

### ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN ANÁLISIS CLÍNICO: DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS Y AMINOÁCIDOS

María Teresa Fernández del Campo García, Ana María Casas Ferreira, Miguel del Nogal Sánchez, Encarnación Rodríguez Gonzalo, José Luis Pérez Pavón.

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

#### 1. Introducción

En los últimos años ha habido un gran auge en el desarrollo de metodologías no separativas, debido principalmente a su elevada velocidad de análisis. Esto las hace muy interesantes para ser utilizadas como método de criba en la modalidad de trabajo criba-confirmación.

En esta modalidad de trabajo las muestras son analizadas en un primer lugar utilizando un método rápido que permita la obtención de información cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa para resolver el problema analítico planteado en el menor tiempo posible. Solo aquellas muestras que presenten resultados anómalos son sometidas a un segundo análisis para confirmar los resultados obtenidos. En esta segunda etapa normalmente se emplea un método que requiere de un mayor tiempo de análisis.

Se han propuesto diferentes metodologías no separativas en función de la volatilidad de los compuestos que se estén analizando. Para analitos volátiles, se han propuesto distintas estrategias, como el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza (HS) a un espectrómetro de masas (MS) o la reacción de transferencia de protones acoplada a espectrometría de masas, entre otras [1]. Para analitos no volátiles, una de las metodologías más utilizadas ha sido el análisis por inyección en flujo acoplada a espectrometría de masas (FIA-MS) [2].

En la metodología FIA-MS las muestras son inyectadas en el sistema y transportadas directamente al espectrómetro de masas sin separación mediante una corriente de fase móvil. La instrumentación es sencilla, pudiéndose utilizar cromatógrafos de líquidos en los que se elimina la columna cromatográfica. Esta metodología presenta importantes ventajas respecto a la separación cromatográfica tradicional (HPLC-MS), como son la elevada velocidad de análisis o la posibilidad de utilizar disolventes no compatibles con la separación cromatográfica [3]. A pesar de estas ventajas, la metodología FIA-MS ha estado frenada debido a que los espectrómetros de masas existentes no eran lo suficiente sensibles ni selectivos, parámetros muy importantes sobre todo cuando la muestra llega al MS sin separación. Hoy en día, gracias a los nuevos desarrollos instrumentales en el campo de la espectrometría de masas, esta metodología es altamente prometedora [3].

FIA-MS se ha aplicado en diferentes ámbitos de investigación (clínico, ambiental, etc.) y diferentes tipos de muestras [2,4-7]. Un campo importante para su aplicación son los laboratorios de análisis clínico, ya que el volumen de muestras a analizar suele ser muy elevado. Estos análisis mediante FIA-MS proporcionan información que puede servir como ayuda en el diagnóstico precoz de ciertas enfermedades.

En este trabajo se presentan las metodologías basadas en FIA-MS desarrolladas por nuestro grupo de investigación para la determinación de compuestos de interés clínico en muestras biológicas con procedimientos de toma de muestra no invasivo. Este tipo de muestras son más fáciles de obtener, generando un menor estrés para los pacientes en comparación con otro tipo de muestras como, por ejemplo, la sangre. En concreto, se ha llevado a cabo la determinación tanto de poliaminas como aminoácidos en orinas y salivas. Las poliaminas son aminos alifáticas que participan en procesos de proliferación celular y crecimiento de tejidos [8]. Son numerosos los estudios que han encontrado concentraciones elevadas de poliaminas en muestras biológicas de pacientes diagnosticados con un proceso tumoral respecto a sujetos sanos [8-10]. En el caso de los aminoácidos, alteraciones en su metabolismo pueden provocar variaciones en sus concentraciones fisiológicas (bien aumentando o disminuyendo) y la aparición de síntomas clínicos relacionados con alguna enfermedad [11,12]. De hecho, los primeros estudios en este campo se centraron en el estudio de trastornos hereditarios del metabolismo de los aminoácidos en recién nacidos.

Los resultados obtenidos con las metodologías propuestas demuestran su aplicabilidad para el análisis clínico. Además, los métodos desarrollados tratan de resolver las principales desventajas de la metodología FIA-MS, como son los efectos de supresión iónica y la presencia de interferencias isobáricas.

