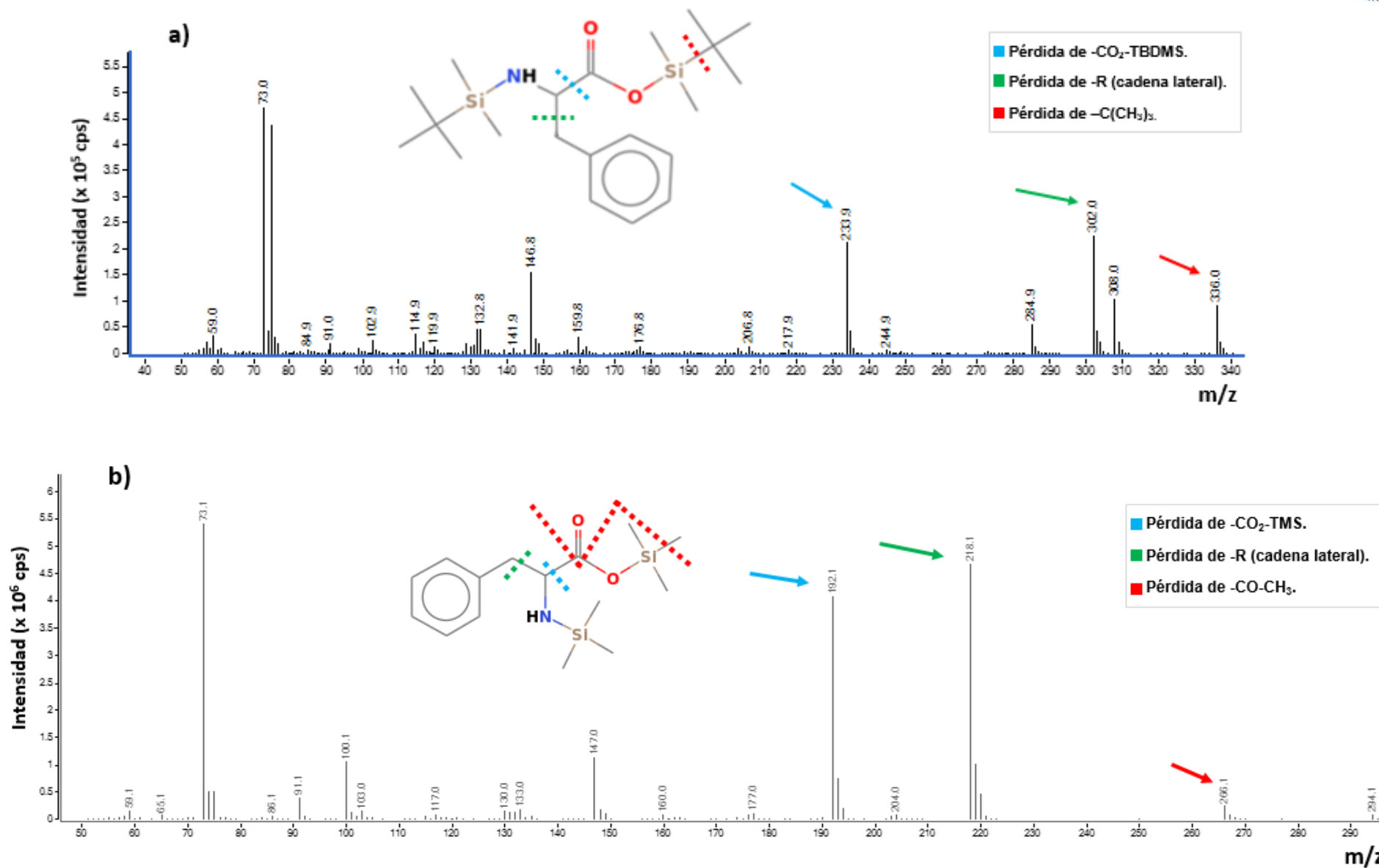
#### 4. Resultados y discusión



**Figura 7.** Cromatograma GC-MS de una disolución de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P) y fenilalanina (F) de abundancias naturales, derivatizados con **MTBSTFA**.



**Figura 8.** Cromatograma GC-MS de una disolución de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P) y fenilalanina (F) de abundancias naturales, derivatizados con **BSTFA**.



#### 4.2. Determinación de la pureza espectral de los aminoácidos derivatizados

Se seleccionaron un total de dos clústeres por aminoácido y reactivo derivatizante. El criterio de elección se basó en que el clúster elegido presentara la mayor señal posible, priorizando la región del espectro de relaciones  $m/z$  más altas con el fin de evitar posibles interferencias espectrales. Es importante resaltar que, como consecuencia de la reacción de sililación, es muy común observar iones a  $m/z = 50, 69, 75, 77, 100, 136, 155, \text{ y } 166$  [33], siendo especialmente intensas las relaciones  $m/z$  73  $[\text{Si}^+(\text{CH}_3)_3]$  y 147  $[(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ . En el proceso de selección se desestimaron aquellos clústeres que incluyeran alguna de las relaciones  $m/z$  comentadas con anterioridad, puesto que no corresponden única y exclusivamente a fragmentaciones de los aminoácidos derivatizados. Los clústeres elegidos para cada aminoácido se recogen en la Tabla 5.

Se inyectaron una serie de réplicas ( $n=5$ ) de las mezclas de aminoácidos derivatizados previamente de 10 y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (de abundancia natural) y se midieron las distribuciones isotópicas de cada clúster en modo SIM.

Las fracciones molares obtenidas de la resolución de la ecuación E4 por regresión lineal múltiple empleando la función “ESTIMACION.LINEAL” de Excel se muestran en la Tabla 5.

Podemos observar en la Tabla 5 que los mejores resultados de pureza espectral se obtuvieron generalmente con los aminoácidos derivatizados con MTBSTFA, ya que las fracciones molares  $x_M$  fueron mayores. Se encontró que la principal contribución después de  $x_M$  fue fracción molar debida a la contribución a  $M+1$ , con valores superiores al 1% con MTBSTFA, llegando incluso al 8,1% para el caso de la prolina. Se asume que su origen se debe a la ganancia de  $\text{H}^+$  en la fuente, más que a una posible falta de resolución del cuadrupolo. La contribución debida a la pérdida de  $\text{H}^+$  y/o a la falta de resolución del cuadrupolo,  $M-1$ , resultó ser muy pequeña en todos los casos. Así, cuando se utilizó el MTBSTFA, al menos uno de los dos clústeres estudiados no superaba el 0,18 %.

**Tabla 5.** Pureza espectral (en %) de los aminoácidos valina, leucina, isoleucina, prolina y fenilalanina obtenida en dos clústeres por cada reactivo derivatizante. La incertidumbre de los resultados corresponde a la desviación estándar de n=5 inyecciones en GC-MS.

