

A UNIVERSAL SOLUTION TO STANDARDIZE ABSOLUTE QUANTIFICATION OF BIOMOLECULES USING HPLC WITH ICP-MS DETECTION

Francisco Calderón Celis, Alfredo Sanz Medel, Jorge Ruiz Encinar

Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo.

Premio Royal Society of Chemistry (RSC), a la mejor comunicación en el ámbito de especiación química presentada en la JORNADA DE ESPECIACIÓN, Pre-symposium on speciation and regulations in food. XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Valencia 2017.

1. INTRODUCCIÓN Y CONTEXTO

Determinar concentraciones o cantidades absolutas de una biomolécula es necesario en un amplio abanico de campos en las Ciencias de la Vida, tales como Toxicología, Farmacología, Ciencias Medioambientales, o Proteómica. En los últimos años, los avances técnicos instrumentales han situado a la Espectrometría de Masas Elemental (ICP-MS) como una de las herramientas analíticas más útiles y potentes para llevar a cabo este tipo de cuantificación.¹ Esto se debe a que la señal ICP-MS del elemento medido es directamente proporcional a su masa, independientemente de la especie o ambiente químico en que se encuentre. Esto permite llevar a cabo la cuantificación de forma absoluta de cualquier compuesto a través de la medida de uno de sus hetero-elementos (todos excepto C, H, N, y O) mediante el empleo de un patrón genérico que contenga dicho elemento.² No obstante, dado que el ICP es una fuente de ionización dura, en la que toda la muestra se transforma en iones atómicos, no es posible obtener información estructural o discriminar las diferentes especies de una misma muestra de las que puede proceder el elemento medido. Por consiguiente, es necesaria una etapa de separación de las diferentes especies en la muestra, antes de la detección final por ICP-MS (análisis de especiación).¹

La ionización independiente de la especie en ICP-MS permite, en este tipo de análisis, relacionar la señal elemental de un patrón genérico -de concentración conocida- con la señal del analito, para determinar la cantidad absoluta del mismo. Sin embargo, para llevar a cabo esta cuantificación es imperativo que el factor de respuesta elemental sea el mismo para ambos, patrón y analito; o en su defecto, se conozca dicho factor de respuesta para poder corregir posibles diferencias entre las especies.³ Este hecho es especialmente significativo en el caso de que llegue carbono al plasma ICP (presente en biomoléculas, disolventes orgánicos, disuelto en matrices acuosas, etc.). El carbono desencadena una serie de procesos en el plasma (transferencia de carga, procesos redox, cambios en densidad electrónica, forma y temperatura del plasma, etc.) que afectan a la eficiencia de ionización de un gran número de elementos, y con una magnitud que depende del propio elemento, y de la cantidad y forma química de la especie de carbono.^{4,5} Por lo tanto, cuando se lleva a cabo análisis por Cromatografía

de Líquidos (especialmente de fase reversa, que se emplea a menudo en el estudio de biomoléculas como proteínas), la cantidad cambiante de carbono que llega al plasma, como consecuencia del gradiente cromatográfico, origina un variación en el factor de respuesta elemental a lo largo de todo el análisis.⁶ Consecuentemente, para llevar a cabo la cuantificación absoluta de las biomoléculas analito es necesario controlar, corregir o caracterizar esta variación.

La principal estrategia empleada en HPLC-ICP-MS para la corrección de este efecto es la Dilución Isotópica post-columna (IDA).⁷ Esta estrategia consiste en la adición constante al flujo cromatográfico que sale de la columna de una disolución enriquecida en un isótopo estable del elemento a medir, de forma que, midiendo la relación de señales isótopo natural/enriquecido, se pueden corregir posibles variaciones del factor de respuesta. Sin embargo, esta estrategia implica la necesidad de un isótopo marcado para cada elemento; es decir, no es factible para el análisis de elementos monoisotópicos. En estos casos, son necesarias estrategias alternativas, como la adición de una disolución con contenido fijo orgánico (p. ej., acetonitrilo o metanol),³ o el empleo de un segundo flujo cromatográfico inverso.⁸ No obstante, estas estrategias están limitadas por su compleja instrumentación, y ofrecen un limitado rango de trabajo.