#### 2. Determinación de aminoácidos y poliaminas en muestras de saliva

La saliva es un fluido biológico que se puede recolectar rápida y fácilmente a través de medios no invasivos y sin estrés para el individuo. Este fluido biológico está compuesto por aproximadamente un 99% de agua, contiene una gran variedad de electrolitos (calcio, magnesio, sodio, potasio, etc.), diversas proteínas, ácidos nucleicos y hormonas [13,14]. También contiene glucosa y algunos productos metabólicos nitrogenados, como urea y amoníaco [13,14]. Se ha demostrado que muchos

de los compuestos presentes en la sangre también están presentes en saliva, pero su concentración en este fluido biológico es 1000 veces menor que en sangre [13]. Por esta razón se requiere el desarrollo de métodos altamente sensibles para este tipo de muestras.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva metodología rápida y robusta [15] para la determinación de compuestos endógenos polares (creatina, poliaminas y aminoácidos) en muestras de saliva. Siguiendo la modalidad de trabajo criba-confirmación, para la etapa de criba se utilizó un método no separativo utilizando el acoplamiento FIA-MS. Para la etapa de confirmación, se utilizó un método basado en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). En ambos casos, se empleó una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de triple cuadrupolo (QQQ). En ambos casos, la saliva se analizó tras una simple centrifugación y dilución 1:1 con agua UHQ (0.1% HFBA, v/v).

En ambas metodologías, FIA-MS y HPLC-MS, se mantuvo la columna cromatográfica en el sistema. En FIA-MS se utilizó una fase móvil con un fuerte poder de elución para evitar la retención de los analitos en la columna cromatográfica. Cuando se utilizó HPLC-MS se propuso un gradiente de solvente para obtener una separación cromatográfica adecuada (Figura 1). La ventaja de esta estrategia es que se puede cambiar fácilmente del análisis de la etapa de criba al paso de confirmación sin ninguna modificación en la configuración instrumental. Esto supone una reducción de costes ya que se puede emplear el mismo equipo para ambos análisis. El tiempo de análisis en el caso de la metodología no separativa FIA-MS era de menos de 1.5 min por muestra en comparación con los 16.5 min que requería la metodología HPLC-MS. Esta reducción del tiempo de análisis muestra la aplicabilidad de FIA-MS para la etapa de criba. Solo aquellas muestras que presenten concentraciones anómalas de los compuestos serían sometidas a la etapa de confirmación (cromatográfica) que requiere mayor tiempo.

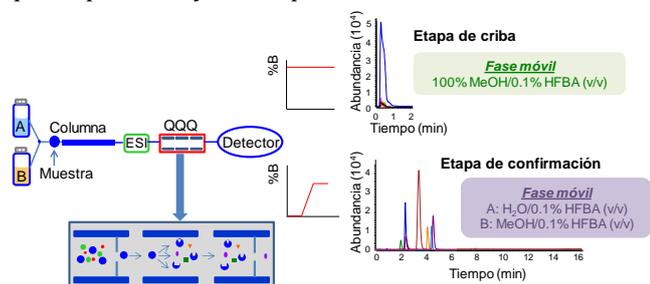


Figura 1. Esquema configuración instrumental utilizada, metodologías FIA-MS y HPLC-MS.

Las características analíticas de ambas metodologías fueron altamente satisfactorias, con límites de detección entre 2.17 y 46.1  $\mu\text{g/L}$  para la metodología FIA-MS y entre 1.22 y 18.2  $\mu\text{g/L}$  para HPLC-MS. La reproducibilidad fue inferior a 17% en ambos casos. Se analizaron muestras de saliva de sujetos aparentemente

sanos, obteniéndose resultados similares con las dos metodologías, demostrando su aplicabilidad en modo criba-confirmación.

Uno de los problemas asociados a la utilización de metodologías no separativas es la presencia de interferentes que pueden dificultar o incluso impedir la determinación de los compuestos de interés. En el caso de FIA-MS, la determinación de especies isobáricas es un reto al presentar idéntica composición química y, en muchas ocasiones, patrones de fragmentación similares. Además, puede darse el caso de que cuando se lleva a cabo el análisis de muestras complejas puedan existir otros componentes en la matriz que interfieran en el análisis.