Derivatiz.	AA	(Fragment.) <sup>+</sup>	Clúster (m/z)	$x_{M+2(H)}$ ±SD	$x_{M+1(H)}$ ±SD	$x_M$ ±SD	$x_{M-1(H)}$ ±SD	$x_{M-2(H)}$ ±SD	$\Sigma x$ ±SD	
MTBSTFA	V	<b>C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	300-307	0,13±0,02	1,01±0,03	98,5±0,1	0,16±0,03	0,15±0,02	99,95±0,02	
		<b>C<sub>13</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	286-293	0,34±0,04	1,0±0,1	98,1±0,1	0,329±0,003	0,195±0,001	100,03±0,01	
BSTFA		<b>C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	244-251	1,2±0,3	0,4±0,1	96,0±0,3	0,54±0,01	1,12±0,03	99,2±0,1	
		<b>C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	216-223	0,43±0,03	3,8±0,1	95,5±0,1	0,23±0,03	0,19±0,01	100,04±0,01	
MTBSTFA		L	<b>C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	300-307	0,31±0,02	1,62±0,04	97,7±0,1	0,18±0,01	0,21±0,02	99,97±0,02
			<b>C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	272-279	0,16±0,03	2,34±0,04	96,7±0,1	0,60±0,01	0,21±0,02	100,04±0,01
BSTFA			<b>C<sub>11</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	258-265	0,28±0,03	0,16±0,04	97,9±0,1	0,41±0,01	0,71±0,02	99,40±0,02
			<b>C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	216-223	0,23±0,03	3,8±0,1	90,6±0,1	2,95±0,04	1,94±0,01	99,53±0,02
MTBSTFA	I	<b>C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	300-307	0,48±0,01	2,0±0,1	97,3±0,1	0,15±0,01	0,117±0,002	100,09±0,01	
		<b>C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	272-279	0,22±0,02	3,2±0,1	96,0±0,1	0,17±0,01	0,56±0,02	100,05±0,01	
BSTFA		<b>C<sub>11</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	258-265	0,2±0,2	0,4±0,2	94,9±0,3	0,51±0,03	1,07±0,01	97,1±0,3	
		<b>C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	216-223	0,7±0,1	2,1±0,1	96,7±0,2	0,44±0,01	-	99,90±0,02	
MTBSTFA	P	<b>C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	284-291	-	8,1±0,2	91,7±0,1	0,17±0,02	0,36±0,09	100,1±0,1	
		<b>C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	256-263	-	1,19±0,04	96,0±0,1	1,62±0,03	1,12±0,02	100,00±0,01	
BSTFA		<b>C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	242-249	0,3±0,1	0,4±0,1	86,4±0,2	0,43±0,04	2,5±0,1	89,9±0,1	
		<b>C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>Si</b>	173-180	3,1±0,1	2,5±0,1	80,8±0,1	4,09±0,01	5,3±0,2	95,9±0,3	
MTBSTFA	F	<b>C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	334-341	0,21±0,02	1,1±0,1	98,3±0,1	0,128±0,003	0,27±0,01	99,92±0,02	
		<b>C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	300-307	0,51±0,02	2,0±0,1	97,2±0,1	0,244±0,002	0,088±0,001	100,02±0,01	
BSTFA		<b>C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	292-299	0,2±0,2	0,2±0,1	96,2±0,3	0,52±0,02	3,2±0,1	99,82±0,02	
		<b>C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub></b>	216-223	2,2±0,1	4,1±0,1	93,4±0,2	0,34±0,03	0,114±0,002	100,23±0,01	

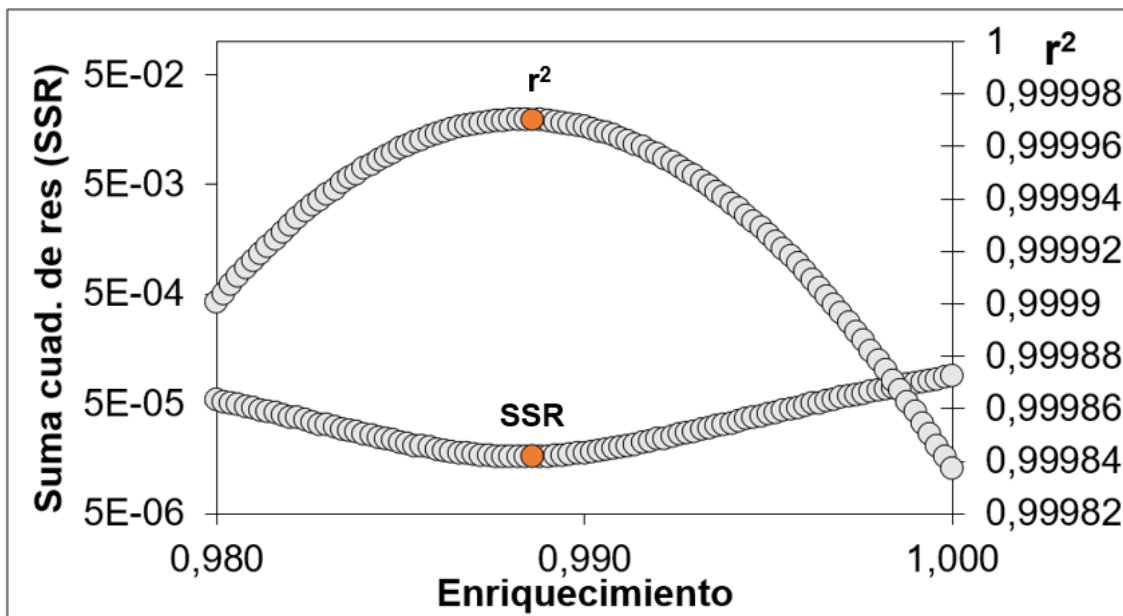


### **4.3. Determinación del enriquecimiento isotópico de los aminoácidos marcados en $^{13}\text{C}$ derivatizados y elección del reactivo silanzante**

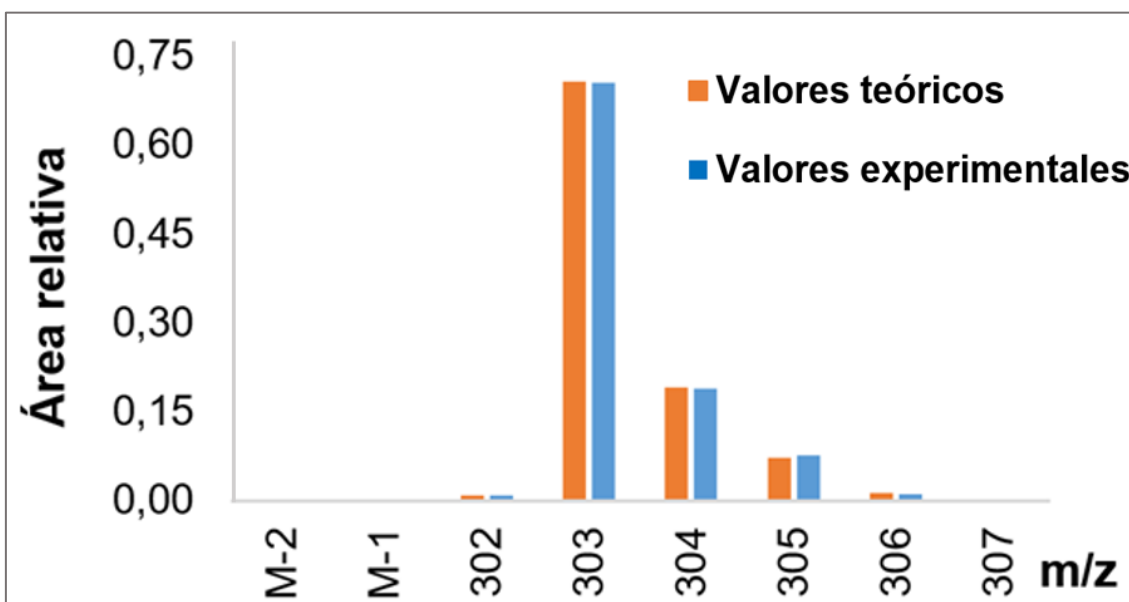
De la misma forma que para el estudio de la pureza espectral, se inyectaron 5 réplicas de una mezcla de aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$  de concentración 10 y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (para cada uno de ellos) y derivatizados según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1. La disolución de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  se derivatizó con el reactivo silanzante MTBSTFA, mientras que la disolución de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  se derivatizó con el reactivo silanzante BSTFA.

