



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCIÓN ACOPLADO A MASAS (HPLC-MS) COMO  
HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
PROTEÍNAS”**

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ATZIYERI VILLEGAS RENTERÍA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres**

**VOCAL:**               **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Luis Tonatihut Sánchez Linares**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Laura Carmona Salazar**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Lab 114, Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: SOBEIDA SANCHEZ NIETO

\_\_\_\_\_

SUSTENTANTE: ATZIYERI VILLEGAS RENTERÍA

\_\_\_\_\_



## ÍNDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
<u>1. Importancia de la identificación de proteínas</u>	
<u>2. Proteómica e identificación de proteínas</u>	
<u>3. Cromatografía líquida</u>	
<u>4. Principios de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC</u>	
<u>5. Espectrometría de masas</u>	
<u>6. Identificación de proteínas por MS</u>	
DISCUSION	
CONCLUSIONES	
REFERENCIAS	



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Niveles de estructuración de las proteínas.	4
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del proceso que siguen las muestras biológicas para el análisis proteómico.	9
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del proceso que siguen las muestras biológicas para el análisis en el equipo después del análisis proteómico.	11
<b>Figura 4.</b> Cromatograma que muestra los parámetros cromatográficos de un registro típico de la elución.	17
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas que ejemplifican los parámetros de eficiencia y resolución de picos de una mezcla.	19
<b>Figura 6.</b> Típica curva de VanDeemter.	21
<b>Figura 7.</b> Partes que componen un sistema de HPLC.	25
<b>Figura 8.</b> Orden de elución de moléculas de acuerdo a su polaridad en la HPLC. <b>A</b> Fase normal y <b>B.</b> Fase Reversa.	27
<b>Figura 9.</b> Cromatograma, diferencia entre detector UV-VIS (lado izquierdo), contra el detector de masas (lado derecho).	32
<b>Figura 10.</b> Ionización ESI (a) y MALDI (b).	37
<b>Figura 11.</b> Comparación de los espectros obtenidos por ESI y MALDI de una proteína de 38 kDa. <b>a)</b> Espectro ESI; <b>b)</b> Espectro resuelto del espectro en a y <b>c)</b> Espectro MALDI.	39
<b>Figura 12.</b> Esquema de un equipo QTOF.	44
<b>Figura 13.</b> Esquema de un cuadrupolo.	45



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales diferencias entre el tratamiento y detección de las muestras por HPLC.	<b>24</b>
<b>Tabla 2.</b> Características de detectores para cromatografía de líquidos.	<b>30</b>



## ABREVIATURAS

<b>AEPT:</b>	Altura equivalente a un plato teórico.
<b>BTEX:</b>	Acrónimo para hacer referencia a: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y xileno.
<b>Da:</b>	Dalton.
<b>DAD:</b>	Detector de arreglo de diodos.
<b>DART:</b>	Ionización por análisis directo en tiempo real.
<b>EI:</b>	Impacto electrónico.
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.
<b>ESI:</b>	Ionización por electrospray.
<b>FAB:</b>	Bombardeo con átomos acelerados.
<b>Fg:</b>	Fentogramos.
<b>FID:</b>	Detector de ionización de flama.
<b>GC:</b>	Cromatografía de gases.
<b>HED:</b>	Dínodo de alta energía.
<b>HPLC:</b>	High-performance liquid chromatography.
<b>kDa:</b>	kiloDalton
<b>KV:</b>	kilovoltios
<b>LC/MS:</b>	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.
<b>LC:</b>	Cromatografía líquida.
<b>LDI:</b>	Ionización por desorción láser.
<b>MALDI:</b>	Ionización por desorción láser asistida por una matriz.
<b>mAU:</b>	Miliunidades de absorbancia.
<b>ME:</b>	Multiplicador de electrones.
<b>MS:</b>	Espectrometría de masa.
<b>MSD:</b>	Detector por espectrometría de masas.
<b>nm:</b>	Nanómetros.
<b>PAH:</b>	Polycyclicaromatichydrocarbons.
<b>PCI:</b>	Fuente de ionización química.
<b>pH:</b>	Potencial de hidrógeno.
<b>pI:</b>	Punto isoeléctrico
<b>Q1, Q2, Q3:</b>	Cuadropolo 1, 2 o 3.
<b>SELDI:</b>	Ionización por láser inducida en superficie.
<b>THF:</b>	Tetrahidrofurano.
<b>TOF MS:</b>	Time-of-flight mass spectrometry.
<b>UMA:</b>	Unidad de masa atómica.
<b>UPLC:</b>	Ultra performance liquid chromatography
<b>UV:</b>	ultravioleta



## RESUMEN

La identificación de proteínas es un campo de alta demanda debido a que aunque la obtención de los genomas de varios organismos ya ha sido obtenida, aún se hace necesario responder cuestiones como son la identificación de los genes que codifican a proteínas de interés, saber si la secuencia de aminoácidos deducida a partir del genoma conduce a la actividad biológica predicha, conocer si la presencia de la proteína es la misma en cantidad y especie en diferentes condiciones fisiológicas o patológicas, describir si la posible presencia de modificaciones post-traduccionales tiene implicaciones sobre la regulación en la actividad biológica de la proteína para así tener un marco sobre la calidad en productos bioterapéuticos o nuevos biofármacos. Es por esto que ha habido un impulso profundo al avance en tecnologías para la identificación y análisis de proteínas.

La cromatografía de líquidos acoplada a la detección por espectrometría de masas es una tecnología que ha mejorado, que proporciona información sobre el peso molecular de la proteína y su abundancia relativa en la muestra analizada, que supera a otras técnicas, ya que permite el análisis de mezclas complejas de proteínas, debido a que con la cromatografía de líquidos se separan los componentes de la mezcla en base a sus características de hidropatía, lo que permite una previa separación y disminución de la complejidad de la muestra para posteriormente pasar al análisis por espectrometría de masas y así ayuda notoriamente a industrias como la biofarmacéutica.

En el presente texto se revisan los fundamentos de la técnica de cromatografía de líquidos con énfasis en la cromatografía de líquidos de alta resolución, así como una de las técnicas de detección de la separación cromatográfica, la espectrometría de masa y su aplicación en la detección de proteínas en mezclas complejas. Es una tecnología sensible, de alta precisión y robusta.





## INTRODUCCIÓN

### **1. Importancia de la identificación de proteínas.**

La secuenciación completa del genoma humano llevó a un gran interés en la comunidad científica en el manejo de técnicas de alta tecnología relacionadas con biología molecular y el análisis de datos. Pero a pesar de que ya se conoce el genoma no solo del humano (1) sino alrededor de 200 organismos más se desconoce cuántos de estos genes codifican para proteínas. Se estima que hay aproximadamente 20,000-25,000 genes que codifican para proteínas en el humano (2,3).

Además, se desconoce si una secuencia de nucleótidos dada en realidad está codificando para una proteína con la función asignada y para proteínas conocidas se desconoce su regulación y participación en los diferentes procesos fisiológicos y patológicos de un organismo. Por lo que la identificación de las proteínas así como su caracterización se hacen necesarias. La proteómica como se denomina a este campo de estudio es un campo de intensa investigación actualmente.

Antes de comenzar con las técnicas de separación e identificación de proteínas se revisará brevemente lo que son las características de las proteínas.

Las proteínas son moléculas complejas formadas por la unión de varios aminoácidos. Cada aminoácido consiste de un átomo de carbono central y quiral unido a un grupo amino, a un grupo carboxilo, a una cadena lateral y un hidrógeno. Hay 20 posibles diferentes aminoácidos en una proteína, cada uno de ellos con características de tamaño, carga e hidrofobicidad distinta. Estos aminoácidos se encuentran unidos por enlaces tipo amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, un tipo de enlace al que se hace referencia como "peptídico"; así entonces el polímero de aminoácidos es una

