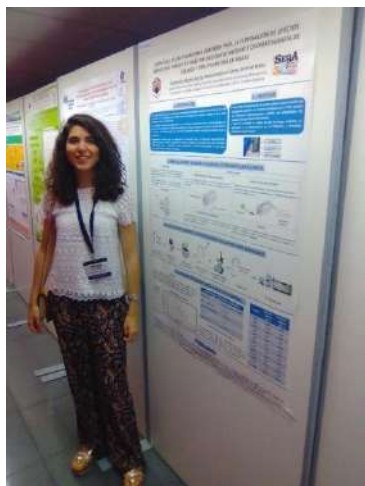


DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA UNIVERSAL PARA LA ELIMINACIÓN DE EFECTOS MATRIZ EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Encarnación Romera-García, Noelia Caballero-Casero, Soledad Rubio

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Química Fina y Nanoquímica. Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, 14071, Córdoba. e-mail: q02rogae@uco.es



Introducción

Uno de los principales retos de la aplicación de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas (LC-MS) en bioanálisis, especialmente cuando se utilizan fuentes de electrospray (ESI), es la eliminación de los efectos matriz producidos por sustancias endógenas tales como fosfolípidos y proteínas. Dado que la composición de las matrices biológicas es compleja y variable, y además los componentes de interés se encuentran a muy baja concentración, se requieren procedimientos efectivos de limpieza de muestra para alcanzar la sensibilidad y selectividad demandada [1].

La eliminación de proteínas mediante precipitación (PPT) o exclusión en materiales de acceso restringido (RAM) está bien establecida en bioanálisis. Sin embargo, dado el carácter anfílico de los fosfolípidos, ninguno de los tratamientos generalmente aplicados a muestras biológicas (ej. extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida) son eficaces en su eliminación [1].

Los fosfolípidos se acumulan en la superficie de las gotas de electrospray y originan la supresión de la ionización en LC-ESI-MS de los analitos con los que co-eluyen debido a que inhiben la liberación de éstos a la fase gaseosa [2].

Asimismo, se adsorben fuertemente a la fase estacionaria de LC y producen cambios en los tiempos de retención de los analitos, incrementos en la línea de base del cromatograma y curvas de calibración divergentes [3].

La estrategia más utilizada en la actualidad para la reducción de los efectos matriz producidos por fosfolípidos es la combinación de PPT y SPE [4]. Existen en el mercado diferentes compañías que comercializan sistemas para tal fin (ej. Hybrid SPE™ de Sigma Aldrich, Ostro™ de Waters, Captiva™ ND de Agilent and Phree™ de Phenomenex). Los extractos producidos contienen menor cantidad de fosfolípidos que los obtenidos usando sólo PPT o SPE, pero en muchas aplicaciones, las recuperaciones alcanzadas para los analitos son muy bajas. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de plataformas de tratamiento de muestra, aplicables a todo tipo de matriz biológica, ya sea líquida (ej. orina, suero, saliva, fluido cerebroespinal y leche materna) o sólida (ej. pelo y uña) que eliminen eficazmente los efectos matriz en LC-ESI-MS/MS y extraigan cuantitativamente los analitos.

Los resultados que aquí se presentan forman parte de una investigación más amplia, actualmente en desarrollo por el grupo de investigación *Química Analítica Supramolecular*, que trata de dar respuesta a esta demanda mediante el uso de disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM) [5].

Eliminación de efectos matriz en bioanálisis utilizando SUPRAS-RAM volátiles

Los SUPRAS son líquidos nanoestructurados obtenidos a partir de disoluciones coloidales de sustancias anfílicas mediante fenómenos espontáneos de autoensamblaje y coacervación [6]. Su excepcional eficacia para la extracción de compuestos orgánicos en un amplio intervalo de polaridad deriva de los mecanismos mixtos de interacción que ofrecen (presentan microambientes polares y no polares), y la elevada cantidad de centros enlazantes que contienen (la concentración de tensioactivo en el SUPRAS es del orden de mg/μL). Como resultado, los SUPRAS son idóneos para el desarrollo de plataformas aplicables a un amplio intervalo de analitos (ej. para la evaluación de la exposición humana al efecto combinado de compuestos químicos en estudios epidemiológicos).