Si asumimos que la pureza espectral de los aminoácidos derivatizados de abundancia natural es la misma que la de los aminoácidos marcados, la resolución de la ecuación E5 por mínimos cuadrados proporcionó los resultados de enriquecimiento isotópico recogidos en la Tabla 6.

Para ejemplificar el proceso de cálculo efectuado, en la Figura 10 se ilustra la determinación del enriquecimiento isotópico de un aminoácido (isoleucina). En dicha Figura se muestra la variación de los residuales de la correlación entre los valores experimentales y los teóricos, obtenidos a distintos enriquecimientos isotópicos tentativos. Se considera el enriquecimiento isotópico real aquel que proporciona una suma cuadrática de residuales menor. En la Figura 11 se muestra la comparación entre la distribución isotópica experimental y la distribución isotópica correspondiente a aquel enriquecimiento con un menor valor en la suma cuadrática de residuales (SSR). Un valor de SSR entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  se considera una buena correlación con el espectro teórico [29].



**Figura 10.** Representación de la suma cuadrática de residuales y del coeficiente de correlación  $r^2$  en función del enriquecimiento isotópico para el caso de un clúster de la isoleucina marcada en  $^{13}\text{C}$ . El enriquecimiento de menor SSR se encuentra representado en el círculo naranja.



**Figura 11.** Comparación entre el espectro de masas teórico y el experimental de la isoleucina marcada cuando el valor de SSR era mínimo (teniendo en cuenta las contribuciones de la pureza espectral).

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 6.** Enriquecimiento isotópico de los aminoácidos marcados. Se encuentran subrayados los clústeres elegidos en determinaciones futuras. Se recoge, a modo de comparación, el valor de enriquecimiento certificado por Sigma-Aldrich.

Derivatiz.	AA	Clúster (m/z)	Suma cuadrática de residuales	Enriquecimiento experimental (%)	Enriquecimiento fabricante (%)
MTBSTFA	V	300-307	2,67E-06	90,70	≥99,0 (99,9)
		<b>286-293</b>	2,04E-05	100,00	
BSTFA		244-251	7,00E-05	99,81	
216-223		6,24E-04	79,00		
MTBSTFA	L	<b>300-307</b>	6,27E-06	100,00	≥99,0 (99,8)
		272-279	6,24E-05	100,00	
BSTFA		258-265	2,40E-05	99,92	
216-223		1,81E-04	90,10		
MTBSTFA	I	<b>300-307</b>	2,38E-05	98,95	≥99 (99)
		272-279	4,41E-05	99,79	
BSTFA		258-265	1,30E-03	99,20	
216-223		1,20E-03	99,20		
MTBSTFA	P	<b>284-291</b>	4,31E-03	99,88	≥99 (100)
		256-263	6,68E-05	100,00	
BSTFA		242-249	7,60E-03	99,68	
173-180		3,33E-03	100,00		
MTBSTFA	F	<b>334-341</b>	1,53E-05	99,48	≥99 (100)
		300-307	1,49E-03	100,00	
BSTFA		292-299	3,00E-05	99,38	
216-223		3,80E-04	82,00		

Los resultados obtenidos de enriquecimiento reflejan una excelente coincidencia con el valor certificado por el fabricante en al menos uno de los clústeres estudiados para ambos derivatizantes.

Como se puede observar en la Tabla 6, para algunos clústeres se obtuvieron enriquecimientos inferiores al valor declarado por el fabricante, posiblemente por existencia de interferencias espectrales en el clúster estudiado. Dichos clústeres se descartaron para futuros estudios.

#### 4. Resultados y discusión

---

En líneas generales, se obtuvo una mayor concordancia entre los valores de enriquecimiento isotópico experimental y el proporcionado por el fabricante cuando se utilizó el reactivo derivatizante MTBSTFA. Para este reactivo, solamente un clúster de la valina proporcionó un enriquecimiento inferior al 99% declarado. Con lo cual, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de pureza espectral y de enriquecimiento isotópico, se concluye que el reactivo derivatizante más adecuado para esta metodología analítica es el MTBSTFA. Dicha selección ha sido respaldada en la bibliografía con estudios de diferentes reactivos derivatizantes en el análisis de aminoácidos [34] y de compuestos hidroxilados [32] por GC-MS.

#### **4.4. Validación de la medida de las transiciones en SRM para los aminoácidos derivatizados con MTBSTFA**

Una vez escogidos los clústeres que presentaron una mayor pureza espectral y un valor fiable de enriquecimiento isotópico, se fragmentaron los iones precursores (isotopólogos más abundantes) y se estudiaron los fragmentos obtenidos a diferentes energías de colisión mediante barridos de iones producto. Para la elección de la energía y los fragmentos más óptimos se tuvo en consideración la intensidad de pico obtenido.

Se prepararon dos mezclas de aminoácidos, una de ellas con los aminoácidos de abundancia natural y la otra con los marcados, todas ellas de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Se derivatizaron con MTBSTFA según el protocolo descrito en el [apartado 3.4.1](#) y se inyectaron cinco réplicas en el GC-MS/MS en SRM a baja resolución con las condiciones de la Tabla 7.

#### 4. Resultados y discusión

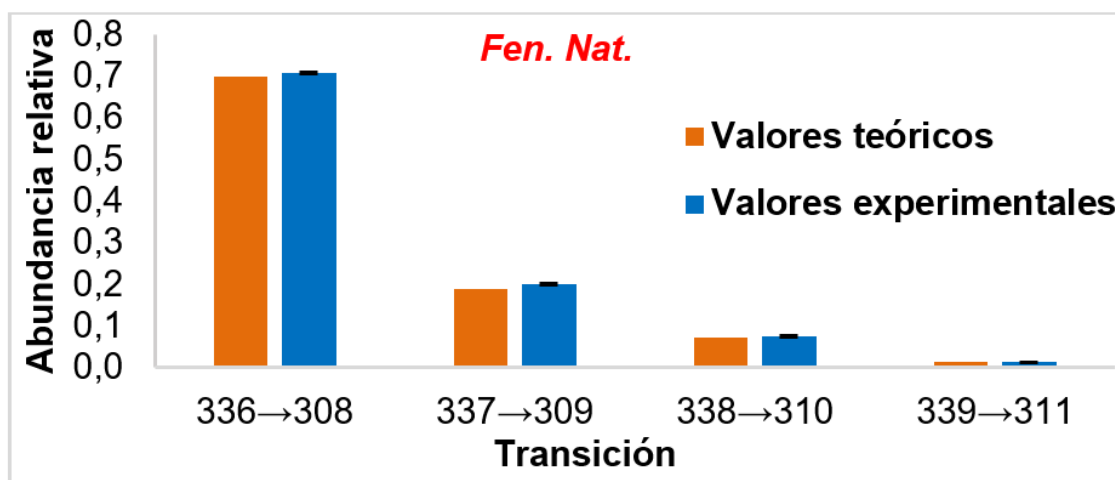
**Tabla 7.** Transiciones SRM y su energía de colisión óptima para la medida de la distribución isotópica de los aminoácidos estudiados, tanto de abundancia isotópica natural como marcados en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ ; cuando se derivatizan con MTBSTFA. Se encuentran subrayadas las transiciones elegidas en determinaciones futuras.