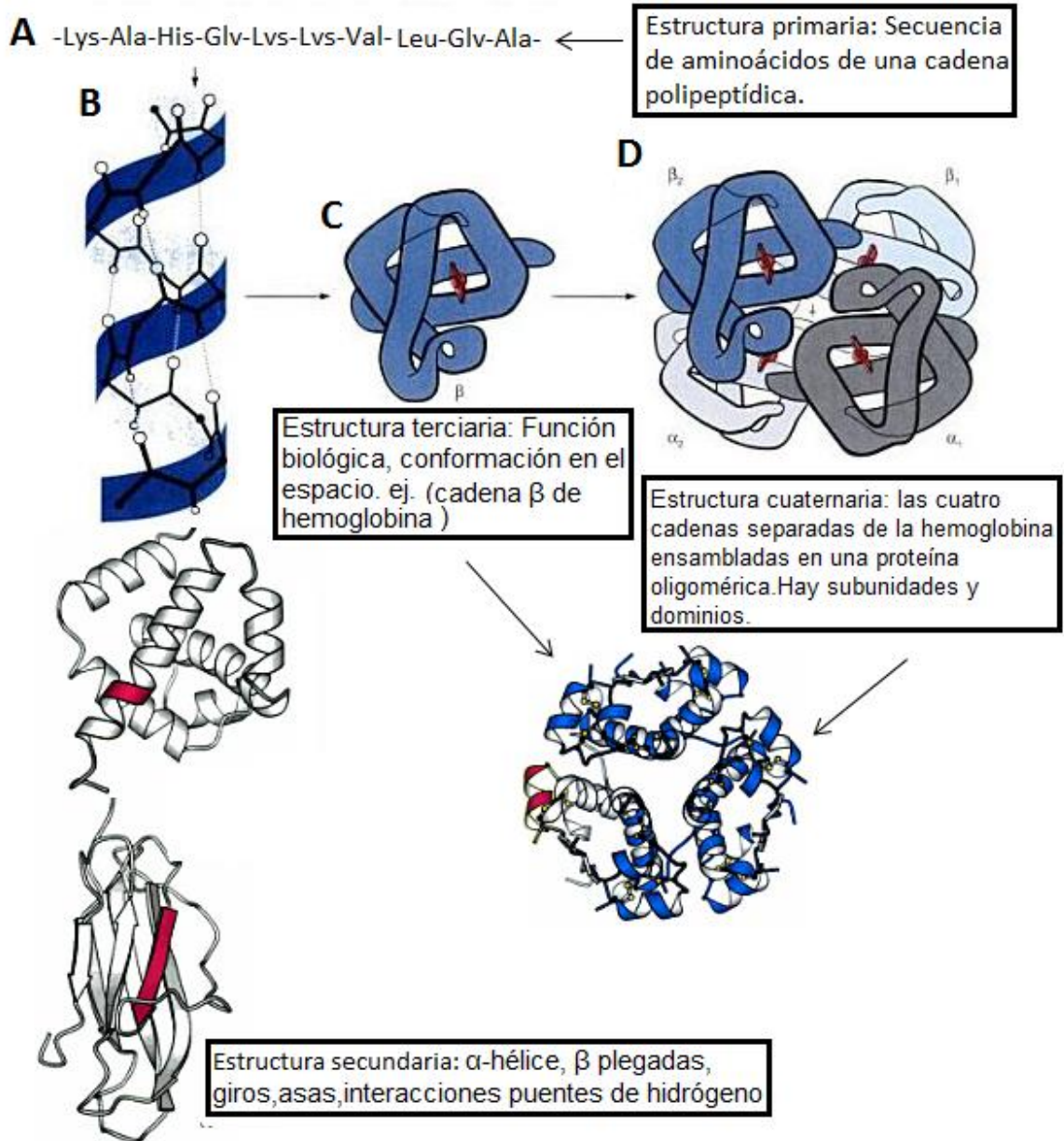


secuencia compleja que varía en composición, longitud y la posición de los aminoácido en el polímero, pero también este polímero presenta variaciones en su conformación en el espacio (4).

Existen 4 niveles de estructuración de las proteínas. La estructura primaria se refiere a la información de la secuencia de aminoácidos que hay en el polímero, así como la longitud que va a tener (Figura 1), es sumamente importante ya que es la base de cómo se conformará en el espacio. La estructura secundaria es el acomodo espacial del esqueleto, que se mantiene por puentes de hidrógeno y estabilizado por contactos de corto alcance en segmentos continuos de la cadena de aminoácidos, los dos tipos mayoritarios de estructura secundaria en las proteínas son los plegamientos de hojas  $\beta$  y las  $\alpha$  hélices, en el primer tipo la cadena polipeptídica está casi totalmente extendida y forma puentes de hidrógeno entre una o más hebras  $\beta$  y así formar hojas- $\beta$ , mientras que en el plegamiento de  $\alpha$ -hélice la proteína se enrosca en un apretado cilindro de dimensiones de 3.5 aminoácidos por vuelta, en promedio. Esta estructura también se caracteriza por asas y giros que ayudan al acomodo de la estructura primaria a través de interacciones no covalentes (5).

La estructura terciaria describe todo el plegamiento de la cadena polipeptídica y que en general, depende de los enlaces de hidrógeno, iónico, hidrofóbicos y puentes disulfuro. En las proteínas solubles en agua, los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran orientados preferentemente hacia el interior de la proteína, mientras que en la superficie se encuentran los aminoácidos hidrofílicos, caso contrario a las proteínas membranales. Lo más importante en la estructura terciaria es que la proteína tiene función biológica. Y finalmente, la estructura cuaternaria se refiere a la asociación específica de cadenas polipeptídicas para formar un complejo de múltiples subunidades y este tipo de estructuras llegan a tener dominios que son, a menudo, seleccionados evolutivamente porque poseen una función biológica; por ejemplo, "el domino de unión a calcio de calmodulina".

El dominio en una proteína se refiere a una combinación específica de elementos estructurales secundarios (como los hélice-giro-hélice) (4).



**Figura 1.** Niveles de estructuración de las proteínas. Tomado y adaptado de (6) y (7).



La forma más simple de la estructura cuaternaria es un homodímero, que consta de dos subunidades idénticas. Como se mencionó anteriormente existen proteínas que forman dominios siendo un dominio un subconjunto de la estructura terciaria. Puede aparecer en proteínas globulares o fibrosas y puede aparecer en polipéptidos que además adquieren luego estructura cuaternaria, pero no es requisito. Algunos ejemplos de proteínas con estructura cuaternaria son: mioglobina y hemoglobina (4).

Adicionalmente, las proteínas pueden contener modificaciones que le permiten comportarse de manera específica en un ambiente o condición fisiológica; o bien, estas modificaciones pueden tener implicaciones en la actividad de la proteína dependiendo de la función para la cual la proteína fue desarrollada, refiriéndonos en este caso a una proteína recombinante diseñada por ingeniería genética.

Así entonces, identificar una proteína es importante para disponer de información complementaria sobre su estructura y posteriormente con otro tipo de técnicas conocer su función biológica para realizar tratamientos en enfermedades (8).

Para el estudio de la abundancia o localización de las proteínas en situaciones de estrés, presencia de cáncer o en alguna otra condición fisiológica o metabólica se dispone de técnicas analíticas por ejemplo: electroforesis cuantitativa bidimensional (2DGE “two-dimensional gel electrophoresis”), ELISA (“*Enzyme linked immunoabsorbent assay*”), espectrometría de masas (MS), entre otras. Técnicas acopladas a diferentes tecnologías que pueden separar una cantidad abundante de componentes moleculares o son compatibles con protocolos a microescala o bien se llevan a cabo con procesos automatizados como las técnicas de cromatografía de gases o líquidos (9). El uso de estas últimas técnicas se ha incrementado en todo tipo de industrias, incluida la industria biofarmacéutica por sus ventajas y su especificidad de identificación por ejemplo, el método de ELISA que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado en fase sólida



mediante el uso de anticuerpos. Con esta técnica es posible analizar una cantidad importante de muestras a la vez, pero es necesaria la generación de anticuerpos de alta calidad para identificar de manera inequívoca y certera a las proteínas, lo que reduce sus aplicaciones. Se ha usado esta tecnología para la identificación de proteínas a través de la detección de péptidos derivados de una digestión de la muestra con tripsina, esto a través de utilizar una variante de la técnica de ELISA que se denomina *PeptidoMatrix* y que ha ayudado a diferenciar a células que expresan o no a ciertas proteínas (10,11). El identificar a una proteína en cierto sitio en una célula abre un campo de trabajo en investigación.

Con la técnica de 2DGE las proteínas son separadas electroforéticamente, primero en base a su punto isoeléctrico (pI) y posteriormente por peso molecular (PM); una vez visualizadas las proteínas con ésta técnica pueden ser sujetas o a un proceso más de separación, proteólisis o también pueden analizarse inmediatamente a través de MS. A pesar de su excelente resolución y de haber sido sujeta a varias mejoras, la 2DGE aún es una técnica poco reproducible, probablemente por los numerosos pasos en los que el operador interviene y porque, además, implica tiempos largos para la obtención del resultado. Asimismo, la 2DGE tiene limitantes como no resolver adecuadamente a proteínas muy pequeñas o muy grandes, así como tampoco a las muy hidrofóbicas o bien a las que presentan pI extremos (11,12).

En contraste, la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés "*high performance liquid chromatography*") acoplada a la técnica de MS, resulta más flexible ya que permite la combinación de diferentes técnicas de separación en donde las muestras pueden ser etiquetadas y modificadas antes, entre o después del paso de separación, además de que pueden ser programadas múltiples corridas de manera automática, con la ventaja de una resolución comparable a la técnica 2DGE (12).



En este trabajo se coloca a la cromatografía de líquidos y en particular a la cromatografía de líquidos de alta resolución como una técnica de elección para la separación de proteínas y como componente esencial para la identificación de proteínas en una muestra. El acoplamiento de ésta a otra técnica analítica muy sensible como la espectrometría de masas, (HPLC-MS) resultan en una herramienta útil no solo en laboratorios de investigación, sino también para el diagnóstico y evaluación de compuestos tóxicos o fármacos y otros compuestos de interés tecnológico.



