

PRECONCENTRACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA A LA ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Fernando Benavente, Laura Pont, Estela Giménez, José Barbosa y Victoria Sanz-Nebot

Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica, Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA-UB), Universidad de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 3ª Planta, 08028 Barcelona

E-mail: fbenavente@ub.edu, www.ub.edu/bioanalisi

1. Introducción

Los factores más importantes a tener en cuenta cuando se desarrollan nuevas técnicas y métodos de separación son la simplificación, rapidez y coste de los análisis, la reducción de la cantidad de reactivos y muestra necesarias, la mejora de la selectividad, eficacia y resolución de las separaciones, la disminución de los límites de detección y la reproducibilidad de los resultados. En este contexto han ido madurando en los últimos tiempos las técnicas microseparativas, implementándose en microchips o dispositivos microfluídicos o en tubos y columnas capilares [1–6]. Estas técnicas de separación en microescala tienen un gran potencial, porque permiten cumplir prácticamente con todos los requisitos anteriormente indicados. Sin embargo, a menudo los límites de detección (LODs) en unidades de concentración no son lo suficientemente bajos debido a los pequeños volúmenes de muestra necesarios para los análisis con estas técnicas [7–11]. Esto, unido a la siempre cuestionada reproducibilidad, han sido los principales impedimentos para se apliquen ampliamente a muestras complejas reales.

La electroforesis capilar (CE) es hoy en día una técnica que se emplea de manera generalizada, en sus diferentes modos, para la separación de todo tipo de moléculas con diferentes tamaños, cargadas y neutras [6]. Se han descrito diferentes estrategias para la mejora de la sensibilidad en CE sin recurrir a los métodos tradicionalmente empleados de purificación y preconcentración *off-line* (p.ej. evaporación, liofilización, filtración con filtros de corte por peso molecular, extracción líquido-líquido o en fase sólida, etc.). Los desarrollos encaminados al uso de detectores más selectivos y sensibles (p. ej. electroquímicos, de fluorescencia, o de espectrometría de masas) permiten disminuir hasta cierto punto los LODs [12]. Sin embargo, a menudo esta mejora no es suficiente para la detección de los analitos de interés y por ello se han descrito diferentes métodos para su purificación y preconcentración en línea (*on-line*) a la CE [7–11]. Estos métodos *on-line* se pueden clasificar en métodos electroforéticos y cromatográficos. Los métodos electroforéticos aprovechan las propiedades fisicoquímicas del electrolito de separación, de los compuestos a determinar y de los que están presentes en la matriz de la muestra, así como la posibilidad de aplicar voltaje, para enfocar (*focusing*) o apilar (*stacking*) selectivamente los analitos de interés presentes en un gran volumen de muestra [11]. Aunque la disminución de los LODs puede ser espectacular en aplicaciones concretas, ésta depende en gran medida de las particularidades de la aplicación y del volumen total de muestra introducido, que en general no puede sobrepasar el volumen total del capilar de separación. Además, en muchas ocasiones estas mejoras se consiguen a expensas de disminuir

la resolución en las separaciones, ya que gran parte del capilar se ocupa con la muestra. La extracción en fase sólida acoplada en línea a la electroforesis capilar (SPE-CE), que agruparía los métodos cromatográficos *on-line*, no presenta estos inconvenientes [7–9]. En *on-line* SPE-CE [8], también denominada *in-line* SPE-CE por otros autores [9], se inserta cerca de la entrada del capilar de separación un microcartucho de extracción o preconcentrador (Figura 1). El preconcentrador contiene un sorbente adecuado para la retención selectiva del analito de interés, lo que permite introducir grandes volúmenes de muestra.

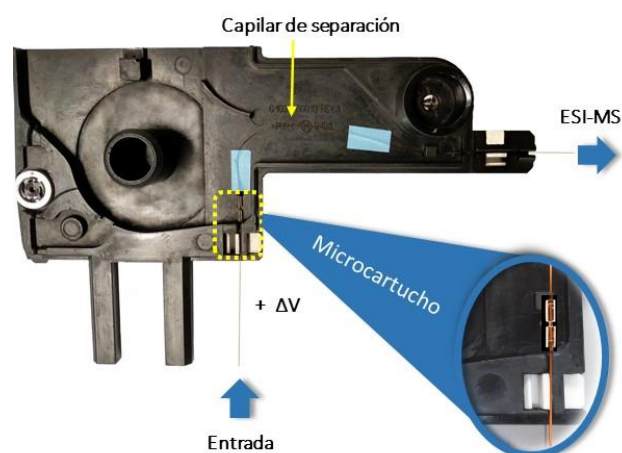


Figura 1: Esquema de un capilar de SPE-CE con un microcartucho o preconcentrador, ya instalado en un cartucho o casete para su utilización en un instrumento de CE comercial.