Nuestro grupo de investigación ha propuesto un método para la determinación de los isómeros leucina e isoleucina/aloisoleucina en muestras de saliva mediante FIA-MS y la utilización de técnicas quimiométricas de calibración multivariante [16].

En un primer lugar se evaluaron los patrones de fragmentación de los compuestos a diferentes energías de colisión. El comportamiento de los tres analitos fue similar. Sin embargo, para la leucina se observó una relación m/z específica correspondiente a la 43 y en el caso de la isoleucina y la aloisoleucina se observó la relación m/z 69 como específica. En un principio, la existencia de relaciones m/z específicas nos permitiría la cuantificación directa de los analitos utilizando el modo monitorización de reacciones múltiples (MRM). Sin embargo, se observaron dos cosas:

- La isoleucina y la aloisoleucina compartían todos los iones.
- En el caso de la leucina, cuando se analizaron las muestras de saliva, apareció un compuesto interferente que compartía la transición específica observada para este compuesto, lo cual inhabilitaba su uso para el análisis no separativo.

Por ello, para llevar a cabo la cuantificación de estos compuestos mediante FIA-MS, se utilizó la calibración multivariante mediante mínimos cuadrados parciales utilizando 62 transiciones como variables. Se compararon los resultados obtenidos utilizando calibración univariante utilizando las transiciones específicas anteriormente descritas y calibración multivariante utilizando 62. Los resultados muestran una reducción de los errores de predicción en la etapa de validación externa cuando se usa los modelos multivariante, de manera especialmente significativa para el caso de la leucina. Esto muestra que es posible la cuantificación de este compuesto utilizando la metodología FIA-MS aún en ausencia de transiciones específicas.

Para el caso de la isoleucina y la aloisoleucina, no fue posible su cuantificación de forma individual. La

predicción de la suma es similar utilizando ambos modelos. Sin embargo, la utilización de los modelos multivariantes aumenta la fiabilidad de los resultados al tener en cuenta un mayor número de transiciones para llevar a cabo la cuantificación, además de tener en cuenta posibles interferencias por parte de la matriz.

### 3. Determinación de aminoácidos y poliaminas en muestras orina

La orina, al igual que la saliva, es un fluido biológico que se puede recolectar de forma rápida y sencilla utilizando métodos no invasivos. Sin embargo, la orina presenta una matriz más compleja con un mayor número de interferentes. Eso es debido a que la orina es un desecho biológico que contiene productos de degradación metabólica de una amplia gama de alimentos, bebidas, medicamentos, contaminantes ambientales, metabolitos de desecho endógenos y subproductos bacterianos [17]. Esta característica hace que su análisis sea más complicado.

De forma reciente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología rápida y fiable para la determinación de poliaminas y compuestos relacionados en muestras de orina [18]. Siguiendo la filosofía del trabajo anteriormente descrita, se evaluaron dos opciones para la etapa de criba: i) el uso del análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas (FIA-MS) y ii) la inclusión de una columna de protección (guard column, gC) en la configuración FIA-MS (gC-FIA-MS). Para la etapa de confirmación se optimizó un método basado en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). En todos los casos se empleó una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un triple cuadrupolo (QQQ) como analizador (Figura 2).

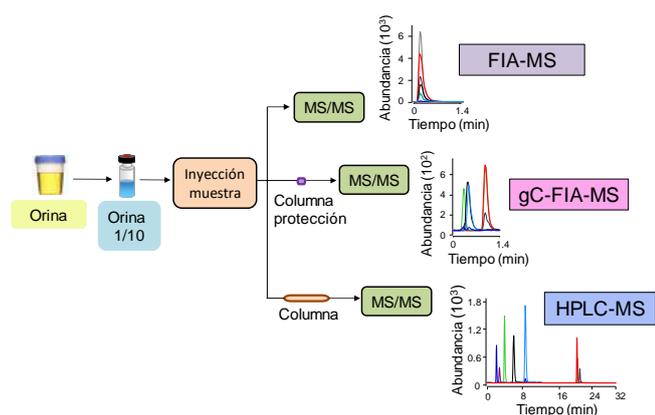


Figura 2. Esquema diagrama de trabajo utilizado FIA-MS, gC-FIA-MS y HPLC-MS.