## 2. Proteómica e identificación de proteínas

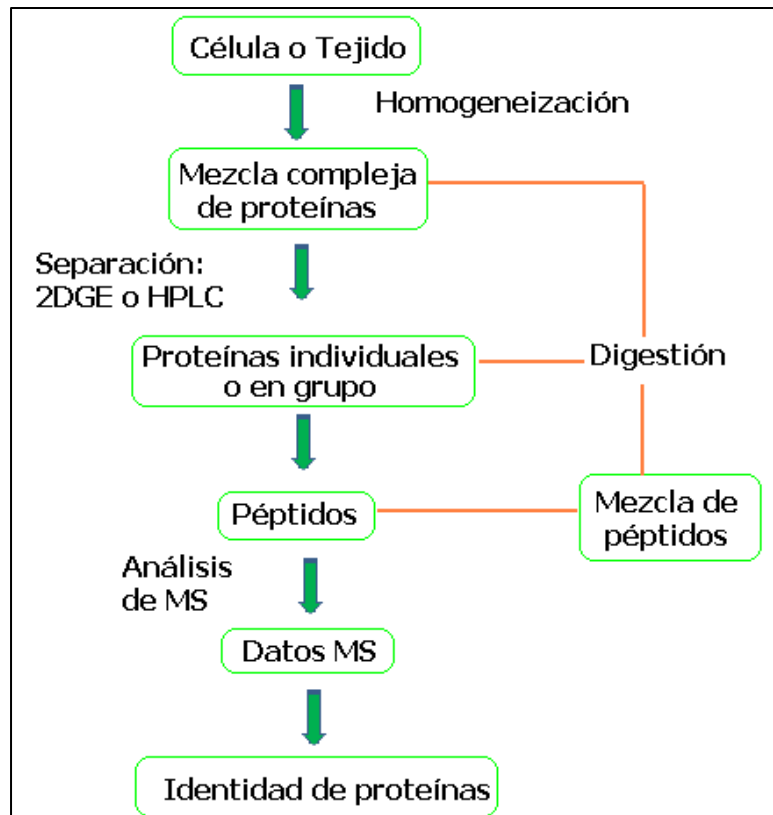
El término “Proteoma” fue usado por primera vez por Wilkins *et al.* (1996) para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en un momento dado. El Proteoma es un elemento altamente dinámico, cuyos componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimento subcelular, como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, señales bioquímicas o su estado fisiológico o patológico.

Actualmente la proteómica puede ser definida como la comparación cualitativa y cuantitativa de proteomas bajo diferentes condiciones para dilucidar un proceso biológico. Un proteoma puede consistir de más de  $10^6$  proteínas con concentraciones que varían por un factor de  $10^9$  dependiendo de la naturaleza de la muestra. Además, los proteomas son sistemas altamente dinámicos donde la síntesis, degradación y modificación cambian de manera constante en respuesta a estímulos tanto internos como externos.

La proteómica requiere de técnicas para la separación, detección y análisis de proteomas completos. La técnica de espectrometría de masas (MS) es utilizada en el estudio de proteomas para la identificación de proteínas como parte de la investigación bioquímica en la búsqueda de una proteína en particular o bien varias de ellas, debido a que esta técnica ofrece un amplio concepto para el trabajo continuo con un alto grado de certeza, identidad y detección en serie.

También, es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la biotecnología como método de control de calidad de la producción de proteínas recombinantes y otras macromoléculas (9,13) debido a que la técnica de HPLC-MS está abalada para mantener parámetros y límites que otorgan confiabilidad en los resultados y análisis.

Sin embargo, en ambos casos y como parte inherente del análisis MS, la preparación de la muestra previo a su introducción al equipo es de suma importancia ya que partimos de un tejido o cultivo celular que representan una mezcla compleja de analizar. Habitualmente la preparación de la muestra implica una digestión por proteólisis (Figura 2.), que generalmente se realiza usando a la enzima tripsina, la cual corta por el extremo carboxilo de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando se encuentra prolina como aminoácido subsecuente.



**Figura 2.** Representación esquemática del proceso que siguen las muestras biológicas para el análisis proteómico (6).

Además, como la MS proporciona el peso molecular de las proteínas que se ha seleccionado con la proteólisis en la preparación de la muestra, la técnica MS

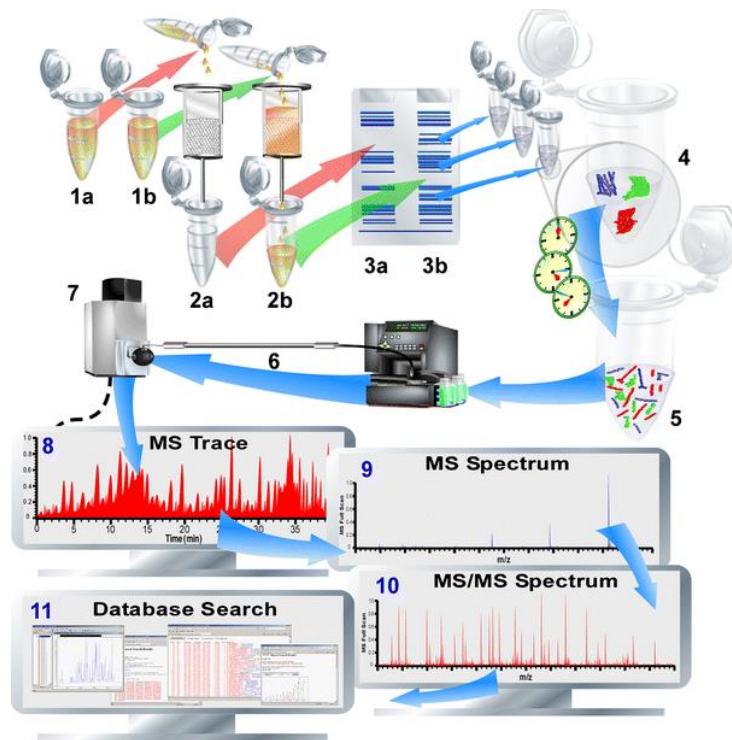




después de llevar a cabo la ionización selecciona específicamente a los compuestos con cierta carga y con cierto peso por eso es el método de elección para la detección y caracterización de modificaciones postraduccionales y con el potencial de identificar cualquier modificación covalente que altere la masa de la proteína, modificaciones que funcionan para regular la interacción proteína-proteína, la actividad y/o expresión de proteínas (9).

De manera común, previo a que se conociera esta técnica para el análisis de proteínas por MS se inició con la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE) que sigue siendo muy utilizada hasta la fecha, principalmente debido a su bajo costo y a la disponibilidad de los equipos en los laboratorios. Es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas (“spots”) en un único gel, mostrando un patrón característico. Otro de los métodos que se usan de manera común para la separación de proteínas de una mezcla es la técnica de HPLC, en las diferentes versiones de esta técnica. Ambas técnicas se describirán más adelante.

Posteriormente al fraccionamiento de la muestra proteica se realiza su identificación por espectrometría de masas (Figura 3 y 4). El proceso de identificación en resumen ocurre tras la separación de iones, el análisis y la detección para posteriormente a través del método *Peptide Mass Fingerprinting* en donde por coincidencia entre la base de datos que se encuentra en el espectrómetro con los péptidos identificados por la técnica de MS en la base de datos del software.



**Figura 3.** Representación esquemática del proceso que siguen las muestras biológicas para el análisis en el equipo después del análisis proteómico (34).

El fraccionamiento de proteínas es un punto clave en el proceso de identificación, ya que dependiendo de la separación, el número de péptidos producidos puede ser importante y su abundancia relativa determinará el que se tenga suficiente información para identificar a la proteína que se busca. La preparación de la muestra es crucial para la identificación de la proteína y, por tanto, hay que concentrar al analito y eliminar los compuestos que pueden causar iones de fondo. Así, el acoplamiento a otras técnicas que aclaren, concentren y separen a las distintas proteínas de la muestra se hace necesario.

Las dos técnicas que más se han usado para la separación de proteínas antes de realizar el análisis por MS son la electroforesis en 2 dimensiones y la cromatografía de líquidos.



Una de las técnicas más usadas para la separación de proteínas de una mezcla actualmente, es la técnica de electroforesis en gel y que se realiza en dos versiones, en una o en dos dimensiones. Su popularidad se debe a que es una técnica de uso rutinario para la separación y caracterización de proteínas de manera individual y que además en su versión en dos dimensiones presenta una alta resolución, con una capacidad de resolver hasta 5000 proteínas. Por otro lado resulta, ser una técnica barata (14).

En cuanto a la técnica, la versión de electroforesis en una dimensión separa a las proteínas en base en las diferencias de peso molecular. Mientras que en la versión de la electroforesis en dos dimensiones, clásica (método de O'Farrell), se realiza una primera separación de las proteínas debido a su punto isoeléctrico, y que en el caso de la tecnología desarrollada para el análisis de proteomas el gel presenta un gradiente inmovilizado de pH, después se separan a las proteínas en un segundo gel en base a su peso molecular (gel que contiene dodecil-sulfato de sodio).