Tras lavar adecuadamente para eliminar otros compuestos que podrían interferir posteriormente, las moléculas de analito retenidas se eluyen en un volumen más pequeño con una disolución adecuada. Esto resulta en la purificación y preconcentración del analito, antes de la separación electroforética y la detección. Los factores de preconcentración conseguidos se pueden aún mejorar cuando la composición del eluyente y del electrolito de separación permite simultáneamente la preconcentración electroforética [13]. Es importante destacar que, en la configuración más sencilla para SPE-CE [8], la muestra se introduce en la misma dirección en la que posteriormente se producen los lavados y la separación, lo que evita la utilización de válvulas y permite automatizar todo el procedimiento sin necesidad de modificar el instrumento comercial. El principal inconveniente de esta configuración es que el capilar de separación puede contaminarse irreversiblemente durante la carga de la muestra si la matriz es muy compleja y que el tiempo necesario para

introducir un volumen determinado de muestra por presión suele ser más largo, ya que depende de la longitud total y del diámetro interno del capilar. Se han descrito otros diseños con configuraciones en forma de “t” o “z” para solventar estos inconvenientes [7]. Sin embargo, éstos implican el uso de válvulas y dispositivos microfluídicos a modo de preconcentrador [2,7,10].

A la hora de obtener los mejores resultados, es sin duda fundamental la selección del sorbente para la extracción, así como la optimización sistemática y cuidadosa de las condiciones experimentales. Entre los sorbentes más utilizados, destacan los sorbentes cromatográficos convencionales (p.ej. C18, C8, balance hidrofílico-lipofílico (HLB) o intercambio iónico) [8,9], pero también se pueden emplear sorbentes más selectivos (p.ej. con anticuerpos [14,15], con metales inmovilizados [16], de carburo de silicio (SiC) [17], a base de polímeros de impresión molecular (MIPs) [18], con aptámeros [19], etc). Los únicos requerimientos indispensables de los sorbentes son que sus características físicas (especialmente el tamaño de partícula y de poro del soporte donde se inmoviliza el ligando de afinidad), así como las condiciones para la retención/elución de los compuestos de interés, se puedan compatibilizar con la separación electroforética y la detección. Esto es especialmente delicado cuando se utiliza la detección en línea por espectrometría de masas (SPE-CE-MS), que requiere de electrolitos de separación y eluentes volátiles para una sensibilidad adecuada [8,14–18]. La posibilidad de identificar y caracterizar inequívocamente la estructura de los compuestos analizados a concentraciones muy bajas aumenta enormemente el potencial de la SPE-CE. En los últimos años hemos demostrado ampliamente que es posible emplear la SPE-CE-MS con todo tipo de sorbentes para mejorar los LODs en el análisis de diferentes tipos de compuestos en muestras biológicas complejas (p.ej. péptidos [8,13,14], proteínas [15], microRNAs [17], metabolitos [20] y alcaloides [21]). En este artículo se describe el método de SPE-CE-MS que empleamos como referencia para la rápida y sencilla familiarización de los investigadores que se incorporan en nuestro grupo, o los visitantes de otros grupos con los que hemos colaborado a lo largo de estos años [8]. El método tiene una amplia aplicabilidad, ya que se emplea un sorbente C18 para la purificación, preconcentración, separación y caracterización de neuropéptidos en fluidos biológicos [13,22–24], que también hemos comprobado que permite analizar con pequeñas variaciones otros compuestos de bajo peso molecular [20,21].