Una de las características más interesantes de los SUPRAS es que su composición, estructura y propiedades pueden diseñarse para que cumplan funciones específicas. Las nanoestructuras que conforman los SUPRAS son lábiles y reversibles, ya que las moléculas anfílicas están unidas mediante enlaces no covalentes, y esta característica ofrece la oportunidad de diseñar disolventes *a la carta*

mediante la modificación de las condiciones ambientales en las que se produce la coacervación.

Para que un SUPRAS sea aplicable al desarrollo de plataformas universales dirigidas a la eliminación del efecto matriz en bioanálisis, éste debe presentar elevada capacidad de extracción para un amplio tipo de compuestos y eliminar eficazmente los macrocomponentes de la matriz (ej. proteínas, fosfolípidos y polisacáridos).

La eliminación de proteínas, y en su caso polisacáridos, puede realizarse fácilmente con el uso de SUPRAS-RAM [5]. Se trata de SUPRAS producidos a partir de ácidos carboxílicos o alcoholes alquílicos en un medio de THF-agua. Las moléculas anfífilas forman en el SUPRAS agregados hexagonales inversos que contienen cavidades acuosas delimitadas por los grupos polares del tensioactivo, mientras las cadenas hidrocarbonadas están disueltas en THF (Fig. 1A-C). Mediante la selección del porcentaje de THF y agua utilizado en el proceso de coacervación puede modificarse la composición del SUPRAS, en términos de proporción relativa de tensioactivo, THF y agua, así como los tamaños de las gotas de coacervado (Fig. 1D-F) y las cavidades acuosas. Esto permite el diseño de SUPRAS con cavidades acuosas lo suficientemente pequeñas para disolver moléculas polares e iónicas de bajo peso molecular y excluir macromoléculas polares tales como los polisacáridos (Fig. 1G). Por otro lado, las proteínas flocculan en el medio de extracción debido a la disminución de la constante dieléctrica en presencia de THF y la formación de complejos con el tensioactivo que forma parte del SUPRAS (Fig. 1G y 1H). En esta precipitación se eliminan parte de los fosfolípidos presentes en la muestra, sin embargo, una gran fracción de los mismos se extrae en el SUPRAS mediante la formación de agregados mixtos.

Los fosfolípidos presentes en las matrices biológicas son fundamentalmente glicerofosfolípidos (ej. fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) y esfingolípidos. Su concentración varía ampliamente entre individuos y el tiempo de recogida de la muestra. Una estrategia eficaz para la completa eliminación de los mismos es el uso de SUPRAS-RAM constituidos por compuestos anfífilos volátiles [7]. Para ello, el extracto del SUPRAS-RAM que contiene el compuesto anfífilo, los analitos y los fosfolípidos, entre otros componentes minoritarios de la matriz, se evapora a sequedad. Los analitos se extraen a partir del residuo, integrado fundamentalmente por fosfolípidos, mediante extracción con un volumen pequeño de disolvente, en el que presentan elevada solubilidad, utilizando tiempos de extracción muy cortos. La solubilización preferencial de los analitos en el disolvente en relación a los fosfolípidos se basa en la diferente velocidad de extracción; los componentes de la matriz difunden más lentamente al disolvente que los analitos [8].

La Figura 2 muestra un protocolo general para la eliminación de efectos matriz en fluidos biológicos utilizando SUPRAS-RAM volátiles y la Figura 3 muestra la efectividad de este protocolo para la eliminación de fosfolípidos en muestras de orina [7].