Posteriormente, las bandas para el caso de la primera dimensión o los puntos o manchas para el caso de la 2DGE que son visibles en el gel después de su tinción (con azul de Coomassie, syroruby o con plata) son sometidos a una digestión con tripsina, los péptidos obtenidos son separados mediante HPLC o bien directamente analizados por espectrometría de masas (12, 15, 16).

Una parte importante de la identificación de proteínas mediante 2DGE-MS es que los puntos o manchas de proteína sean visibles después de que el gel sea teñido, para ser identificados subsecuentemente por MS. Por lo que no es el método de elección cuando se tienen proteínas con pobre representación en la muestra. Tal es el caso de, los factores de transcripción, que sin embargo tienen gran relevancia en la fisiología de la célula. Tampoco es conveniente cuando las



proteínas tienen pesos moleculares debajo de 12 a 14 kDa o por arriba de los 200 kDa, ya que los geles convencionales no resuelven las proteínas en estos rangos. La incompleta separación de las proteínas lleva a la superposición de puntos y subsecuentemente un problema en la identificación de proteínas. Además, las proteínas membranales y/o con puntos isoeléctricos extremos son pobremente ionizables en las condiciones en las que generalmente se realiza la ionización por electrospray (ESI o “*electrospray ionization*”) que más adelante se describirá, y que es el paso inicial para realizar el análisis por MS. Además, los detergentes utilizados en la purificación de las proteínas membranales interfieren con el proceso de ionización y análisis por ESI (17).

La otra técnica poderosa para la separación de proteínas previa al análisis por MS es la cromatografía de líquidos (LC), la LC-MS presenta una resolución de 5,000 a 10,000 proteínas (11) haciéndola una técnica muy competitiva ya que; mezclas complejas con cientos de proteínas pueden ser analizadas directamente con el uso de LC-ESI, aun cuando la concentración de diferentes proteínas varíen en órdenes de magnitud, además el paso por el sistema de cromatografía tiene la ventaja de reducir los contaminantes como detergentes o iones que suelen interferir con la detección por masas (18).

En un experimento típico por LC-MS/MS el analito se eluye de una columna en fase reversa en donde se separan los péptidos por hidrofobicidad, columna que evita las interacciones intramoleculares que bajo otras condiciones propiciarían la agregación o precipitación de las proteínas en la columna de HPLC (19). Una vez que la separación por HPLC ha tomado lugar se puede llevar a cabo el proceso de la detección por MS. El equipo de HPLC-MS, está acompañado por un software, una base de datos que ayuda al usuario a la identificación de los analitos, herramienta que ha sido un avance clave en la espectrometría de masas. Este software ayuda a identificar a la proteína con fragmentos de la misma; y en otros casos la proteína completa hablando de proteínas bien conocidas como la insulina por ejemplo.



La técnica de HPLC-MS en los últimos tiempos se ha utilizado más para realizar análisis de proteínas y ha tenido mucho éxito porque cuenta con una excelente resolución, mayor confiabilidad, especificidad, selectividad en la identificación de proteínas (11).

Para entender el funcionamiento de la técnica para la separación de proteínas por HPLC es necesario revisar primero los fundamentos de la cromatografía de líquidos.



### **3. Cromatografía líquida**

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido que puede ser gas, líquido, o fluido supercrítico, el cual arrastra a la muestra con un flujo constante y en condiciones de presión, proporcionado por la gravedad, en los sistemas menos sofisticados, o bien una bomba, hasta una columna donde se encuentra la fase estacionaria la que permite la separación de las moléculas en la muestra, con base en el coeficiente de partición de cada sustancia entre las dos fases. Las sustancias separadas eluyen gradualmente de la columna con la fase móvil y son registradas gracias a un detector (20).

En el caso particular de la cromatografía líquida (LC), la fase móvil es un líquido que fluye en una fase estacionaria fija, casi siempre sólida. El gran poder de la separación por cromatografía líquida radica en la combinación de una gran variedad de fases móviles con un amplio repertorio de fases estacionarias, lo que lleva a una mayor gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación e identificación de analitos. Adicionalmente, cuenta con una gran variedad de sistemas de detección (21).

Por lo anterior, se encuentran diferentes tipos de cromatografías líquidas que se pueden clasificar por la forma de la fase estacionaria, en las que se distinguen la cromatografía en columna, en capa fina y la capilar. Otra clasificación se basa en la dirección de la separación de las moléculas, así está la cromatografía ascendente, descendente o en cama plana. En la clasificación basada en la eficiencia de la separación se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC.

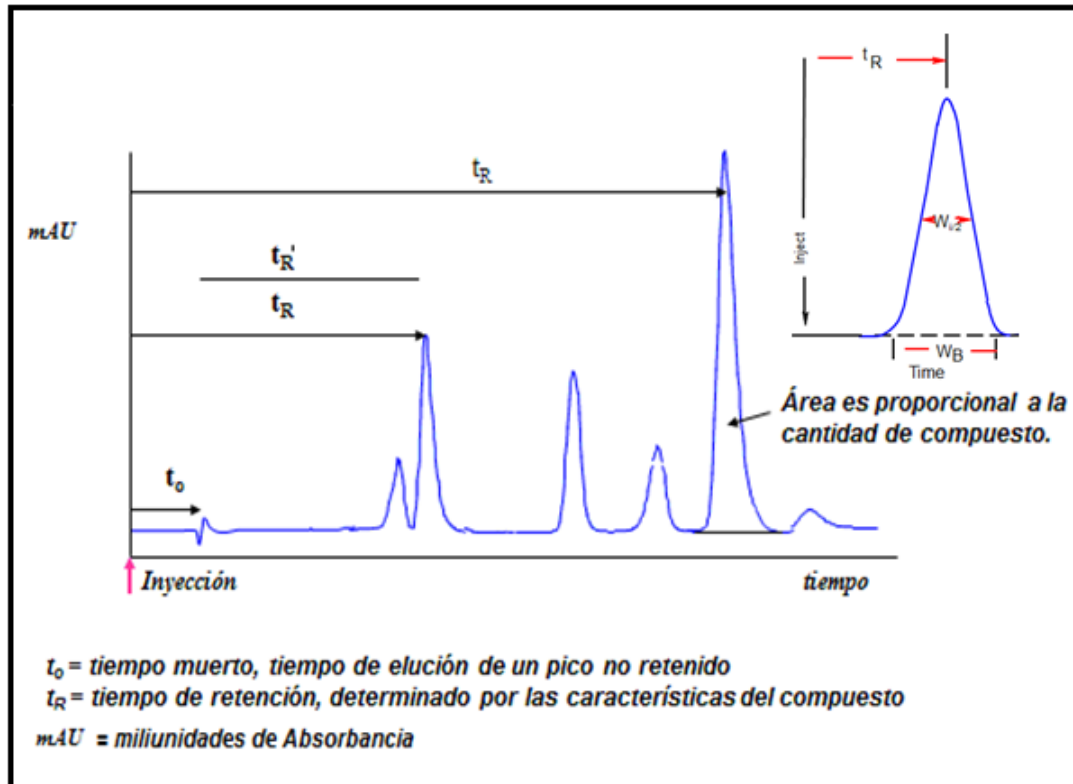


Una forma usual de nombrar a la cromatografía líquida es a través del tipo de interacción que establece con los solutos a separar, así se encuentran cuatro tipos en esta clasificación: cromatografía de intercambio iónico (separación por carga iónica), cromatografía por filtración en gel (separación por tamaño molecular), cromatografía fase reversa (separación de solutos apolares), cromatografía en fase normal (separación de solutos polares). Aunque también, hay otra cromatografía que se nombra por la especificidad de grupos como la cromatografía por afinidad.

La versatilidad de aplicaciones para lograr la separación efectiva de las moléculas hace de esta técnica sea ideal para los propósitos que se requieren en los objetivos de la proteómica como la investigación que es hoy en día tan indispensable con el incremento de enfermedades que está teniendo la población; en la industria para los biofármacos que se están utilizando en un amplio sector de salud.

### **Parámetros cromatográficos**

Durante el proceso de separación del o los analitos mediante cromatografía, este o estos tiene(n) que distribuirse entre dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. Dependiendo de su reparto entre las dos fases, ocurrirá la separación de los componentes de la mezcla. Para que la cromatografía sea efectiva, la separación debe ser buena, esto es que no sólo estén bien separados los analitos, sino que sea posible llevar a cabo su cuantificación a través de detección y la integración de los picos del cromatograma, es decir las áreas bajo la curva tipo gaussianas separadas, angostas y simétricas (Figura 4). A continuación, se describe que significan los valores o parámetros que se pueden obtener en un cromatograma típico y su interpretación.



**Figura 4.** Cromatograma que muestra los parámetros cromatográficos de un registro típico de la elución. Tomado y adaptado de (33).