En conclusión, no hay a día de hoy una estrategia que permita la corrección de las variaciones de sensibilidad a lo largo de gradientes cromatográficos en HPLC-ICP-MS y que sea aplicable a más de un elemento a la vez, o en las mismas condiciones experimentales. Es decir, que pudiera considerarse "universal".

2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN UNIVERSAL DE BIOMOLÉCULAS MEDIANTE HPLC-ICP-MS

En este trabajo se pretende desarrollar, evaluar, y validar una estrategia "universal", alternativa a las existentes, para la corrección de las variaciones de sensibilidad debidas al efecto del carbono para una serie de elementos de gran interés en ciencias de la vida (S, P, As, Se, Br, I) mediante la adición controlada de gas metano (Ar:CH₄, 90:10) al plasma ICP (Figura 1) del ICP-MS.

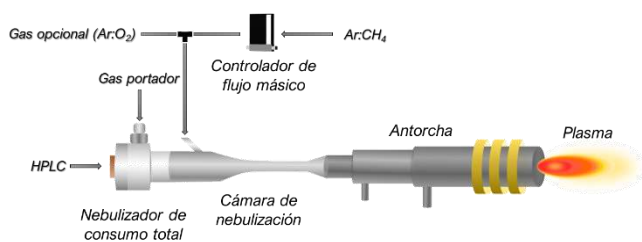


Figura 1. Configuración instrumental para la adición controlada de metano al plasma ICP. Adaptado de Ref. 9.

Para evaluar la eficacia de esta estrategia en la corrección de las variaciones en el factor de respuesta elemental durante gradientes cromatográficos en ICP-MS, se realizó el análisis por HPLC-ICP-MS de los seis elementos citados, los cuales se añadieron a las fases móviles cromatográficas en igual concentración (300 - 500 µg/L). Para ello, se llevó a cabo un gradiente cromatográfico entre 0 y 70 % fase móvil B (acetonitrilo, ACN) en 35 min, adicionando diferentes flujos de Ar:CH₄ al plasma, en un intervalo entre 0 - 250 mL/min.

La variación de la señal elemental en estas condiciones se midió por el "error de cuantificación", como relación del factor de respuesta elemental al comienzo del gradiente, y a 50% ACN (que es el rango típico de elución para biomoléculas). De esta forma, pretendíamos establecer el máximo error que se obtendría en un análisis cuantitativo, si se empleara un patrón de cuantificación al cuantificar la biomolécula eluyendo a un alto % de ACN. Los errores cuantitativos obtenidos en ausencia de Ar:CH₄ (condiciones estándar), se encontraron en un rango entre 60 y 350 % de error, según el elemento (Tabla 1), demostrando la gran variación de la señal que tiene lugar en tales circunstancias (ver Figura 2).

Tabla 1. Error en la cuantificación (%), y error promedio en la cuantificación para S, Se, P, As, Br, I, obtenidos en el análisis por HPLC-ICP-MS, en condiciones estándar, y cuando se adiciona Ar:CH₄, respectivamente. El error promedio se corresponde a una desviación estándar de la media. Adaptada de Ref. 9.