2. Construcción de un microcartucho de extracción C18 para SPE-CE.

Existen diferentes diseños para construir el microcartucho de extracción en la entrada del capilar de separación, que están en cierta medida relacionados con las características físicas del sorbente a emplear. Cuando se utilizan sorbentes cromatográficos convencionales particulados, como el C18 que se puede encontrar en los típicos cartuchos para SPE *off-line*, se preparan microcartuchos empaquetados [8]. En general, estas partículas C18 tienen tamaños de entre aprox. 50 y 100 μm por lo que, si se emplean para la separación capilares de sílice fundida de 50 o 75 μm de diámetro interno (id), es necesario emplear fritas para mantener las partículas de sorbente en el interior del microcartucho. Una alternativa

sencilla para evitar el uso de fritas es tamizar el sorbente [25]. Si se emplea un tamiz de 230 *mesh* (63 μm), es posible empaquetar fácilmente en el microcartucho las partículas tamizadas (> 63 μm) si se utilizan capilares de separación de 50 μm id. Sin embargo, nosotros preferimos empaquetar el sorbente sin tamizar porque las partículas más pequeñas permiten aumentar la superficie activa disponible para la extracción, y se evitan los inconvenientes de utilizar capilares de 50 μm id si la introducción de la muestra se realiza por presión (tiempos más largos para un cierto volumen) o la posterior separación (mayor contrapresión).

A continuación, se describe la construcción de un microcartucho C18 con dos fritas (Figura 2), que debe supervisarse con una lupa binocular. El procedimiento se describe con mucho más detalle en una de nuestras publicaciones [8], que incluye además consejos útiles para solventar los problemas más comunes.

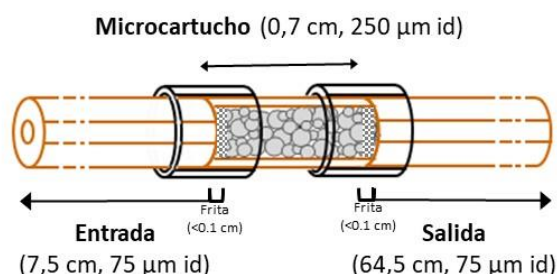


Figura 2: Esquema de un microcartucho con dos fritas en la entrada de un capilar para SPE-CE.

- Se activa el capilar de separación (sílice fundida, 72 cm longitud total (LT) \times 75 μm id \times 360 μm diámetro externo (od)). Esta LT es la que típicamente se utiliza para SPE-CE-MS porque permite trabajar con comodidad con el acoplamiento CE-MS, pero pueden prepararse capilares de otras longitudes para SPE-CE-MS o SPE-CE-UV. Si se utilizan capilares recubiertos permanentemente, se ha de preparar el capilar recubierto primero, después cortar y adaptar la activación.
- La activación consiste en lavar sucesivamente a 930 mbar con 1 M NaOH (20 min), agua (15 min) y electrolito de separación. Se completa el proceso aplicando durante 15 min el voltaje de separación (20 kV, polaridad normal, cátodo a la salida del capilar). El capilar de separación se corta en dos fragmentos de 7,5 y 64,5 cm LT.
- Se corta un fragmento de capilar para emplearlo como microcartucho (sílice fundida, 0,7 cm LT \times 250 μm id \times 360 μm od).
- Se conecta el fragmento de 7,5 cm a un trozo de tubo de plástico. Todas las conexiones se realizan con tubo de plástico Tygon® de bomba peristáltica (250 μm id, código naranja-azul). Se empuja el capilar hasta que se encuentre dentro del tubo (0,25 cm). Se corta el tubo con un bisturí para obtener un conector de 0,5 cm.
- Por otro lado, se corta con un bisturí en fragmentos pequeños (aprox. 50 μm) uno de los filtros de polietileno del cartucho original de SPE (cartucho C18 Sep-pak®, Waters, Milford, MA, USA). Se introduce uno de estos fragmentos a modo de frita en uno de los extremos del capilar a emplear como microcartucho. Este extremo con la frita se conecta al fragmento de 7.5 cm que ya tiene el conector.

• Se rellena el microcartucho con partículas de sorbente C18 aplicando vacío desde el extremo del fragmento de 7,5 cm. Una vez lleno, en el extremo de salida se introduce la segunda frita de polietileno. Se conecta este extremo con el fragmento de 64,5 cm del capilar de separación empleando otro conector de plástico. Se comprueba haciendo pasar agua que el capilar de SPE-CE no se encuentra obstruido. Después se instala en el típico casete de plástico que se utiliza en los instrumentos comerciales para CE-MS. Ya en el instrumento, se lava con BGE y se comprueba que al aplicar el voltaje de separación circula la intensidad de corriente esperada.