**Tiempo de retención ( $t_R$ ).** Para un sistema en particular (fase móvil, columna, temperatura, etc.) es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico, es decir, es el tiempo que la muestra permanece retenida en el sistema. El tiempo de retención es característico de cada soluto en la mezcla analizada.

**Tiempo muerto ( $t_0$ ).** Es el tiempo requerido para eluir un pico no retenido en la columna, se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil o de un compuesto orgánico.

**Tiempo de retención ajustado ( $t_R'$ ).** Es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto ( $t_R' = t_R - t_0$ ), es una medida del tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.





**Número de platos teóricos (N).** El plato teórico es un modelo que supone que la columna cromatográfica contiene un número de capas separadas y que en cada capa hay un equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Entre mayor el número de capas o platos teóricos tiene una columna mayor eficiencia en la separación de los analitos, es decir la habilidad que la columna tiene para estrechar bandas de elución (Figura 5A). Su valor puede determinarse de la siguiente manera:

$$N = 16(t_R/W)^2 \quad \text{o} \quad N = 5.54(t_R/W_{1/2})^2$$

Donde:

$t_R$  = tiempo de retención

$W$  = ancho del pico en su base

$W_{1/2}$  = ancho del pico a la mitad de su altura

**Altura equivalente de un plato teórico o HETP (Height Equivalent to a Theoretical Plate).** Es la altura de un plato teórico y se calcula:

$$\text{HETP} = L / N$$

Donde:

$L$  = longitud de la columna

$N$  = Número de platos teóricos

**Resolución (R).** Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre las señales de dos compuestos adyacentes (Figura 5B). Una resolución  $> 1.5$  implica la separación completa de dos señales, se determina por:

$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{0.5 (W_1 + W_2)} \quad \text{o} \quad R = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{1.669 (W_{h^{1/2}1} + W_{h^{1/2}2})}$$

Donde:

$t_{R1}$  = tiempo de retención del compuesto 1

$t_{R2}$  = tiempo de retención del compuesto 2

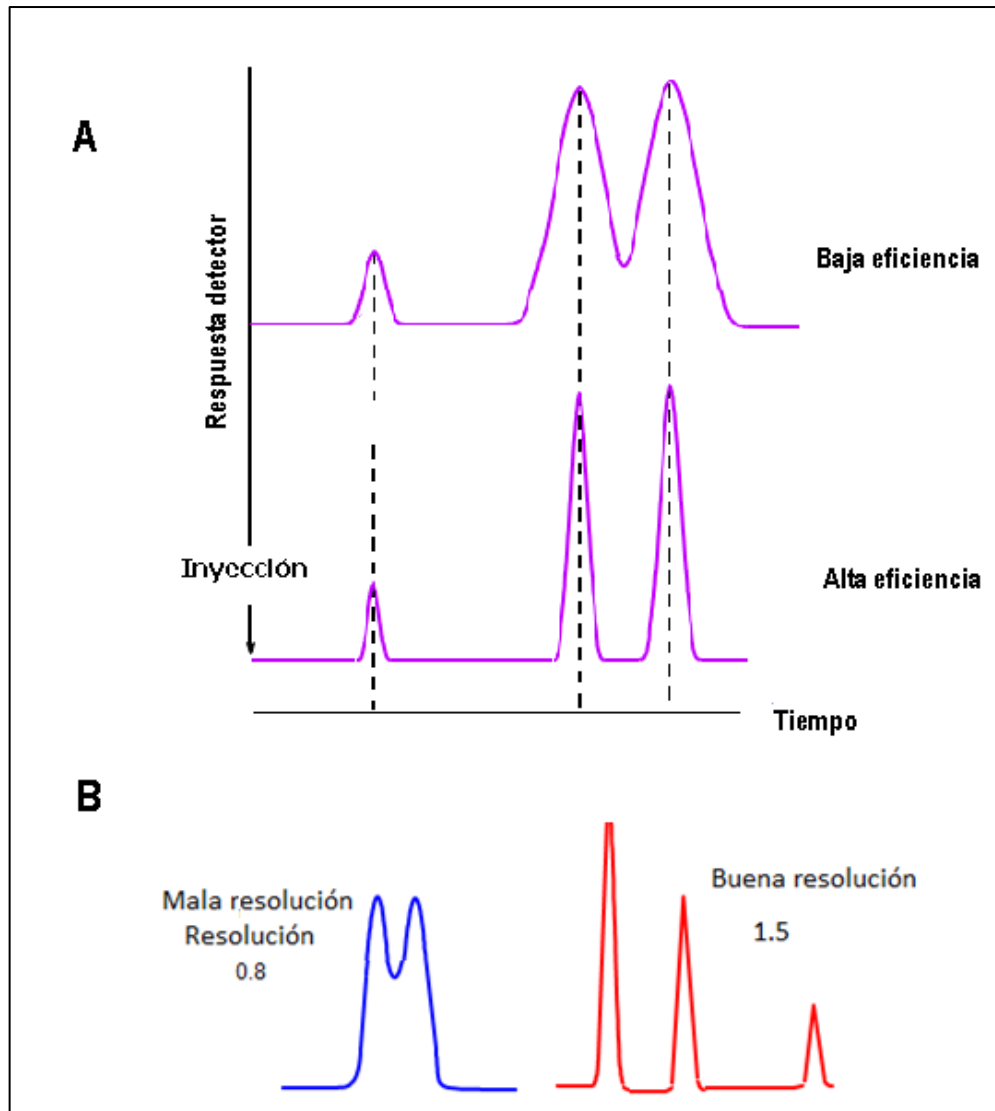
$W1$  = ancho del pico 1 en su base



$W_2 =$  ancho del pico 2 en su base

$Wh_{1/2_1} =$  ancho del pico 1 a la mitad de su altura

$Wh_{1/2_2} =$  ancho del pico 2 a la mitad de su altura



**Figura 5.** Cromatogramas que ejemplifican los parámetros de eficiencia y resolución de picos de una mezcla. A. Eficiencia y B. Resolución.



**Simetría del pico (S).** Es una medida de qué tan eficiente es la columna para originar señales simétricas y, por lo tanto, con menores errores en el proceso de integración. Valores cercanos a 1 implican señales con poco error de integración, se determina de acuerdo a:

$$S = B / A$$

Donde

B= Base a la mitad del pico

A= *Altura*

### **Factores que influyen la eficiencia de la columna cromatográfica.**

Una ecuación que describe el proceso de separación de los analitos en la columna cromatográfica es la de Van Deemter (Figura 6), la cual toma en cuenta el tiempo que le lleva al analito en equilibrarse entre la fase estacionaria y la móvil. Por lo que la forma de la banda es afectada por la velocidad de elución. Además, se afecta por las posibles vías que puede tomar el analito durante su paso entre las partículas de la fase estacionaria. Considerando los posibles mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de la banda se llega a la ecuación de Van Deemter (20, 22):

$$HETP = A + B / u + C u$$

Donde:

u= velocidad promedio de la fase móvil

A, B y C son factores que contribuyen a la anchura de la banda

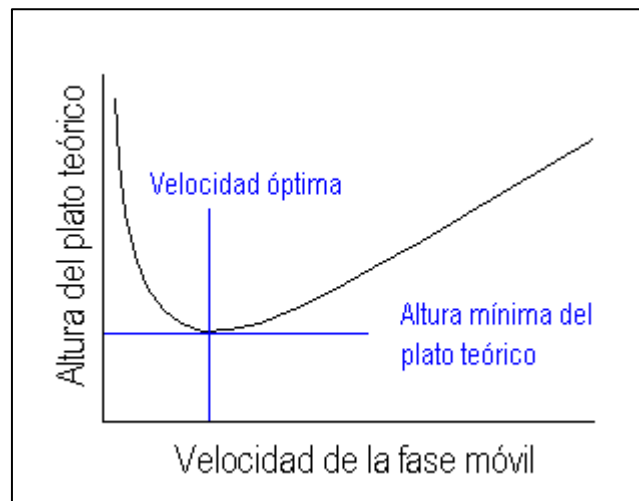
A= Difusión Eddy

B = Difusión longitudinal

C= Resistencia a la transferencia de masa

**A. Difusión de Eddy.** Se refiere a que el analito puede tomar múltiples caminos, a través de la fase estacionaria. Entre mayor sea este valor se obtendrá un aumento en la anchura de la banda debido al aumento en la altura del plato teórico. Al disminuir la fase estacionaria disminuye la difusión y por tanto aumenta la eficiencia.

- B. Difusión longitudinal.** Es una constante que describe la difusión longitudinal del analito. Cuando el analito toma mucho tiempo en la columna debido a que la velocidad de la fase móvil es baja, entonces aumenta la difusión longitudinal del analito y esto ocasiona que la banda se ensanche.
- C. Resistencia a la transferencia de masa.** Es una constante que describe la velocidad de adsorción y separación del analito en la fase estacionaria, esto es, el equilibrio entre el analito y la fase estacionaria y la fase móvil toma un tiempo debido a que el analito tiene una afinidad por la fase estacionaria. Por lo que una combinación poco favorable para la eficiencia en la separación es el tener un analito con una afinidad muy alta por la fase estacionaria y una velocidad alta de la fase móvil, lo que lleva a un ensanchamiento de la banda que no se reduce al aumentar la velocidad.