		AA Ab. natural	AA Marcado $1\text{-}^{13}\text{C}$	
Derivatiz.	AA	Transiciones (m/z)	Transiciones (m/z)	E.Colisión óptima (eV)
MTBSTFA	V	<u>288→260</u>	<u>289→260</u>	30
		289→261	<u>290→261</u>	
		290→262	291→262	
		291→263	292→263	
	L	<u>302→274</u>	<u>303→274</u>	50
		303→275	<u>304→275</u>	
		304→276	305→276	
		305→277	306→277	
	I	<u>302→274</u>	<u>303→274</u>	50
		303→275	<u>304→275</u>	
		304→276	305→276	
		305→277	306→277	
	P	<u>286→258</u>	<u>287→258</u>	50
		287→259	<u>288→259</u>	
		288→260	289→260	
		289→261	290→261	
	F	<u>336→308</u>	<u>337→308</u>	50
		337→309	<u>338→309</u>	
		338→310	339→310	
		339→311	340→311	

Se calcularon las abundancias experimentales obtenidas de cada transición y se compararon con las abundancias teóricas proporcionadas por el software Isopatr **[31]**. Un ejemplo de las contribuciones teóricas para las transiciones de un aminoácido (fenilalanina) obtenidas por Isopatr se ofrece en la Figura 12, mientras que la Figura 13 muestra las comparaciones de las distribuciones isotópicas teóricas y las experimentales obtenidas para la fenilalanina.

<b>Fen. Nat.</b>	<i>Precursor</i>			
<b>m/z</b>	<b>336</b>	<b>337</b>	<b>338</b>	<b>339</b>
<b>308</b>	0,69994	0,00784	0,00144	0,00002
<b>309</b>		0,19748	0,00221	0,00041
<b>310</b>			0,07376	0,00083
<b>311</b>				0,01325
<i>Producto</i>				

**Figura 12.** Abundancias teóricas de la fenilalanina de abundancia isotópica natural proporcionadas por el software Isopatrn [31]. Se subrayan las transiciones medidas experimentalmente en SRM en el proceso de validación.



**Figura 13.** Comparación de las abundancias teóricas y experimentales para la fenilalanina de abundancia natural.

En todos los clústeres analizados se obtuvo una coincidencia satisfactoria entre las abundancias experimentales y las teóricas. Se concluyó entonces que las transiciones elegidas para la determinación de los aminoácidos en SRM se podían medir correctamente.

#### 4.5. Medida de la distribución isotópica de Ang-I (marcada en $^{13}\text{C}$ y de abundancia natural) mediante UHPLC-ESI-MS/MS

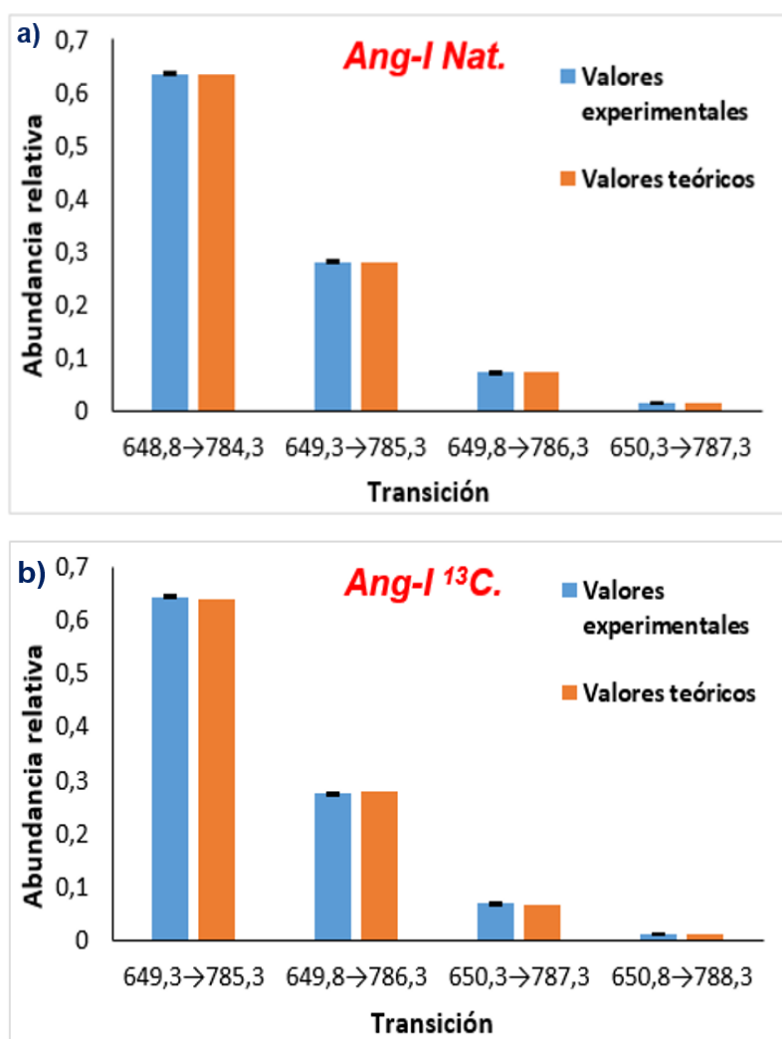
Las fracciones de Ang-I obtenidas según el procedimiento de purificación descrito en el [apartado 3.4.5](#) se juntaron para obtener una disolución de proteína purificada. A continuación, se inyectaron en el equipo de UHPLC-ESI-MS/MS cinco réplicas de una dilución 1:100 de dicha disolución. Para determinar la pureza espectral de la Ang-I se midió en modo SIM su distribución isotópica en el intervalo de relaciones  $m/z$  [1295,5-1301,5]. Se aplicó la ecuación E6 obteniéndose unos valores para  $x_M$  y  $x_{M-1}$  de  $(99,7 \pm 0,1)$  y  $(0,1 \pm 0,1)$ , respectivamente.

El enriquecimiento isotópico se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el [apartado 3.4.3](#), inyectando 5 réplicas de una disolución de Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$ . El enriquecimiento isotópico obtenido fue de 99,08% con una SSR de  $2,22\text{E}-5$ .

Para optimizar el procedimiento por SRM se realizaron barridos de iones producto a las relaciones  $m/z = 648,8$  y  $432,9$  correspondientes a los iones  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  y  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  a distintas energías de colisión. Las transiciones SRM seleccionadas para la Ang-I de abundancia isotópica natural y la marcada isotópicamente se muestran en la Tabla 8. Las abundancias experimentales obtenidas para cada transición se compararon con los valores teóricos proporcionados por el software Isopatrn [31] tanto para el compuesto de abundancia natural como su análogo marcado en  $^{13}\text{C}$ , con resultados satisfactorios tal y como se muestra en la Figura 14.