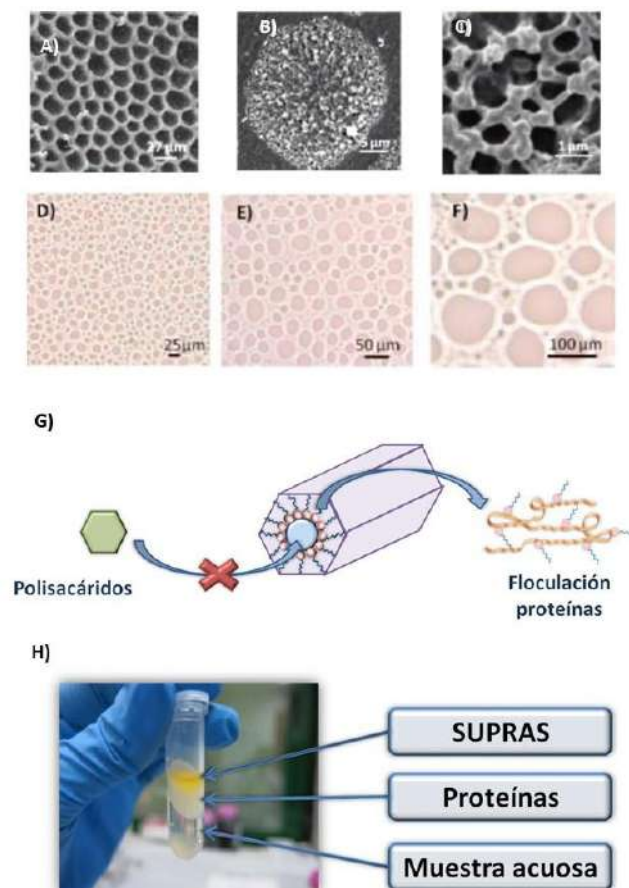


Figura 1. (A-C) Microfotografías obtenidas mediante crio-SEM para (A) un SUPRAS constituido por decanol-THF-agua; (B) una de las gotitas que lo conforman y (C) la estructura de la superficie de la gotita. (D-F) Microfotografías obtenidas mediante microscopía óptica de las gotitas que forman el SUPRAS, sintetizadas a partir de diferentes porcentajes de tetrahydrofurano: (D) 20%, (E) 50% y (F) 60%. (G) Esquema del mecanismo físico y químico de exclusión de polisacáridos y proteínas por el SUPRAS. (H) Fotografía de la extracción de bisfenoles en orina por un SUPRAS-RAM.



Figura 2. Protocolo general para la eliminación de efectos matriz en el análisis de fluidos biológicos mediante LC-ESI-MS/MS.