**Figura 6. Típica curva de VanDeemter.**

La técnica de HPLC se desarrolló para resolver los problemas de la cromatografía de líquidos estándar. En esta hay varias limitaciones en la separación, por ejemplo cuando el solvente se hace pasar por gravedad, la separación es muy lenta, mientras que cuando se realiza el paso de solvente mediante caudal de flujo o a velocidad constante (HPLC), la altura del plato teórico aumenta. Aunque el factor más importante que limita la separación mediante LC es el tamaño de las partículas en la fase estacionaria y en relación entre superficie activa de la fase estacionaria y la masa total de los analitos a separar. En el caso de la HPLC las



partículas de la columna son tan pequeñas como  $3\ \mu\text{m}$  y, entonces se logran separaciones más rápidas y que pueden hacerse en columnas más pequeñas y angostas que en la LC, pero que, debido a la fricción requieren necesariamente de flujos forzados (bombas). Con este tipo de columnas es necesario entonces una alta presión para empujar a la fase móvil y a la muestra a través de la columna y esto se requiere para mantener la reproducibilidad de los picos obtenidos. Estas características hacen que en este tipo de columnas la separación sea más efectiva y en mucho menor tiempo que le toma la misma separación en LC con flujo con gravedad. Una situación intermedia se presenta en la llamada cromatografía flash, en la que el flujo es forzado por una bomba de baja presión, pero la fase estacionaria no es de micropartículas, sino convencional (generalmente sílica) (20,22).



#### **4. Principios de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC**

HPLC es una técnica poderosa de separación y una forma altamente mejorada de la cromatografía en columna. Lo anterior debido a que en lugar de que el solvente se deje pasar por la columna por gravedad, se impulsa a que pase a través de la columna bajo alta presión, de hasta 400 atmósferas, haciendo más rápida la separación. Lo que hace que la columna se pueda empacar con matrices de partícula mucho muy pequeña y que da una superficie de contacto mayor y por tanto existen más interacciones entre la fase estacionaria y las moléculas que están fluyendo a través de ella. De esta manera se lleva a una mejor separación de los componentes de la mezcla que se requiere analizar (21).

La otra mejora en relación a la cromatografía en columna se debe a los métodos de detección, ya que en HPLC los métodos están altamente automatizados y son extremadamente sensibles con el paso de los años la ciencia y la tecnología han ido avanzando prácticamente a la par y en conjunto se complementan para obtener resultados importantes en el avance de éste tipo de técnicas (20).

Las muestras que se pueden introducir y separar por HPLC tienen que tener varias características (Tabla 1). A diferencia de la cromatografía de gases (GC), la HPLC no está limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra, ni tampoco por el peso molecular de los componentes. Sin embargo, la muestra debe ser soluble en la fase móvil. Debido a la alta sensibilidad de la técnica de HPLC se hace necesario contar con reactivos de gran pureza, con apenas trazas de metales y/o sales. En cuanto a la muestra ésta debe filtrarse previo a su inyección a la columna para evitar la entrada de partículas no disueltas. En cuanto al disolvente debe de cuidarse que la longitud de onda de detección del analito y la del disolvente sean distintas, generalmente el disolvente debe presentar baja señal en UV. Los disolventes más utilizados en HPLC son H<sub>2</sub>O/amortiguador, metanol, isopropanol, tetrahidrofurano y el más recomendado es el acetonitrilo



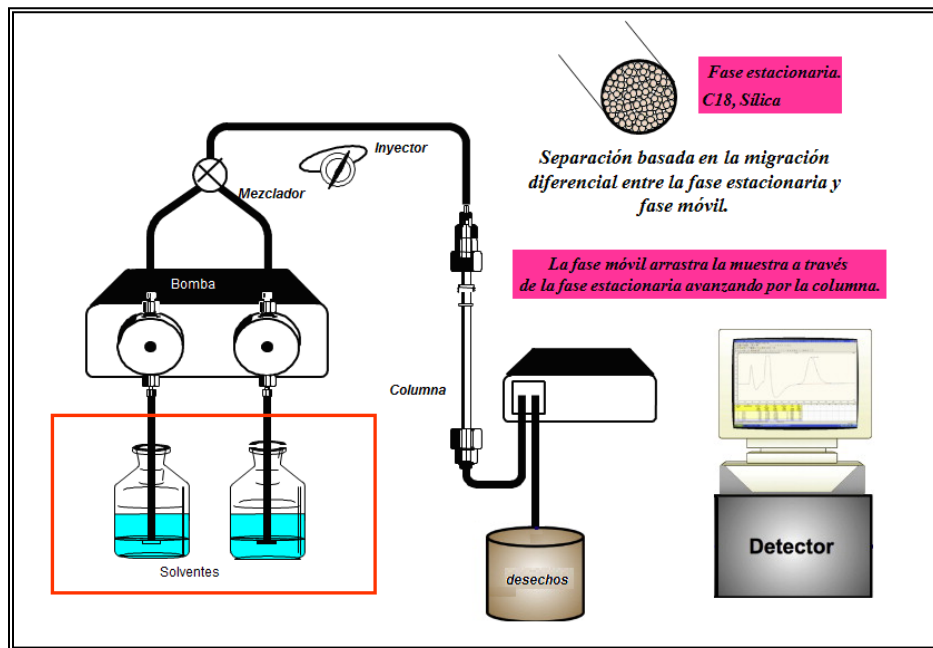
particularmente en cuanto al uso del detector de masas, el disolvente actúa también como otra molécula a separar, entonces el detector la rompe y genera un ión característico. Además es conveniente sea miscible en agua, presente baja viscosidad y sea químicamente inerte para la técnica de HPLC indistintamente del detector. (20, 23,24).

**Tabla 1.** Principales características para el tratamiento y detección de las muestras por HPLC. Tomado y adaptado de 20.

<b>Características</b>	<b>HPLC</b>
Volatilidad de la muestra	No requiere pero debe ser soluble en la fase móvil.
Polaridad de la muestra	Separa ambos tipos de compuestos polares y no polares, así como iones inorgánicos PAH
Termolabilidad de la muestra	El análisis puede tener lugar a temperatura ambiente o incluso a temperaturas mayores.
Peso molecular de la muestra	No hay límite superior teórico. En sentido práctico, la solubilidad es el límite.
Preparación de la muestra	La muestra debe estar soluble en el mismo disolvente que se usa como fase móvil y debe ser filtrada
Volumen de muestra	El volumen de la muestra está basado en el diámetro interno de la columna
Mecanismo de separación	Tanto la fase estacionaria como la fase móvil interaccionan
Detectores	Más comunes UV-Vis. Amplio rango de detectores no destructivos Detectores 3-Dimensiones Sensibilidad de fentogramos

### **Componentes de un sistema HPLC**

Un equipo de HPLC tiene las siguientes partes: un reservorio en donde se encuentra la fase móvil, el sistema de bombeo de la fase móvil, el sistema de inyección de la muestra, la columna que contiene a la fase estacionaria y en donde se llevará a cabo la separación de los analitos y por último el detector (Figura 7). A continuación se describen cada una de las partes del equipo.



**Figura 7.** Partes que componen un sistema de HPLC. Tomado y adaptado de (33)

**Reservorio de solventes.** Recipientes inertes que suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón provistos de aditamentos indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pudiera contener la fase móvil.

**Sistema de bombeo.** Son necesarios para conseguir y regular la presión y velocidad de flujo de la fase móvil. Cuando la fase móvil es una mezcla de solventes, la bomba se programa para tomar los diferentes solventes en una proporción determinada.

**Sistemas de inyección.** Son válvulas dosificadoras que permiten regular la aplicación de la muestra en volúmenes de 5 a 500  $\mu\text{l}$ . Pueden ser de inyección manual o automática.

**Columna.** Componente indispensable para que exista la separación del analito de interés, a través de ella se lleva a cabo la separación de los compuestos. Existen dos tipos de columnas: empacadas y capilares. En la técnica de HPLC se utilizan las columnas empacadas.