**Tabla 8.** Condiciones óptimas de medida de ambas Ang-I en SRM a baja resolución.

Tipo Ang-I	Transiciones (m/z)	E.Colisión óptima (eV)
Nat.	648,8→784,3	25
	649,3→785,3	
	649,8→786,3	
	650,3→787,3	
$^{13}\text{C}$	649,3→785,3	25
	649,8→786,3	
	650,3→787,3	
	650,8→788,3	



**Figura 14.** Comparación de las abundancias experimentales y teóricas de las transiciones viables para: **a)** la Ang-I de abundancia natural y **b)** la Ang-I marcada en <sup>13</sup>C.

#### 4.6. Determinación de la concentración del patrón de Ang-I sintetizado en el laboratorio.

Se prepararon tres mezclas pesando en una balanza analítica 50  $\mu\text{g}$  de una disolución de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Ang-I CRM y 50  $\mu\text{g}$  de una disolución Ang-I marcada en <sup>13</sup>C de concentración similar. Cada una de estas mezclas se inyectó en el equipo de UHPLC-ESI-MS/MS por quintuplicado en SIM (intervalo de  $m/z$  [1295,5-1301,5]) y SRM (según Tabla 8), obteniéndose los resultados reflejados en la Tabla 9. Como se puede observar, ambos modos de medida proporcionaron la misma concentración de Ang-I marcada en <sup>13</sup>C con una incertidumbre similar. Al hacer esta cuantificación con un CRM se puede considerar que la concentración obtenida es directamente trazable al SI.



#### 4. Resultados y discusión

Una vez cuantificada la disolución de Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$ , se prepararon tres mezclas nuevas, pipeteando en una balanza analítica 50  $\mu\text{g}$  la disolución de Ang-I marcada en  $^{13}\text{C}$  y 50  $\mu\text{g}$  de la disolución Ang-I sintetizada previamente en nuestro laboratorio, a una concentración similar. Se volvieron a inyectar en el equipo de UHPLC-ESI-MS/MS por quintuplicado en SIM y SRM, obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 9. Como se puede observar, ambos modos de medida proporcionaron de nuevo la misma concentración de Ang-I con una incertidumbre similar. Utilizando esta estrategia se logró obtener trazabilidad al SI en la concentración de la Ang-I sintética.

**Tabla 9.** Concentración de las disoluciones Ang-I tras los experimentos de IDMS.

Experimento IDMS	Trazador	Analito	Modo de adq.	C( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1 <sup>o</sup>	Ang-I nat. CRM	Ang-I $^{13}\text{C}$	SRM	27,3 $\pm$ 0,3
			SIM	27,3 $\pm$ 0,4
↓	↓	↓	↓	↓
2 <sup>o</sup>	Ang-I $^{13}\text{C}$	Ang-I nat. sint	SRM	28,6 $\pm$ 0,2
			SIM	28,6 $\pm$ 0,3

#### 4.7. Determinación de la concentración de los aminoácidos marcados en $^{13}\text{C}$ .

Se pesaron en una balanza analítica 50  $\mu\text{g}$  de una disolución 20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de cada aminoácido CRM de abundancia natural y 50  $\mu\text{g}$  de una disolución de concentración similar de los aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$ . Se aplicó el protocolo de derivatización recogido en el [apartado 3.4.1](#) con MTBSTFA y se inyectaron en el GC-MS/MS por triplicado, midiendo tanto en SIM como SRM y eligiendo los clústeres y las transiciones de las Tablas 6 y 7, respectivamente.

La concentración de los aminoácidos marcados se determinó los mismos días que se efectuaron los experimentos de hidrólisis. A lo largo del presente Trabajo Fin de Máster se realizaron 4 experimentos de hidrólisis, con lo cual, se efectuaron 4 caracterizaciones distintas de los aminoácidos marcados.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. En la primera y cuarta caracterización se inyectaron 4 mezclas de los aminoácidos derivatizados por triplicado, representándose en la Tabla 10 el valor medio de la concentración

#### 4. Resultados y discusión

y la incertidumbre estadística asociada. Para la segunda y tercera caracterización se realizó una única mezcla de aminoácidos derivatizados y se inyectó por triplicado, comparando el valor obtenido de concentración con el calculado en la primera caracterización.

Como se puede observar, se experimentó una reducción gradual de la concentración de algunos aminoácidos con el tiempo. Las disoluciones de los aminoácidos se conservaban congeladas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de proceder con los experimentos de hidrólisis, existiendo una diferencia temporal de aproximadamente una semana entre cada experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de concentración del primer y segundo experimento. Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas cuando se efectuó el tercer experimento (dos semanas de congelación). Esto sugiere que el disolvente utilizado en la preparación de las disoluciones ( $\text{H}_2\text{O}$  con 0,1% v/v de fórmico) pudiera no ser el más adecuado para garantizar la estabilidad de estas disoluciones.

Una posible solución al problema de la concentración puede ser el empleo de  $\text{HCl}$  0,3 M [35] o 0,1 M [8] como medio de disolución, si bien, por falta de tiempo, no se pudo evaluar la pertinencia de estos medios de disolución. Para el último experimento se prepararon nuevas disoluciones de concentración  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$  y de abundancia natural.

**Tabla 10.** Concentración de los aminoácidos marcados en SIM y SRM en cuatro experimentos de hidrólisis.

Modo de adq.	AA	C( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) Exp. 1	C( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) Exp. 2	C( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) Exp. 3	C( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) Exp. 4
SRM	V	20,3 $\pm$ 0,3	20,19 $\pm$ 0,02	17,22 $\pm$ 0,01	20,0 $\pm$ 0,1
SIM		20,7 $\pm$ 0,3	20,5 $\pm$ 0,1	17,38 $\pm$ 0,03	20,0 $\pm$ 0,1
SRM	L	20,3 $\pm$ 0,4	20,3 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,4
SIM		20,4 $\pm$ 0,5	20,23 $\pm$ 0,03	19,2 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,1
SRM	I	18,5 $\pm$ 0,4	18,5 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,1	18,4 $\pm$ 0,1
SIM		19,1 $\pm$ 0,5	19,0 $\pm$ 0,1	16,70 $\pm$ 0,02	18,6 $\pm$ 0,1
SRM	P	18,0 $\pm$ 0,2	18,04 $\pm$ 0,01	16,23 $\pm$ 0,02	17,7 $\pm$ 0,1
SIM		19,0 $\pm$ 0,4	18,7 $\pm$ 0,1	16,70 $\pm$ 0,03	18,6 $\pm$ 0,3
SRM	F	19,1 $\pm$ 0,3	19,2 $\pm$ 0,1	19,36 $\pm$ 0,01	18,6 $\pm$ 0,1
SIM		19,2 $\pm$ 0,5	19,26 $\pm$ 0,02	19,30 $\pm$ 0,02	18,4 $\pm$ 0,1

#### 4.8. Optimización del tiempo y la temperatura de hidrólisis

Las curvas de hidrólisis de cada experimento se construyeron con seis puntos, lo que implicó la ejecución de seis hidrólisis independientes en seis viales a diferentes tiempos y temperaturas. Las disoluciones hidrolizadas según el procedimiento recogido en el [apartado 3.4.9](#) se homogeneizaron con el vortex y se trasvasaron del vial de hidrólisis a un Eppendorf de 1,5 mL, donde se les aplicó el protocolo de derivatización descrito en el [apartado 3.4.1](#) con MTBSTFA. Esta vez, tras la adición de cada uno de los reactivos de derivatización se introdujo el Eppendorf en un baño con ultrasonidos para favorecer la correcta disolución de los aminoácidos. Cada hidrolizado se inyectó en el GC-MS/MS por triplicado, midiendo tanto en SIM como SRM y eligiendo los clústeres y las transiciones de las Tablas 6 y 7, respectivamente. Las recuperaciones se calcularon según la ecuación E10.