Elemento	Condiciones estándar	Adición de Ar:CH ₄		
	Error en la cuantificación (%)	Rango de flujo óptimo (mL/min)	Error en la cuantificación promedio (%)	Mejora de sensibilidad
S	60	30 - 170	2,3 ± 2,0	3 - 5
Se	370	40 - 250	17 ± 13	3 - 8
P	310	200 - 250	15 ± 8	3 - 5
As	350	220 - 250	12 ± 3	2 - 3
Br	150	30 - 200	15 ± 11	1 - 60
I	215	30 - 250	7,3 ± 3,9	2 - 5

Sin embargo, la adición de Ar:CH₄ resultó siempre en una disminución de esta variación para todos los elementos, logrando que el error de cuantificación fuera inferior a 20 %, en un rango de flujos determinado, para cada uno de los elementos estudiados (ver Tabla 1). De hecho, se logró

encontrar unas condiciones de compromiso a 50 mL/min de Ar:CH₄, para la mejor corrección posible y el mayor número de elementos, logrando errores menores al 10 % para S, Se, Br, y I, y menores al 30 % para el P y el As. El flujo óptimo de estos dos últimos elementos se encuentra en el rango de 200 - 250 mL/min (al menos 10 veces inferior a cuando no se empleó metano).

Por otro lado, como ya se ha señalado en estudios previos,¹⁰ la adición de metano al plasma también resultó en una mejora significativa de la sensibilidad. De esta forma, al relacionar la señal elemental obtenida al comienzo del gradiente para cada flujo de Ar:CH₄, en condiciones estándar, se observó una mejora de entre 2 y 8 veces, de nuevo según el elemento (Tabla 1, última columna), como consecuencia del efecto de mejora del carbono en el plasma. Cabe destacar el caso de Br, donde se observó una mejora en la sensibilidad fuera de lo común, de hasta 60 veces, la cual se demostró después que se debía a contaminaciones de Br en el gas Ar:CH₄.

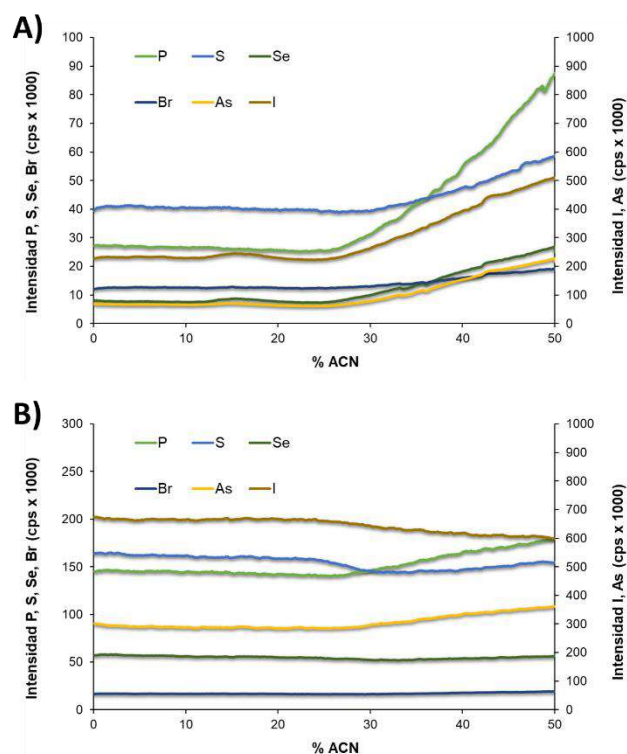


Figura 2. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-ICP-MS para S, P, As, Se, Br, I, en (A) condiciones estándar, y (B) mediante la adición de 50 mL/min de Ar:CH₄.

Es resumen, mediante la adición de metano al plasma, y en condiciones experimentales adecuadas, fue posible la corrección de las variaciones de señal ICP-MS en gradientes cromatográficos para los seis elementos estudiados y en todo el rango de análisis ensayados. Esto hace posible llevar a cabo estudios cuantitativos con un error máximo menor al 10 % en la mayoría de los casos, acompañado de una mejora significativa en la sensibilidad.

3. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Una vez desarrollada la metodología, y tras haber logrado unas condiciones experimentales adecuadas para el análisis multi-elemental por HPLC-ICP-MS para S, P, Se, As, Br, I, de forma simultánea, se procedió a la validación de dicha metodología para la cuantificación absoluta de biomoléculas (empleando patrones genéricos para los elementos analito). Para ello, se realizó una comparación de los resultados obtenidos con dilución isotópica en línea (IDA) como referencia.