3. Método para el análisis de neuropéptidos por C18-SPE-CE-MS.

A continuación, se describe un método para el análisis de neuropéptidos mediante C18-SPE-CE-MS. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que tal y como se describe, o con pequeñas variaciones, permite obtener excelentes resultados tanto para los neuropéptidos [8,13,22,23], como para otros compuestos de bajo peso molecular, tales como metabolitos [20] y alcaloides [21]. Los mejores resultados en cuanto a la purificación, factor de preconcentración, separación y detección se consiguen después de optimizar cuidadosamente y llegar al mejor de los compromisos entre la duración de las diferentes etapas del método de análisis y la composición de las disoluciones empleadas (p.ej. matriz de muestra, disoluciones de lavado, BGE o eluyente). Sin embargo, tampoco hay que olvidar la selección del voltaje y los parámetros del espectrómetro de masas más adecuados, para una correcta separación y detección. El método optimizado para los neuropéptidos consiste en las siguientes etapas (Figura 3):

- Se acondiciona el capilar de SPE-CE-MS lavando a 930 mbar con agua (1 min), metanol (1 min), agua (1 min), y BGE (3 min, 50 mM ácido acético (HAc) y 50 mM ácido fórmico (HFor), pH 3,5, ajustado con amoníaco).
- Se introduce la muestra de neuropéptidos a 930 mbar (10 min) (patrones o muestras de plasma pretratadas).
- Se lava a 930 mbar con BGE (2 min), para eliminar las sustancias que no han quedado retenidas y llenar el capilar antes de la separación electroforética.
- Para desorber los neuropéptidos, se inyecta a 50 mbar el eluyente (10 s, 60:40 v/v metanol:agua con 50 mM HAc y 50 mM HFor).
- Se aplica el voltaje de separación (20 kV), con un vial en la entrada del capilar y la salida correctamente instalada en la interfase de líquido auxiliar coaxial para CE-MS.
- Se lava a 930 mbar con acetonitrilo (2 min) para prevenir la contaminación cruzada entre análisis consecutivos.

Para el análisis de muestras de plasma es necesario un pretratamiento de las muestras para evitar la saturación de la pequeña cantidad de sorbente del microcartucho. Este pretratamiento está basado en una precipitación de las proteínas con acetonitrilo (1:6 v/v plasma:acetonitrilo) seguido de una filtración con filtros de centrifuga que cortan a un peso molecular de 10 kDa. Todos los detalles sobre este pretratamiento de muestra se pueden encontrar en nuestros trabajos previos [23,24].

Aplicando esta metodología, el capilar de SPE-CE-MS se puede reutilizar alrededor de 20 análisis con patrones y 10 análisis con muestras [22,23]. Si se observa inestabilidad o caídas de corriente, deterioro de las separaciones o disminución de las recuperaciones, se ha de sustituir por uno nuevo.

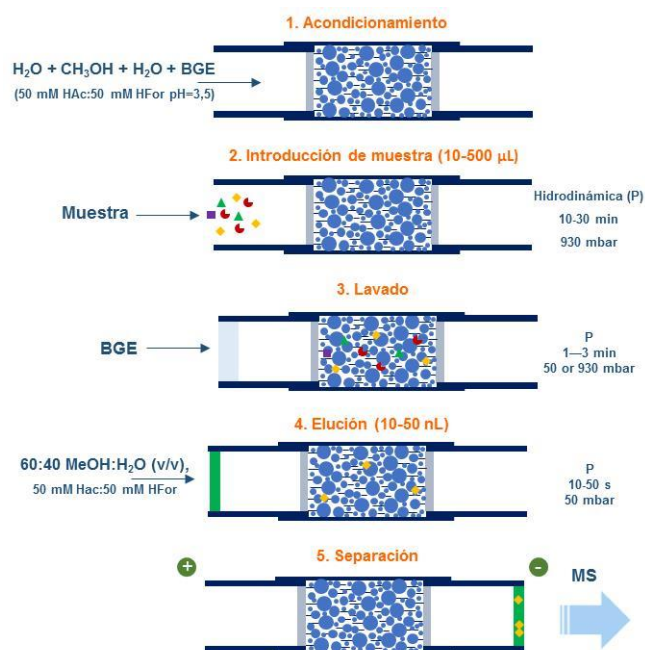


Figura 3: Esquema de un método típico para el análisis de neuropéptidos por C18-SPE-CE-MS. Los volúmenes se estiman calculando con la ecuación de Hagen-Poiseuille [8].