Inicialmente se optó por una temperatura de hidrólisis de 130 °C durante los primeros 90 minutos, a partir de los cuales se incrementó la temperatura a 150 °C durante 30 minutos, de modo que el tiempo de hidrólisis total fue de 120 minutos. Los resultados obtenidos se ven reflejados en la Figura 15 e indican una hidrólisis incompleta de la Ang-I con porcentajes de recuperación del 80% para prolina, fenilalanina y leucina; y del 40% para valina e isoleucina. En todas las curvas se observó este patrón de resultados, con la valina e isoleucina como los aminoácidos más difíciles de liberar. Esto puede ser debido a la contribución estérica que ofrece la cadena lateral de estos aminoácidos sobre el carbonilo [8].

Posteriormente se alargó la temperatura final de 150 °C hasta los 150 minutos, donde se observó un ligero aumento del porcentaje de recuperación para el grupo de aminoácidos de cinética lenta del 40 al 60 %, manteniendo intacto el valor de 80 % para el resto de aminoácidos. Estos resultados se encuentran representados en la Figura 16.

El tercer grupo de hidrólisis no se presenta en esta memoria, al haber obtenido unos resultados de concentración de aminoácidos marcados diferentes a los del primer experimento, que indicaban una posible degradación de los patrones marcados.

#### 4. Resultados y discusión

---

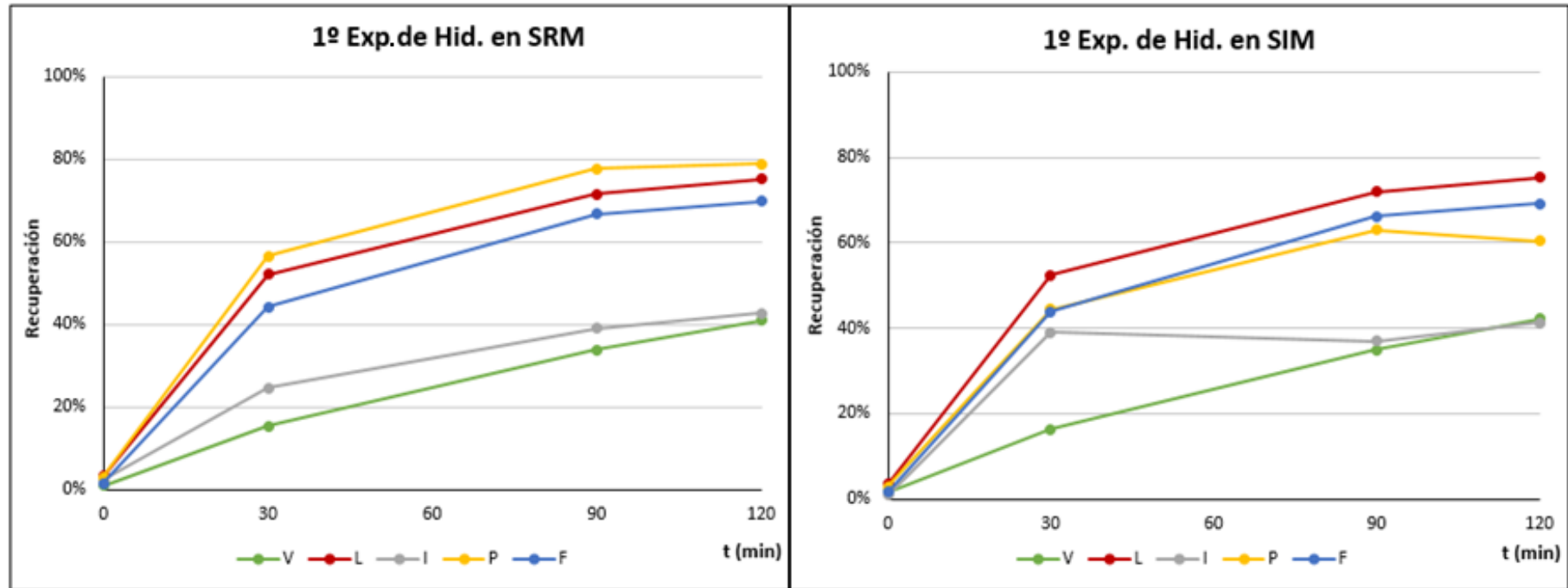
Por último, se buscaron unas condiciones de temperatura más elevadas: se mantuvo la temperatura inicial a 130 °C, este caso durante los primeros 30 minutos y, seguidamente, se incrementó la temperatura hasta 150 °C durante 210 minutos. También se modificó levemente el protocolo descrito en el [apartado 3.4.9](#), añadiendo más HCl y agua (con 0,1 % v/v de fórmico), con el fin de duplicar el volumen total en el vial de hidrólisis de 0,7 a 1,4 mL. Con estas condiciones se obtuvieron los mejores resultados de liberación de aminoácidos (ver Figura 17).

De nuevo pueden observarse dos comportamientos diferentes según el tipo de aminoácido: la valina e isoleucina finalizaron el experimento con un 80% de recuperación, aproximadamente, y se puede intuir por la tendencia creciente de las dos curvas que todavía podría no haberse llegado a unas condiciones de hidrólisis total de la Ang-I. Sin embargo, los aminoácidos de cinética más rápida (leucina, prolina y fenilalanina) lograron una rápida liberación a partir del minuto 90, donde se empieza a apreciar una meseta de recuperación en torno al 80%. El hecho de haberse mantenido prácticamente constante el porcentaje de recuperación tras 150 minutos nos sugiere que se ha obtenido una liberación equimolar de dichos aminoácidos (100%). El motivo de la existencia de un 20% de pérdida en la determinación puede deberse a una combinación de varios factores como: la fluctuación en la concentración de los aminoácidos marcados, un posible resultado incorrecto en la concentración de la Ang-I o el propio error asociado a la reproducibilidad en los puntos de la curva.