Dado que el análisis por IDA sólo puede llevarse a cabo con elementos que contienen más de un isótopo estable, se eligieron como “modelo” compuestos que contienen: Br (pipobroman), Se (ácido bencenoselénico), y S (BOC-L-Metionina). Para cuantificarlos, utilizamos compuestos genéricos que contienen dichos elementos (metionina, S; selenometionina, Se; y ácido bromopropiónico, Br) como patrones de cuantificación, que se analizaron por inyección en flujo (FIA) en concentración conocida. Para el análisis por IDA, se adicionó una disolución acuosa post-columna con los isótopos marcados de S (³⁴S), Se (⁷⁷Se), y Br (⁸¹Br), y realizando una cuantificación simultánea de los compuestos. De forma análoga, se llevó a cabo el mismo experimento en condiciones estándar, y adicionando 50 mL/min Ar:CH₄ (ver los resultados obtenidos en Figura 3 y Tabla 2).

Tabla 2. Exactitud en la cuantificación de BOC-L-Metionina, Pipobroman, y Ácido bencenoselénico, respecto a IDA, en condiciones estándar, y con adición de 50 mL/min de Ar:CH₄. El error se corresponde con una desviación estándar de la media (n=3).

Compuesto	Exactitud en condiciones estándar	Exactitud con Ar:CH ₄
(S) BOC-L-Metionina	254 ± 8 %	102 ± 4 %
(Se) Ácido bencenoselénico	113 ± 2 %	102 ± 2 %
(Br) Pipobroman	153 ± 3 %	98 ± 4 %

La comparación de los resultados cuantitativos obtenidos (dados en Tabla 2), demostró que, en condiciones estándar, al no corregir las variaciones de sensibilidad a lo largo del gradiente, se produce un importante error en la cuantificación (p. ej., en el caso del azufre de alrededor del 250 %). Por el contrario, en presencia de Ar:CH₄, se logran resultados cuantitativos que concuerdan en un 98 - 102 % con los obtenidos por IDA, validando así la aplicabilidad de la metodología propuesta para análisis cuantitativos. Además, hay que tener en cuenta que los tres compuestos “modelo” eluyen en un amplio rango de %ACN: a 16 % el ácido bencenoselénico, a 36 % el Pipobroman, y a 45 % el BOC-L-Metionina, lo que demuestra que la estrategia desarrollada es aplicable en todo el rango de gradiente (0 – 50 % ACN), como se hizo notar con anterioridad.

Por último, se evaluó la aplicabilidad de la metodología desarrollada en el análisis cuantitativo de muestras reales por HPLC-ICP-MS. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación absoluta de las especies proteicas presentes

en una muestra de veneno de cobra africana *Naja mossaibica*, previamente caracterizada,¹¹ mediante la medida de azufre, empleando BOC-L-Metionina como patrón interno de cuantificación. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis cuantitativo mediante IDA, siguiendo el procedimiento empleado en su caracterización previa, y usando una columna cromatográfica que proporciona recuperaciones cromatográficas cuantitativas para todas las especies detectables de la muestra.¹¹ Posteriormente, se llevó a cabo este análisis, pero adicionando 50 mL/min Ar:CH₄ al plasma (ver Figura 4A).

Como se puede observar en la Figura 4B, los resultados cuantitativos obtenidos para la cuantificación simultánea de hasta 27 biomoléculas mediante ambas estrategias, IDA y adición de Ar:CH₄, son equivalentes. Es decir, mediante la metodología propuesta, no sólo se obtiene la misma exactitud en los resultados cuantitativos, validando la metodología incluso para el análisis de muestras reales, sino que incluso la precisión obtenida fue similar a IDA, una estrategia bien reconocida por su elevada precisión. Es de resaltar la disminución en la señal de fondo de azufre observado para el caso de la adición de metano (que resultó en una mejora de la relación S/N la cual, a su vez, se tradujo en una mejora de los LOD de entre 2 y 4 veces). Esto se debe a que en el patrón de ³⁴S empleado en IDA, la abundancia de ³²S (que es el isótopo analito) no es cero, sino que es de 3,3 %, y, por tanto, produce un aumento de la concentración de fondo de azufre. Como consecuencia, especies que no pudieron cuantificarse con la técnica de referencia (IDA), como la 5 y la 13, pudieron cuantificarse con la nueva metodología propuesta.