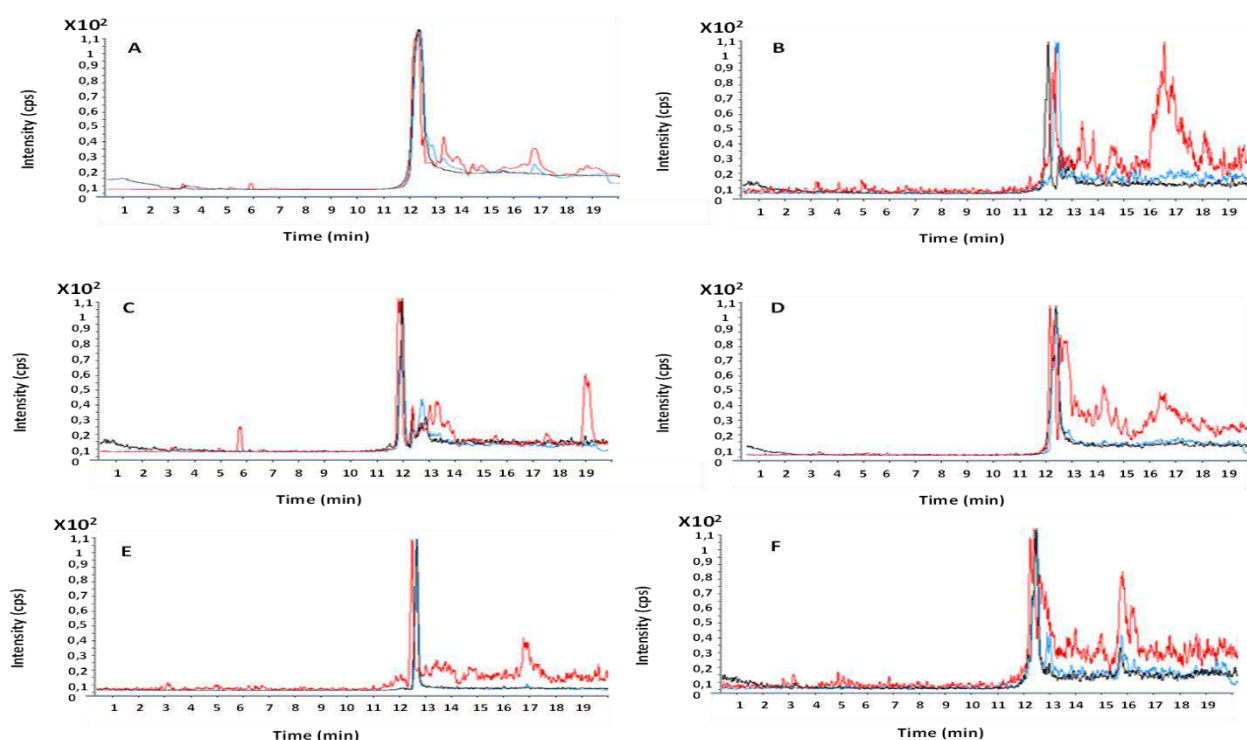


Figura 3. (A) Cromatogramas obtenidos a partir de la extracción de orina con SUPRAS-RAM volátiles (A: modo barrido, B-F: modo SIM) y analizados sin (rojo) y con (azul) evaporación del extracto, mediante LC-ESI-MS/MS. Los cromatogramas en color negro corresponden a metanol puro. Los valores de m/z (A= 430-850; B=790.5; C=520.3; D=703.5; E=735.6; F=718.5) corresponden a fosfolípidos que pertenecen a las clases: B: fosfatidilcolina; C: Lisofosfatidilcolina; D-E: esfingomielina; F: fosfatidiletanolamina [7].

Hasta la fecha, la estrategia descrita se ha utilizado para la determinación de bisfenol A (BPA) en orina [7] y la determinación de 13 bisfenoles y derivados en saliva, que constituyen las investigaciones objeto del estudio aquí presentado.

Los bisfenoles (BPs) son alteradores endocrinos utilizados, entre otras aplicaciones, en la síntesis de policarbonatos y resinas epoxi que son el material base para la fabricación de envases alimentarios. Los bisfenoles pueden migrar desde el envase hasta el alimento y generalmente constituye la principal fuente de exposición para humanos.

En la Figura 4 se muestra el cromatograma de iones totales obtenido mediante LC-ESI-MS/MS para el análisis de diferentes bisfenoles (BPA, BPB, BPE, BPF, BPP, BPS, BPZ, BPAF y BPAP) y derivados clorados de BPA (MCBPA, DCPBA, TCBPA y TeCBPA) en muestras de saliva fortificada (5 µg/L). El método analítico desarrollado permite la determinación de todos los bisfenoles y derivados, con recuperaciones comprendidas en el intervalo 83-105% y desviaciones estándar relativas comprendidas entre el 2 y el 10%. Los límites de detección están comprendidos en el intervalo 4-32 ng/L.