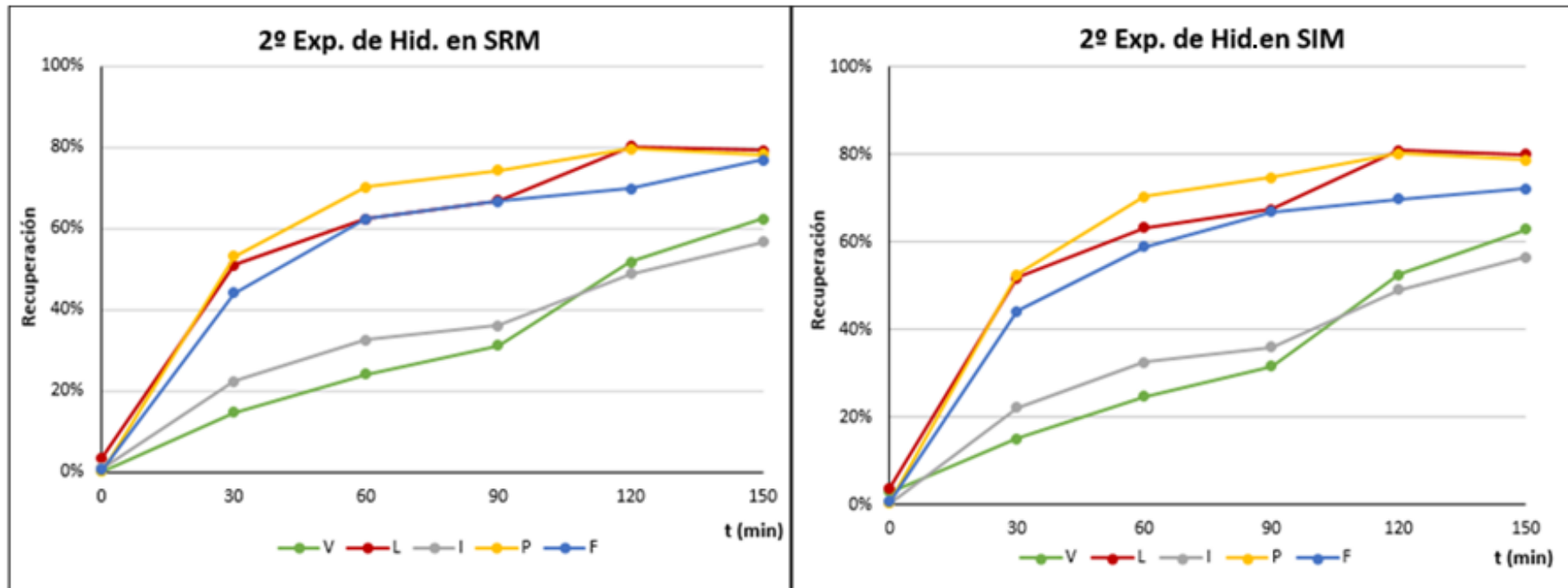
El comportamiento obtenido es poco usual si se compara con los estudios de Pritchard et al. [8], similares a lo de este Trabajo Fin de Máster, en los que se refleja una liberación prácticamente completa de leucina, prolina y fenilalanina tras 60 minutos de hidrólisis a 150°; con los aminoácidos de cinética más lenta llegando a porcentajes de recuperación superiores al 80%.

Todos los resultados obtenidos en SIM guardan el mismo parecido que en SRM a excepción de leucina, prolina e isoleucina, cuyos porcentajes de eran algo inferiores ( $\approx 5\%$ ) en comparación con los de SRM.

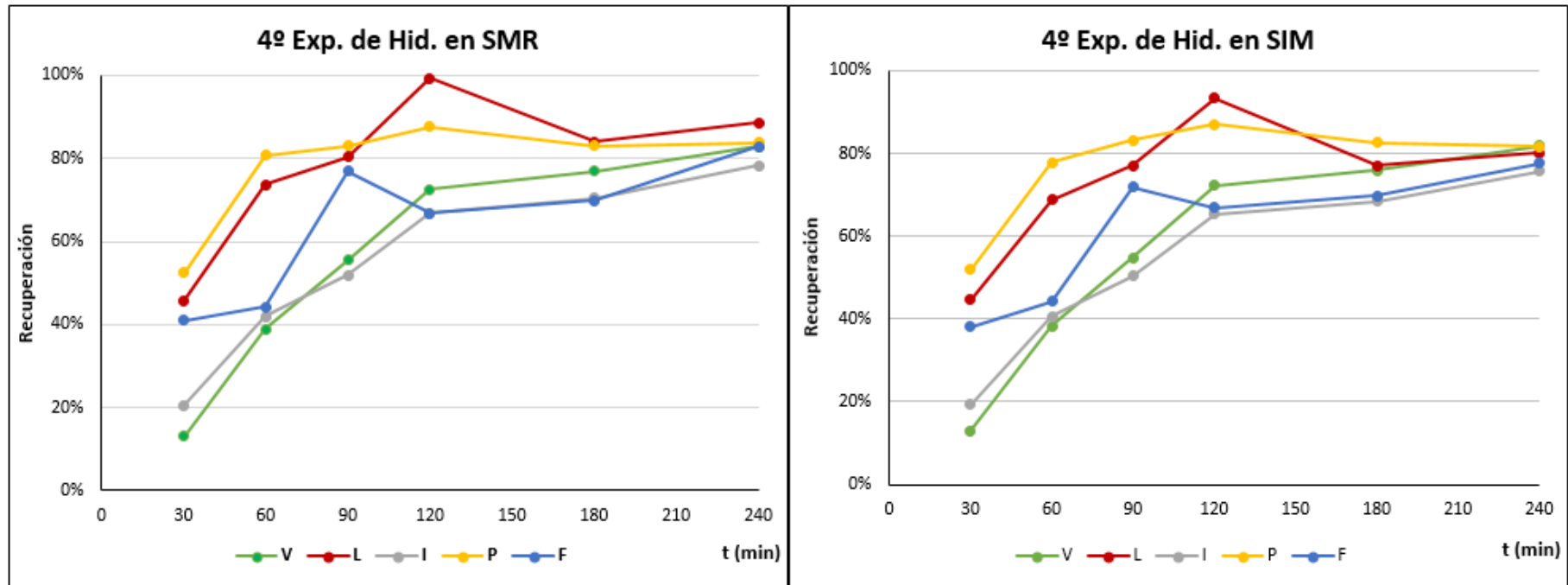
En todo caso, por falta de tiempo, no fue posible llevar a cabo experimentos adicionales que permitiesen explicar en más detalle estos resultados.



**Figura 15.** Curvas de hidrólisis en SRM y SIM de la Ang-I para los aminoácidos estudiados en las primeras condiciones instrumentales empleadas.



**Figura 16.** Curvas de hidrólisis en SRM y SIM de la Ang-I para los aminoácidos estudiados tras aumentar el tiempo de reacción en 30 minutos a 150 °C.



**Figura 17.** Curvas de hidrólisis en SRM y SIM de la Ang-I para los aminoácidos estudiados, tras doblar el volumen total del vial de hidrólisis y cambiar el gradiente de temperatura.

## 5. Conclusiones

- Se ha conseguido optimizar el método para la determinación de aminoácidos mediante GC-MS/MS tanto en modo SIM como SRM, demostrando que el reactivo derivatizante más adecuado es el MTBSTFA, tras haberse obtenido resultados de enriquecimiento isotópico en los análogos marcados isotópicamente muy similares a los declarados por el fabricante.
- Se ha conseguido la caracterización de un patrón de Ang-I natural sintetizada previamente en nuestro laboratorio mediante UHPLC-IDMS/MS. A partir de la caracterización previa del trazador marcado en  $^{13}\text{C}$  con el material de referencia CRM NIST 998 se pudo determinar la concentración del patrón de Ang-I sintetizado en nuestro laboratorio, obteniendo trazabilidad al SI.
- Se evidenciaron problemas de estabilidad de los aminoácidos marcados en  $^{13}\text{C}$  con el tiempo, por lo que se recomienda en futuros trabajos efectuar un estudio de estabilidad de los aminoácidos en un medio distinto al empleado, preferiblemente en HCl, como indican algunas publicaciones [8,35].
- Las condiciones de hidrólisis de Ang-I ensayadas mediante la aplicación de microondas focalizadas no proporcionaron una hidrólisis completa del péptido teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los aminoácidos determinados. Con lo cual, el método propuesto no proporciona resultados exactos de pureza en las condiciones estudiadas.