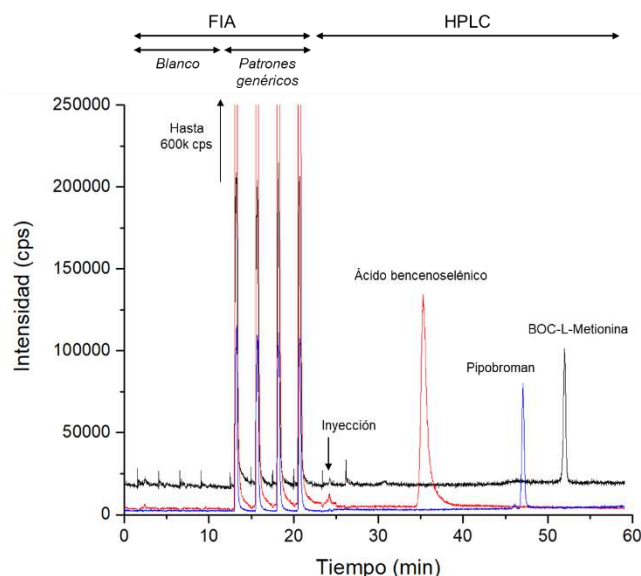


Figura 3. Diagrama y cromatograma de los patrones genéricos y analitos estudiados, respectivamente, para S (negro), Br (azul), y Se (rojo), adicionando un flujo de 50 mL/min Ar:CH₄ al plasma. Adaptado de Ref. 9.

Por consiguiente, los resultados obtenidos demostraron la aplicabilidad de la metodología propuesta para poder

llevar a cabo cuantificación absoluta incluso en muestras complejas, como la muestra analizada, que contenía cerca de 30 especies, y para ello empleando un único patrón genérico.

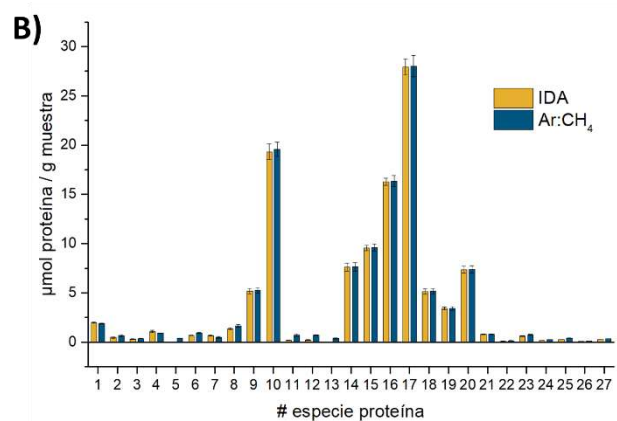
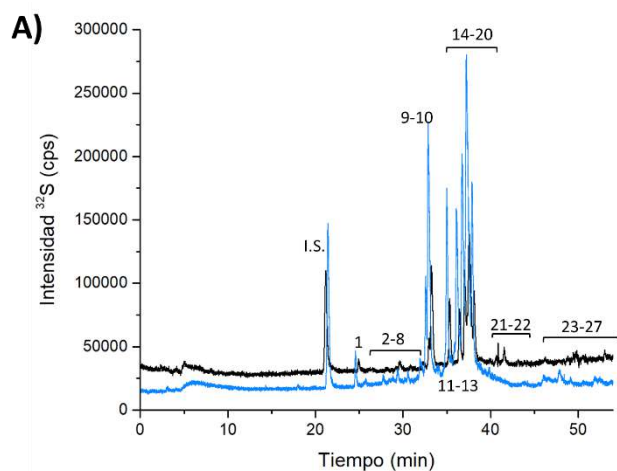