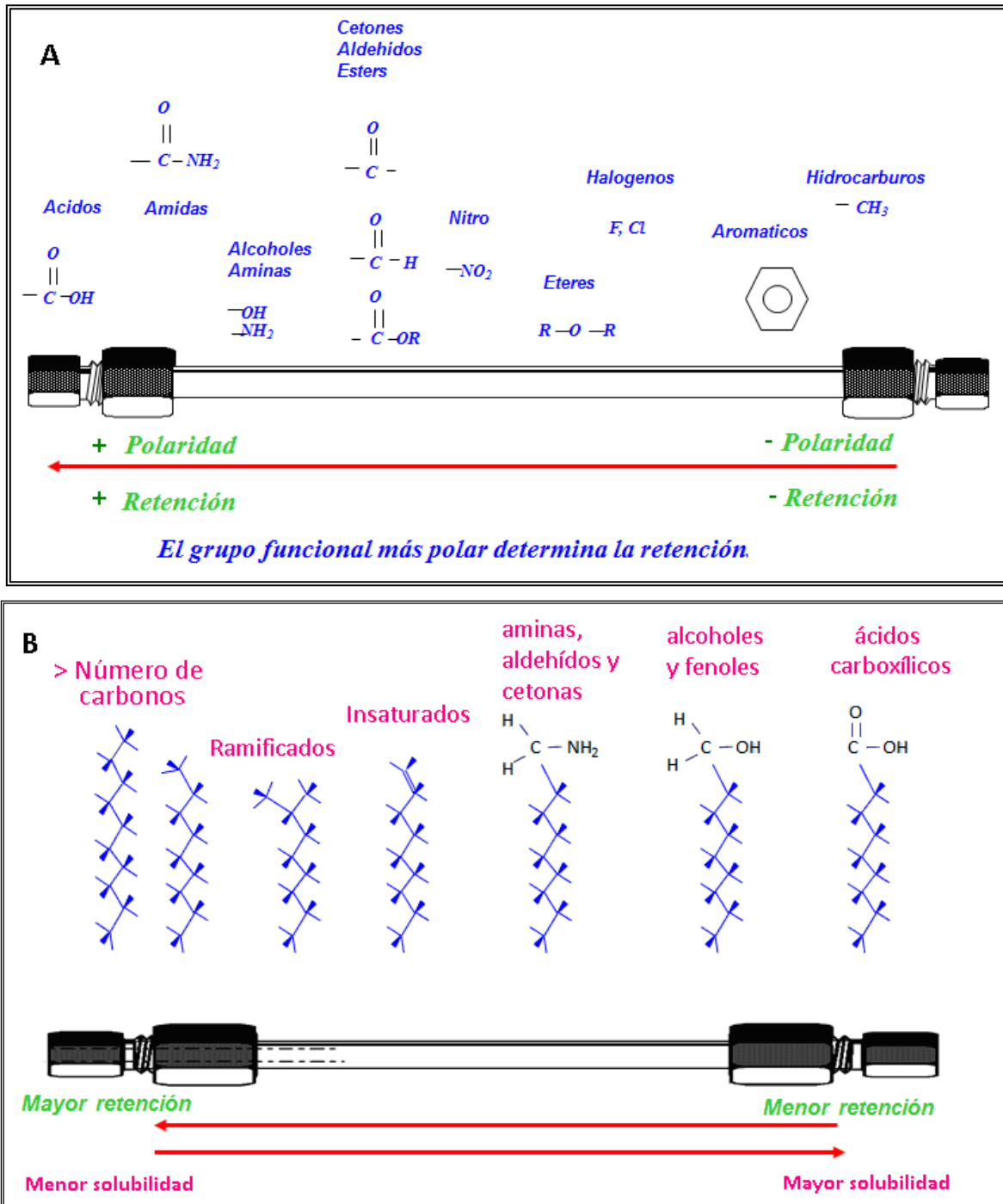




Los tamaños de columna más habitualmente recomendados para el desarrollo de métodos analíticos son 4.6 x 150 mm y 4.6 x 75 mm. En caso de requerir mayor resolución se utilizan columnas de mayor longitud como 4.6 x 250 mm, o una columna de la misma longitud empacada con partículas de menor tamaño. Durante el desarrollo del método hay que seleccionar el diámetro interno de la columna, como se menciona anteriormente generalmente se usan de 4.6 o hasta diámetros de 7.0 mm, aunque pueden ser distintas y que dependen de la sensibilidad o consumo de disolvente o a la compatibilidad requerida con ciertos tipos de instrumento como capilares, nano o preparativos (30, 33, 25).

En cuanto al material de soporte en la columna este depende del tipo de HPLC que se realice, ya que hay de dos diferentes tipos: la fase normal y la fase reversa. En la cromatografía por **HPLC** descrita como **normal** la columna cromatográfica contiene partículas de sílica y es común usar un solvente no polar como el hexano. Las columnas típicas tienen un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 150 a 250 mm generalmente.

El fundamento de separación mediante HPLC-fase normal radica en que los compuestos polares que se encuentran en la muestra pasan a través de una columna que contiene un soporte polar, por lo que los componentes no polares pasan rápido a través de la columna y los polares interactúan con esta por un mayor tiempo (Figura 8A).



**Figura 8.** Orden de elución de moléculas de acuerdo a su grupo funcional en la HPLC. **A** Fase normal y **B.** Fase Reversa. Tomado y adaptado de (18).



En la **HPLC fase reversa**, la sílica se modifica para hacerla no polar a través de unirle cadenas hidrocarbonadas de 8 o 18 carbonos a su superficie (Figura 8B). En este caso ocurre una atracción fuerte entre el solvente que es polar y las moléculas polares de la mezcla que se encuentran pasando a través de la columna. Es decir las moléculas polares de la muestra interaccionaran poco o nada con la columna que es hidrofóbica, moviéndose más rápidamente a través de la columna que aquellos componentes de la mezcla que son no polares.

La modalidad HPLC reversa se utiliza más frecuentemente que la fase normal debido a la versatilidad de los compuestos que se encuentran anclados y que conforman la fase reversa de las columnas, también se adaptan más fácilmente a los métodos en el software y se pueden hacer combinaciones de protocolos de elución con mayor facilidad que con la fase normal. Además la fase reversa es la primera opción para separar compuestos polares y no polares con peso molecular menor a 2000 Daltones, para series homólogas, ácidos y bases débiles, ácidos y bases fuertes, proteínas y péptidos; y ocasionalmente aminas y compuestos insolubles en agua (18).

En general, los solutos grandes, como las proteínas, se separan mejor en columnas de fase reversa de cadena corta (C3, CN) y los péptidos y las moléculas pequeñas en columnas de cadenas más largas (C8, C18). En muchos casos, no obstante, estas premisas básicas convencionales no se cumplen. Por ejemplo, los péptidos también pueden separarse eficazmente en columnas de cadena corta, mientras que los péptidos hidrofóbicos pueden presentar mejor recuperación en fases de cadena más larga. Por ello, es mejor seleccionar inicialmente una fase intermedia del espectro hidrofóbico (por ejemplo, C8) y después cambiar a una fase más hidrofóbica o hidrofílica dependiendo de los resultados iniciales y de las propiedades de solubilidad de la muestra (1).



La selección de fase móvil para un sistema de fase reversa comienza con la elección del modificador orgánico. Las diferencias de selectividad y la retención de la muestra varían significativamente entre las fases móviles que contienen acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano. La solubilidad de la muestra suele variar en estos disolventes y dictamina la utilización de disolventes específicos.

Es muy importante controlar el pH en los sistemas de fase reversa para estabilizar la retención y la separación de las bandas. Un rango de pH entre 2 y 4 suele ofrecer las condiciones de retención más estables frente a pequeños cambios de pH y es el recomendado como punto de partida del desarrollo de métodos para la mayoría de las muestras, incluidos los compuestos básicos y los ácidos débiles típicos (1).

Existen marcas comerciales de columnas que permiten una separación eficiente, robusta y reproducible para uso en la purificación de proteínas, por ejemplo, las columnas Poroshell 300 (marca Agilent) utilizan partículas superficialmente porosas hechas de una fina capa externa de sílice porosa y un núcleo sólido de sílice. Eso reduce la distancia de difusión de las proteínas, haciendo posible separaciones HPLC rápidas de péptidos y proteínas de 500 a 1000 kDa. Las columnas ZORBAX 300Extend de poro ancho ideales para LC/MS de proteínas y péptidos a pH 10. Columnas HPLC ZORBAX GF-250/450 de exclusión por tamaño: una columna robusta y reproducible diseñada especialmente para separaciones por tamaño de proteínas (25).

### ***Detector***

Es aquel dispositivo encargado de manifestar la presencia de los compuestos que salen de la columna. Existen diferentes tipos de detectores que no sólo difieren en el tipo de molécula (selectividad), que sensa sino también en el límite de detección (sensibilidad) así como en su linealidad, información cuantitativa y



facilidad de uso. En la Tabla 2 se encuentran algunas características de los detectores más comúnmente utilizados.