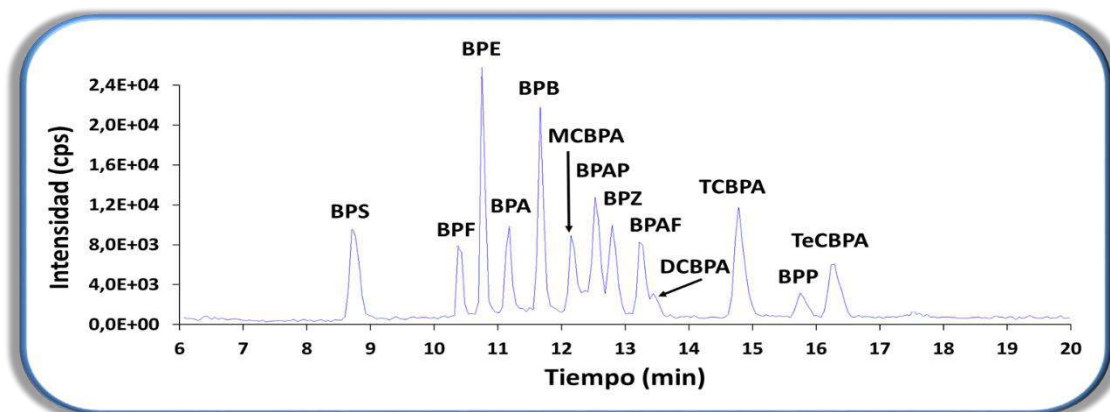


Figura 4. Cromatograma de iones totales obtenido mediante LC-ESI-MS/MS para el análisis de una muestra de saliva fortificada con 5 µg/L de bisfenoles y derivados después de extracción con un SUPRA-RAM volátil de hexanol-THF-agua.

El método se ha aplicado a la determinación de la concentración de bisfenoles y derivados en saliva de 11 individuos sanos (fumadores y no fumadores) antes y después de la ingesta de comida enlatada. En la Tabla 1 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para uno de los individuos participante en el estudio.

Investigaciones actuales en nuestro laboratorio están demostrando que esta estrategia es válida para el análisis de drogas en una amplia variedad de matrices (ej. orina, suero, saliva, sudor, leche materna, pelo y uñas), con lo que su potencial para el desarrollo de una plataforma genérica de eliminación del efecto matriz en bioanálisis usando LC-ESI-MS/MS es muy prometedor.

Tabla 1. Concentración de bisfenoles y derivados hallados en el análisis de saliva, antes y después de la ingesta de alimentos enlatados.

Analito	[BPs] pre-ingesta (µg·L ⁻¹)	[BPs] pos-ingesta (µg·L ⁻¹)
BPA	0,36	0,91
BPB	<LOQ	0,02
BPE	<LOQ	0,03
BPF	0,63	0,85
BPP	<LOQ	0,06
BPS	0,02	0,05
BPZ	0,01	0,05
BPAF	<LOQ	0,03
BPAP	<LOQ	0,04
MCBPA	0,02	0,12
DCBPA	<LOQ	0,02
TCBPA	<LOQ	0,01
TeCBPA	<LOQ	0,02

Referencias

- [1] C. Bylda, R. Thiele, U. Koblkd, D.A. Volmer. Recent advances in sample in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, 2014, 139, 2265-2276.
- [2] F. Janusch, L. Kalthoff, G. Hamscher, S.A.I. Mohring, Evaluation and subsequent minimization of matrix effects caused by phospholipids in LC-MS analysis of biological samples, *Bioanalysis*, 2013, 5, 2101-2114.
- [3] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, 877, 2198-2207.
- [4] S. Ahmad, H. Kalra, A. Gupta, B. Raut, A. Hussain, M.A. Rahman, HybridSPE: a novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS *Bioanalysis*, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2012, 4, 267-275.
- [5] A. Ballesteros-Gomez, S. Rubio, Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants, *Anal. Chem.* 2012, 84, 342-349.
- [6] A. Ballesteros-Gomez, S. Rubio, D. Perez-Bendito, Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 530-539.
- [7] J.A. Salatti-Dorado, N. Caballero-Casero, M.D. Sicilia, M.L. Lunar, S. Rubio. The use of a restricted access volatile supramolecular solvent for the LC/MS-MS assay of bisphenol A in urine with a significant reduction of phospholipid-based matrix effects. *Anal. Chim. Acta*, 2017, 950, 71-79.
- [8] A.F. Aubry, LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1819-1825.