## 6. Bibliografía

- [1] R.D. Josephs, G. Martos, M. Li, L. Wu, J. Melanson, M. Quaglia, P-J. Beltrão, D. Prevoo-Franzsen, A. Boeuf, V. Delatour, M. Öztug, A. Henrion, J-S. Jeong y S-R. Park. "Establishment of measurement traceability for peptide and protein quantification through rigorous purity assessment—a review". *Metrologia*. **2019**; 56(4): pp. 044006.
- [2] R.D. Josephs, N. Stoppacher, A. Daireaux, T. Choteau, K.A. Lippa, K. Phinney, S. Westwood y R.I. Wielgosz. "State-of-the-art and Trends for the SI Traceable Value Assignment of the Purity of Peptides Using the Model Compound Angiotensin I". *Trends in Analytical Chemistry*. **2018**; 101: 108-119.
- [3] G.L. Bakris. "Hipertensión arterial". *Manuales MSD*. Última revisión en **2018**.
- [4] P. Rodríguez-González y J.I. García-Alonso. "Isotope Dilution Mass Spectrometry". En "Encyclopedia of Analytical Science" Tercera edición. Elsevier. **2019**; Vol.6: 545-553.
- [5] J. Vogl. "Characterisation of reference materials by isotope dilution mass spectrometry". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2007**; 22(5): 475-492.
- [6] J.I. García-Alonso y P. Rodríguez-González. "Isotope Dilution Mass Spectrometry". RSC Publishing. **2013**.
- [7] Y. Oda, K. Huang, F.R. Cross, D. Cowburn, y B.T. Chait. "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1999**; 96: 6591-6596.
- [8] C. Pritchard, F.A. Torma, C. Hopley, M. Quaglia y G. O'Connor. "Investigating microwave hydrolysis for the traceable quantification of peptide standards using gas chromatography–mass spectrometry". *Analytical Biochemistry*. **2011**; 412: 40-46.
- [9] W. Burkitt, C. Pritchard, C. Arsene, A. Henrion, D. Bunk y G. O'Connor. "Toward Système International d'Unité-traceable protein quantification: From amino acids to proteins". *Analytical Biochemistry*. **2008**; 376(2): 242-251.

- [10] T. Kinumi, M. Goto, S. Eyama, M. Kato, T. Kasama y A. Takatsu. "Development of SI-traceable C-peptide certified reference material NMIJ CRM 6901-a using isotope-dilution mass spectrometry-based amino acid analyses". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**; 404(1): 13-21.
- [11] L. Wu, A. Takatsu, S-R Park, B. Yang, H. Yang, T. Kinumi, J. Wang, J. Bi y Y. Wang. "Development and Co-Validation of Porcine Insulin Certified Reference Material by High-Performance Liquid Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2015**; 407(11):3125-35.
- [12] J.E. Melanson, M.P. Thibeault, B.B. Stocks, D.M. Leek, G. McRae y J. Meija. "Purity Assignment for Peptide Certified Reference Materials by Combining qNMR and LC-MS/MS Amino Acid Analysis Results: Application to Angiotensin II". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2018**; 410(26):6719-6731.
- [13] J. Villanueva, M. Carrascal y J. Abian. "Isotope Dilution Mass Spectrometry for Absolute Quantification in Proteomics: Concepts and Strategies". *Journal of Proteomics*. **2014**; 96:184-99.
- [14] S.A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner y S.P. Gygi. "Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2003**; 100(12): 6940-5.
- [15] K. Kito y T. Ito. "Mass Spectrometry-Based Approaches Toward Absolute Quantitative Proteomics". *Current Genomics*. **2008**; 9, 263-274.
- [16] L. Anderson y C.L. Hunter. "Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins". *Molecular & Cellular Proteomics*. **2006**; 4: 573-88.
- [17] V. Brun, C. Masselon, J. Garin y A. Dupuis. "Isotope Dilution Strategies for Absolute Quantitative Proteomics". *Journal of Proteomics*. **2009**; 72(5):740-9.
- [18] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch y J. Garin. "Isotope-labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics". *Molecular & Cellular Proteomics*. **2007**; 12:2139-49.
- [19] C. Pritchard, K.J. Groves, S. Biesenbruch, G. O'Connor, A.E. Ashcroft, C. Arsene, D. Schulze y M. Quaglia. "Quantification of Human Growth Hormone in

Serum with a Labeled Protein as an Internal Standard: Essential Considerations”. Analytical Chemistry. **2014**; 13: 6525-32.

[20] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick y B. Kuster. “Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: A Critical Review”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **2007**; 389(4):1017-31.

[21] J.W. Gouw, J. Krijgsveld y A.J.R. Heck. “Quantitative Proteomics by Metabolic Labeling of Model Organisms”. Molecular & Cellular Proteomics. **2010**; 9(1): 11–24.

[22] Y. Zhou, Y. Shan, L. Zhang y Y. Zhang. “Recent Advances in Stable Isotope Labeling Based Techniques for Proteome Relative Quantification”. Journal of Chromatography A. **2014**; 1365: 1-11.

[23] Q. Shakey, B. Bates y J. Wu. “An approach to quantifying N-linked glycoproteins by enzyme-catalyzed  $^{18}\text{O}_3$ -labeling of solid-phase enriched glycopeptides”. Analytical Chemistry. **2010**; 82: 7722-7728.

[24] J. Liu, Y. Shan, Y. Zhou, Z. Liang, L. Zhang y Y.Zang. “Advances and applications of stable isotope labeling-based methods for proteome relative quantitation”. Trends in Analytical Chemistry. **2020**; 124: 115815.

[25] M. Bantscheff, S. Lemeer, M.M. Savitski y B. Kuster. “Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: Critical Review Update from 2007 to the Present”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **2012**; 404(4): 939-65.

[26] A. Muñoz, R. Kral y H. Schimmel. “Quantification of Protein Calibrants by Amino Acid Analysis Using Isotope Dilution Mass Spectrometry”. Analytical Biochemistry. **201**; 408(1): 124-31.

[27] C.O. Kappe y D. Dallinger. “The impact of microwave synthesis on drug discovery”. Nature Reviews Drug Discovery. **2006**; 5(1):51-63.

[28] F. Grimm, L. Fets y D. Anastasiou. “Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC–MS) to Study Metabolism in Cultured Cell”. Advances in Experimental Medicine and Biology. **2016**; 899: 59-88.



- [29] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González y J.I. García-Alonso “Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry”. *Journal of Mass Spectrometry*. **2014**; 49(8): 681-91.
- [30] H. Kubinyi. “Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem”. *Analytica Chimica Acta*. **1991**; 247(1): 107-119.
- [31] L. Ramaley y L.C. Herrera. “Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2008**; 22(17): 2707–2714.
- [32] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennigb y M.Millet. “Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis”. *Talanta*. **2009**; 77(4): 1473–1482.
- [33] A.K. Kiprop, E. Pourtier y S.K. Kimutai. “GC-MS and ESI-MS detection of catechol”. *International Journal of Education and Research*. **2013**; 1(12): pág.4.
- [34] T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, E.S. Chernetsova y I.A. Revelsky. “Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids”. *Journal of Separation Science*. **2003**; 26(17): 1474-1478.
- [35] X. Zhang, L. Yang y Z. Mester. “Determination of amino acids in selenium-enriched yeast by gas chromatography–mass spectrometry after microwave assisted hydrolysis”. *Analytica Chimica Acta*. **2012**; 744:54-59.