Figura 4. (A) Cromatograma de HPLC-ICP-MS de azufre obtenido para la muestra de veneno, junto con BOC-L-Metionina como patrón de cuantificación, mediante IDA (negro) y adición de 50 mL/min de Ar:CH₄ (azul). (B) Comparación de los resultados cuantitativos obtenidos para las 27 especies encontradas en la muestra, mediante IDA (naranja) y Ar:CH₄ (azul). El error experimental se corresponde a una desviación estándar de la media (n=3). Adaptado de Ref. 9.

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo muestra el desarrollo de una novedosa metodología que permite llevar a cabo el análisis cuantitativo de especiación por HPLC-ICP-MS, para cualquier compuesto que contenga S, P, As, Se, Br, y/o I (utilizando las mismas condiciones, y sin necesidad de patrones específicos). Además, esta metodología es más simple (no requiere de ninguna modificación instrumental pre- o post-columna), más barata (no requiere de ningún patrón enriquecido isotópicamente), y más sensible que otras estrategias alternativas empleadas en este tipo de análisis (particularmente la estrategia IDA).

No obstante, la metodología descrita tiene cierto margen de mejora. En este sentido, las condiciones de compromiso encontradas aquí no son óptimas para todos los elementos (sobre todo P y As), y por tanto las características analíticas de la metodología se ven comprometidas. Por otro lado, es

posible todavía lograr una mayor simplicidad instrumental, si se logra una mezcla de gases (metano con gas opcional), eliminando la necesidad de un controlador de flujo externo, de tal modo que sea posible una adición precisa directamente con el panel de control del instrumento.

En todo caso, podemos afirmar que la metodología propuesta puede considerarse ya una solución “universal” para la cuantificación absoluta de biomoléculas (que contengan hetero-elementos) sin patrones específicos, y tiene el potencial para suponer un punto de inflexión de gran calado en el análisis cuantitativo de especiación por ICP-MS, tanto para metabolitos como para péptidos y/o proteínas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad el soporte económico (CTQ2013-49032-C2-1-R, CTQ2016-79412-P; y BES-2014-0668032, F.C.C.).

Referencias

- 1.- Cid-Barrio, L.; Calderón-Celis, F.; Abásolo-Linares, P.; Fernández-Sánchez, M. L.; Costa-Fernández, J. M.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**.
- 2.- Calderón-Celis, F.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, 1–23.
- 3.- Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Carrascal, M.; Abián, J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (5), 1777–1787.
- 4.- Allain, P.; Jaunault, L.; Mauras, Y.; Mermet, J. M.; Delaporte, T. *Anal. Chem.* **1991**, 63 (14), 1497–1498.
- 5.- Grindlay, G.; Mora, J.; de Loos-Vollebregt, M.; Vanhaecke, F. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2013**, 86, 42–49.
- 6.- Wind, M.; Eisenmenger, A.; Lehmann, W. D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, 17 (1), 21–26.
- 7.- Brun, V.; Masselon, C.; Garin, J.; Dupuis, A. *J. Proteomics* **2009**, 72 (5), 740–749.
- 8.- Pröfrock, D.; Prange, A. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (39), 6706–6715.
- 9.- Calderón-Celis, F.; Sanz-Medel, A.; Ruiz Encinar, J. *Chem. Commun.* **2017**.
- 10.- Warburton, E.; Goenaga-Infante, H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, 22 (4), 370–376.
- 11.- Calderón-Celis, F.; Diez-Fernández, S.; Costa-Fernández, J. M.; Ruiz Encinar, J.; Calvete, J. J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (19), 9699–9706.