Como se ha detallado en la introducción, uno de los principales problemas asociados a la metodología FIA-MS es la pérdida de sensibilidad en comparación con los métodos cromatográficos. Esto se debe a la supresión iónica que se produce en la fuente de ionización al introducirse el conjunto de la matriz sin separación en el espectrómetro de masas. El objetivo de la inclusión de la

columna de protección fue solucionar estos problemas de sensibilidad, mediante una separación de baja resolución de los componentes de la matriz de forma previa a la introducción al MS.

Se compararon los resultados obtenidos utilizando las configuraciones gC-FIA-MS y FIA-MS. La inclusión de una columna de protección en la configuración instrumental FIA-MS resultó en un incremento en las señales analíticas, pero sin un incremento en el tiempo de análisis (Figura 3). Estos resultados mostraron que la utilización de la columna de protección (gC) era lo más adecuado para la metodología utilizada en la etapa de criba en el análisis de poliaminas y compuestos relacionados en muestras de orina.

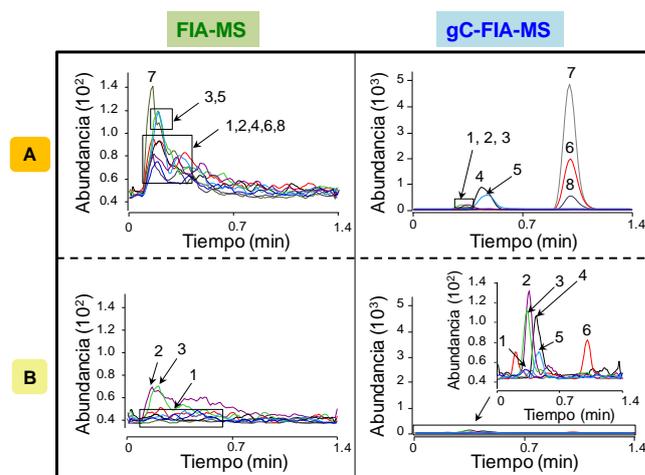


Figura 3. Comparación de señales obtenidas en (A) orina dopada (200 µg/L) y (B) orina natural utilizando FIA-MS y gC-FIA-MS.

Se evaluó la posible existencia de interferentes, es decir, compuestos presentes en la matriz con patrones de fragmentación similares a los compuestos objeto de estudio. De este estudio se observó que solo dos compuestos interferían realmente en el análisis: colina y N<sup>G</sup>N<sup>G</sup>-dimetilarginina, los cuales compartían transiciones con el ácido  $\gamma$ -aminobutírico y espermina, respectivamente. Para solucionar este problema, se decidió utilizar otras transiciones que no presentaban interferencia de los compuestos identificados.

Una vez seleccionado el método de criba más adecuado (gC-FIA-MS) y estudiados e identificados los posibles interferentes, se evaluaron las características analíticas de las metodologías de criba (gC-FIA-MS) y confirmación (HPLC-MS). Los resultados obtenidos con ambas metodologías fueron altamente satisfactorios. Se analizaron muestras de orina de sujetos aparentemente sanos utilizando ambas metodologías. Los resultados obtenidos con las dos metodologías fueron similares para la mayoría de las poliaminas.

Respecto a los tiempos de análisis, la utilización de gC-FIA-MS reduce considerable el tiempo de análisis por muestra (2.7 min) respecto al método cromatográfico

(33 min), lo que hace que gC-FIA-MS sea una metodología de cribado adecuada.

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos con los métodos desarrollados por nuestro grupo de investigación muestran la aplicabilidad de los mismos en el análisis clínico para la determinación de poliaminas y aminoácidos en muestras de orina y saliva. Estas metodologías, FIA-MS y gC-FIA-MS, podrían aplicarse como métodos de rutina en la modalidad de trabajo criba-confirmación para llevar a cabo un análisis rápido de dichos analitos, por lo que podrían considerarse como herramientas adicionales para el diagnóstico precoz de ciertas enfermedades.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación por parte del Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto: CTQ2017-87886-P/BQU) y a la Junta de Castilla y León (Proyecto: SA055P17 y SA111P20)

María Teresa Fernández del Campo García agradece a la Universidad de Salamanca por su beca predoctoral.