4. Resultados para el análisis de neuropéptidos por C18-SPE-CE-MS.

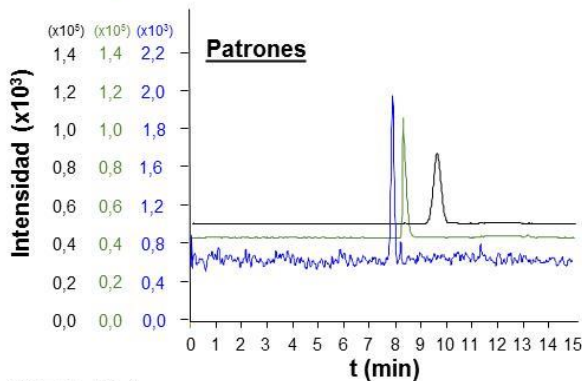
La Figura 4-i muestra los electroferogramas extraídos de iones (EIEs) obtenidos por C18-SPE-CE-MS, con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) de alta resolución y masa exacta, para una mezcla de tres neuropéptidos (1 ng·mL⁻¹): Metionina encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, 573,23 Da, Met), Endomorfina 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 610,29 Da, End) y Dinorfina A (1-7) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 867,47 Da, DynA). Mediante SPE-CE-MS, los tres neuropéptidos pueden detectarse hasta 0,1 ng·mL⁻¹ en patrones, lo que implica mejoras de los LODs de 5000 veces respecto a CE-MS (0,5 µg·mL⁻¹). En muestras de plasma fortificadas, los LODs son 10 veces superiores (1 ng·mL⁻¹), debido a la complejidad de la matriz del plasma, la limitada selectividad del sorbente C18 y las recuperaciones en el pretratamiento de la muestra.

La Figura 4-ii muestra los EIEs para la Met en una muestra de plasma fortificada a 1 ng·mL⁻¹ y un blanco. Como puede observarse son también numerosos los componentes de la matriz de la muestra que pueden detectarse. Con muestras tan complejas y sorbentes tan poco selectivos, es muy importante utilizar una detección que permita una identificación fiable de los analitos de interés, como en este caso la MS de alta resolución y masa exacta (ver el detalle de la distribución isotópica en el espectro de masas de la Met en la Figura 4-ii).

Todos los parámetros de calidad del método para patrones y plasma se recopilan en nuestros trabajos previos [13,22-24]. En uno de estos trabajos se demuestra que realizando algunos

cambios en el método es posible mejorar los LODs para estos neuropéptidos en patrones y plasma combinando C18-SPE-CE-MS y preconcentración electroforética por isotacoforesis transitoria [13]. Sin embargo, la preconcentración adicional mediante este mecanismo electroforético se consigue a base de perder resolución. En otro estudio, se ha confirmado con una metodología de C18-SPE-CE-MS similar, que los LODs para este tipo de neuropéptidos se pueden mejorar aún más empleando una interfase de nanoelectrospray de CE-MS sin líquido auxiliar coaxial [26].

i) EIEs Dyn A, End y Met



ii) EIEs Met

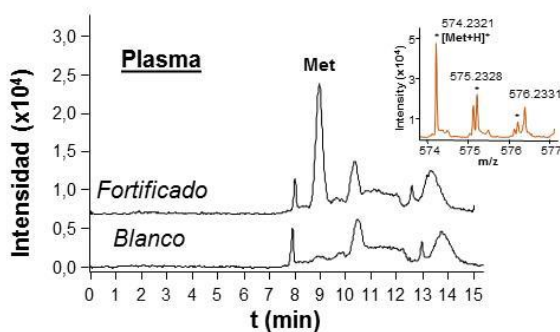


Figura 4: EIEs de los neuropéptidos por C18-SPE-CE-MS en i) patrones de $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ii) plasma fortificado con Met ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y sin fortificar seguido del pretratamiento de muestra. Se incluye el espectro de masas de alta resolución y masa exacta de la Met.