#### 6. Bibliografía

- [1] A.M. Casas Ferreira, M. del Nogal Sanchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Non-separative mass spectrometry method for non-invasive medical diagnostics based on volatile organic compounds: A review, *Anal. Chim. Acta* 1045 (2019) 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.005>
- [2] D. Michel, M.C. Gaunt, T. Arnason, A. El-Aneed Development and validation of fast and simple flow injection analysis-tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) for the determination of metformin in dog serum, *J. Pharm. Biom. Anal.* 107 (2015) 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.012>
- [3] S.C. Nanita, L.G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 23-33. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>
- [4] C. Bruno, D. Dufour-Rainfray, F. Patin, P. Vourc'h, D. Guilloteau, F. Maillot, F. Labarthe, M. Tardieu, C.R. Andres, P. Emond, H. Blasco, Validation of amino-acids measurement in dried blood spot by FIA-MS/MS for PKU management, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 1047-1050. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.008>
- [5] H. Jurdáková 1, R. Górová, G. Addová, A. Šalingová, I. Ostrovský, FIA-MS/MS determination of creatinine in urine samples undergoing butylation, *Anal. Biochem.* 549 (2018) 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.018>
- [6] B. Habchi, A. Kassouf, Y. Padellec, E. Rathahao-Paris, S. Alves, D. N. Rutledge, J. Maalouly, V. Ducruet, An untargeted evaluation of food contact materials by flow injection analysis-mass spectrometry (FIA-MS) combined with independent components analysis (ICA) *Anal. Chim. Acta.* 1022 (2018) 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.042>
- [7] H.Fr. Schröder, Polar organic pollutants from textile industries in the wastewater treatment process- biochemical and physicochemical elimination and degradation monitoring by LC-MS, FIA-MS and MS-MS, *Trends Analyt. Chem.* 15 (1996) 349-361. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(96\)00030-1](https://doi.org/10.1016/0165-9936(96)00030-1)
- [8] M. H. Park, K. Igarashi, Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases, *Biomol. Ther.* 21 (2013) 1-9. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.097>
- [9] U. Bachrach, Polyamines and cancer: Minireview article, *Amino Acids* 26 (2004) 307-309 <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0076-6>
- [10] M. Khuhawar, G. Qureshi, Polyamines as cancer markers: applicable separation methods, *J. Chromatogr. B* 764 (2001) 385-407. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00395-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00395-4) Get rights and content
- [11] U. Garg, M. Dasouki, Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. *Clin. Biochem.* 39 (2006) 315-332. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.12.009>
- [12] M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J.P. Steghens, A. Morla, D. Bouchu, ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1297-1311. <https://doi.org/10.1002/rcm.1054>
- [13] H. Elmongy, M. Abdel-Rehim, Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review, *Trends Anal. Chem.*, 83 (2016) 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.010>
- [14] T. Pfafe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, C. Punyadeera Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications, *Clinical Chemistry* 57 (2011) 675-687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
- [15] M.T. Fernández del Campo García, A.M. Casas Ferreira, E. Rodríguez Gonzalo, B. Moreno Cordero, J.L. Pérez Pavón, Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system, *J. Chromatogr. A.* 1590 (2019) 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.001>
- [16] A.M. Casas Ferreira, M. del Nogal Sánchez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Determination of leucine and isoleucine/allo-isoleucine by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and partial least square regression: Application to saliva samples, *Talanta.* (2020) 120811. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120811>
- [17] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A. C. Guo, M. R. Wilson, C. Knox, T. C. Bjorn Dahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z. T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F. S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D. S. Wishart, The Human Urine Metabolome, *PLoS One* 8(9): e73076 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- [18] M.T. Fernández del Campo García, A.M. Casas Ferreira, E. Rodríguez Gonzalo, B. Moreno Cordero, J. L. Pérez Pavón, Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis, *Microchem. J.* 158 (2020) 105223. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105223>