El método de C18-SPE-CE-MS con pequeñas modificaciones se ha aplicado también con éxito para realizar estudios metabolómicos con muestras de plasma sobre el inicio y la progresión de la enfermedad neurodegenerativa de Huntington en modelos murinos [20], así como para la purificación y preconcentración de alcaloides β -carbonílicos que se pueden encontrar a muy bajas concentraciones en algas wakame [21]. De la misma manera, se puede adaptar para el análisis de otros compuestos de bajo peso molecular en todo tipo de matrices complejas.

Agradecimientos

Esta investigación del grupo Bioanálisis se ha financiado a través del Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2014-56777-R y programa FPU de becas predoctorales) y la cátedra UB Rector Francisco Buscarons Úbeda (Química e Ingeniería Química Forense).

Referencias

- [1] Whitesides, G. M., *Nature* 2006, 442, 368–373.
- [2] Olanrewaju, A., Beaugrand, M., Yafia, M., Juncker, D., *Lab Chip* 2018, 18, 2323–2347.
- [3] Nazario, C. E. D., Silva, M. R., Franco, M. S., Lanças, F. M., *J. Chromatogr. A* 2015, 1421, 18–37.
- [4] Šesták, J., Moravcová, D., Kahle, V., *J. Chromatogr. A* 2015, 1421, 2–17.
- [5] Fanali, S., *Electrophoresis* 2017, 38, 1822–1829.
- [6] Liu, Y., Wang, W., Jia, M., Liu, R., Liu, Q., Xiao, H., Li, J., Xue, Y., Wang, Y., Yan, C., *Electrophoresis* 2018, 39, 8–33.
- [7] Guzman, N. A., Guzman, D. E., *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016, 1021, 14–29.
- [8] Benavente, F., Medina-casanellas, S., Giménez, E., Sanz-nebot, V., *Methods Mol. Biol.* 2016, 1466, 67–84.
- [9] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2016, 37, 35–44.
- [10] Sonker, M., Sahore, V., Wooley, A. T., *Anal. Chim. Acta* 2017, 986, 1–11.
- [11] Breadmore, M. C., Wuethrich, A., Li, F., Phung, S. C., Kalsoom, U., Cabot, J. M., Tehranirokh, M., Shallan, A. I., Abdul Keyon, A. S., See, H. H., Dawod, M., Quirino, J. P., *Electrophoresis* 2018, DOI 10.1002/elps.201800384.
- [12] Stolz, A., Jooß, K., Höcker, O., Römer, J., Schlecht, J., Neusüß, C., *Electrophoresis* 2018, 1–53.
- [13] Medina-Casanellas, S., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2011, 32, 1750–1759.
- [14] Medina-casanellas, S., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2012, 717, 134–142.
- [15] Peró-Gascón, R., Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2016, 37, 1220–1231.
- [16] Ortiz-Martin, L., Benavente, F., Medina-Casanellas, S., Giménez, E., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2015, 36, 962–970.
- [17] Pero-Gascon, R., Sanz-Nebot, V., Berezovski, M. V., Benavente, F., *Anal. Chem.* 2018, 90, 6618–6625.
- [18] Moreno-González, D., Lara, F. J., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., *J. Chromatogr. A* 2014, 1360, 1–8.
- [19] Marechal, A., Jarrosson, F., Randon, J., Dugas, V., Demesmay, C., *J. Chromatogr. A* 2015, 1406, 109–117.
- [20] Pont, L., Benavente, F., Jaumot, J., Tauler, R., Alberch, J., Ginés, S., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2016, 37, 795–808.
- [21] Tascon, M., Gagliardi, L. G., Benavente, F., *Anal. Chim. Acta* 2017, 954, 60–67.
- [22] Hernández, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 3957–3965.
- [23] Hernández, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2008, 29, 3366–3376.
- [24] Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 3896–3902.
- [25] Medina-Casanellas, S., Tak, Y. H., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Sastre Toraño, J., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2014, 35, 2996–3002.
- [26] Medina-Casanellas, S., Domínguez-Vega, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *J. Chromatogr. A* 2014, 1328, 1–6.