**Tabla 2.** Características de detectores para cromatografía de líquidos. Tomado de (26).

TIPO	*LÍMITE DE DETECCIÓN APROXIMADO	RANGO LINEAL APROXIMADO	COMENTARIOS
Detector de arreglo de diodos o DAD	$10^{-11}$	$10^5$	Resolución de 1nm, calibración de la longitud de onda se hace con un filtro de holmio. Capacidad para detectar hasta 8 longitudes de onda diferentes.
Absorción ultravioleta-visible	$10^{-11}$ g	$10^4$	Específico para compuestos con capacidad de absorber luz.
Índice de refracción diferencial	$10^{-9}$ - $10^{-10}$ g	$10^3$	Detector Universal. No se puede usar con gradientes
Electroquímico: Amperometría	$10^{-10}$ - $10^{-11}$ g	$10^5$	Detectores específicos: Los componentes deben ser electroactivos.
Electroquímico: Conductimetría	$10^{-8}$ g/mL	$10^5$	Detector específico para todos los iones
Fluorescencia	$10^{-14}$ g <sup>s</sup>	$10^5$	Detector específico para compuestos que presentan fluorescencia como la quinolina y el indol.
Espectrometría de masas (MS)	$10^{-7}$ - $10^{-9}$ g	$10^3$	Detector Universal que puede ser usado en análisis con gran precisión.
Dispersión de la luz no evaporativo o en solución	$10^{-6}$ g/mL	$10^5$	Es utilizado para determinar pesos moleculares de polímeros en un rango de 500- $10^8$ daltons.
Dispersión de luz evaporativo	$10^{-9}$ g	$10^6$	Universal, excepto para analitos volátiles. No tiene respuesta lineal.

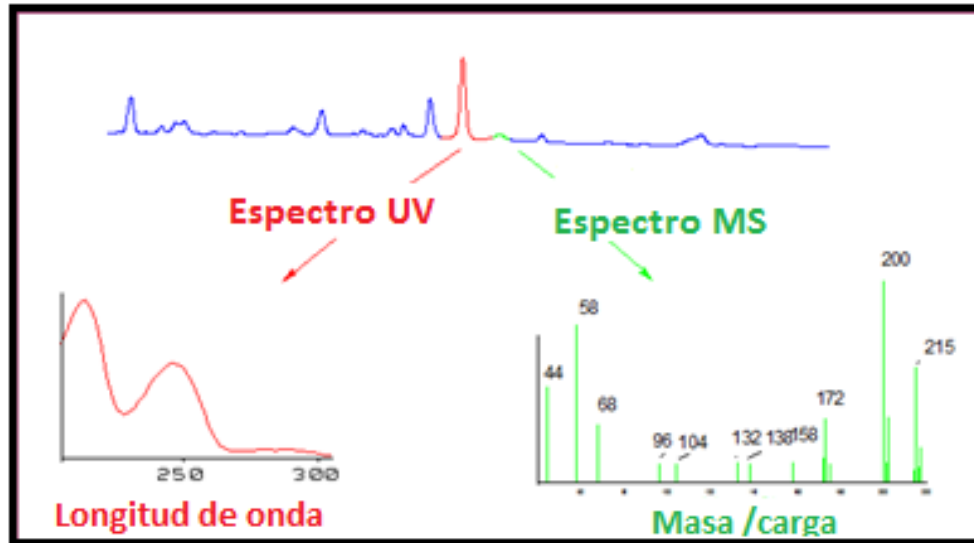
Para detectar proteínas se suelen usar detector de arreglo de diodos o DAD y el de masas. El DAD puede registrar los espectros de las moléculas de interés en un rango de 190-950 nm con una resolución de longitud de hasta 1 nm. Es más sensible que el detector UV-Vis y una buena elección cuando no se sabe qué compuestos hay en la muestra. Los péptidos y las proteínas se detectan en el



rango de 210-280nm. Los aminoácidos con grupos funcionales aromáticos se detectan en 280nm como por ejemplo el triptófano (26).

El detector de masas (MSD) es un detector de alta especificidad. El espectrómetro de masas convierte primero a las moléculas en iones, posteriormente realiza el análisis de masa y de cualquier ion fragmentado durante el proceso de ionización, sobre la base del índice masa sobre carga. Varias tecnologías se encuentran disponibles para la ionización y el análisis de iones, lo que da como resultado diferentes espectrómetros de masas. Por lo anterior, el acoplar la cromatografía de líquidos con la detección de masas se traduce en una técnica muy sensible, en el rango de femtomoles ( $10^{-15}$  moles) y atomoles ( $10^{-18}$  moles) y que tiene un amplio espectro de aplicaciones en la identificación de biomoléculas (27). Sin embargo ésta técnica tiene como limitante su alto costo, pero este hecho no puede detener la investigación ya que como se ha mencionado es muy sensible y otorga información valiosa en los análisis. Más adelante se describirá con más detalle la técnica de HPLC acoplado a masas.

En la Figura 9, se muestra para un mismo analito separado por cromatografía HPLC, la diferencia visual que arrojan dos diferentes detectores: el de color rojo de lado izquierdo es un ejemplo de un espectro del detector UV-VIS y el de color verde de lado derecho es cómo se muestra el análisis de un detector MS de tipo cuadrupolo simple el cual muestra el patrón de fraccionamiento y la abundancia de los iones más característicos. El detector de MS otorga una mayor información de los componentes que pueda haber en una muestra. Y hablando de un analito, podemos comprobar la identidad con mayor exactitud, precisión y seguridad.



**Figura 9.** Cromatograma, diferencia entre detector UV-VIS (lado izquierdo), contra el detector de masas (lado derecho). Tomado y analizado de (25).

En el momento en que se tenía la técnica de HPLC en uso, se seguían realizando mejoras a los sistemas de cromatografía de líquidos para disminuir la cantidad de muestra aplicada a la columna y el disolvente utilizado manteniendo una resolución alta en el número de proteínas identificadas, esto a través de la modificación en el diámetro y tamaño de las columnas junto con el hardware, así han surgido las tecnologías UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) y nanoLC. La UPLC es un sistema en el que el tamaño de partícula de la fase estacionaria es menor a 1.8- $\mu\text{m}$ , mientras que en la HPLC es a partir de 1.8 hasta 7  $\mu\text{m}$ , el equipo UPLC suministra la fase móvil a alta presión y con una mínima dispersión, y produce picos más estrechos y más concentrados que el HPLC, aunque los principios de selectividad y retención son los mismos en ambos sistemas, la UPLC provee una sensibilidad 3 veces mayor a la del HPLC. Los sistemas UPLC aumentan el rendimiento y reducen el consumo de eluyente sin comprometer los resultados analíticos, además de ganar tiempo en cada corrida (28). Sin embargo, los principios fisicoquímicos de separación siguen siendo los mismos entre HPLC y UPLC.



Por su parte la NanoLC, es una técnica que se utiliza generalmente cuando se tienen volúmenes de muestra muy pequeños ya que maneja flujos de la fase móvil de 1 ng/min, velocidad de flujo lento; no recomendable para uso rutinario en la separación de mezclas complejas. Se recomienda cuando se tiene un blanco por investigar, aunque también se puede desarrollar un método. Sin embargo, es útil cuando se desea separar una proteína de interés que se encuentra en muy baja abundancia (29).





## **5. Espectrometría de masas**

Como se mencionó anteriormente, la detección de las moléculas que se separan en la cromatografía de líquidos puede realizarse con detectores distintos, una técnica analítica muy poderosa es la que resulta del acoplamiento de HPLC con la espectrometría de masas, HPLC-MS y que lleva a la detección de moléculas en mezclas complejas.

El análisis por espectrometría de masas incluye 4 etapas:

- I. Introducción de la muestra.
- II. Ionización de la muestra.
- III. Separación y el análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación masa/ carga ( $m/z$ ).
- IV. Obtención del espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y los fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

### **I. Introducción de la muestra.**

Ésta puede realizarse mediante sistemas directos e indirectos en los que la muestra se volatiliza externa o internamente o bien a través de sistemas especiales que provienen de las técnicas de separación como cromatografía de gases o líquidos o de electroforesis capilar. En un equipo de HPLC-MS existen dos formas de introducir la muestra: manual o automáticamente, la forma manual es menos exacta ya que depende del analista, además de que puede perderse muestra, ésta variante puede eliminarse con la inyección automática, en donde el equipo debe contar con una torreta de inyección que se programa con ayuda de un software para introducir la muestra en el equipo disminuyendo en gran parte el error y la incertidumbre que existe en la forma manual.



## II. Sistemas de ionización.

Pueden ser ionización en fase gaseosa o ionización por desorción. En el primero se encuentran la ionización por impacto de electrones, la ionización química y la fotoionización. En el segundo se encuentran la ionización por electrospray (**ESI**), la ionización por desorción láser (LDI), la ionización por desorción láser asistida por una matriz (**MALDI**), ionización por láser inducida en superficie (SELDI), el bombardeo con átomos rápidos (FAB) y la ionización por análisis directo en tiempo real (DART). A continuación se describen los métodos que se utilizan comúnmente en el análisis de muestras proteicas.

**Método ESI.** Realiza una ionización a presión atmosférica que se aplica a un amplio grupo de muestras y, especialmente, se utiliza para la caracterización de biomoléculas. John Fenn recibió el premio Nobel por el desarrollo de la técnica de ESI en el 2002. Esta técnica ha sido pieza clave en el estudio a gran escala del proteoma, es decir al avance de la proteómica.

En la ionización por electrospray, la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 5 KV y una presión de 1 atmósfera. Se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa (Figura 10a).

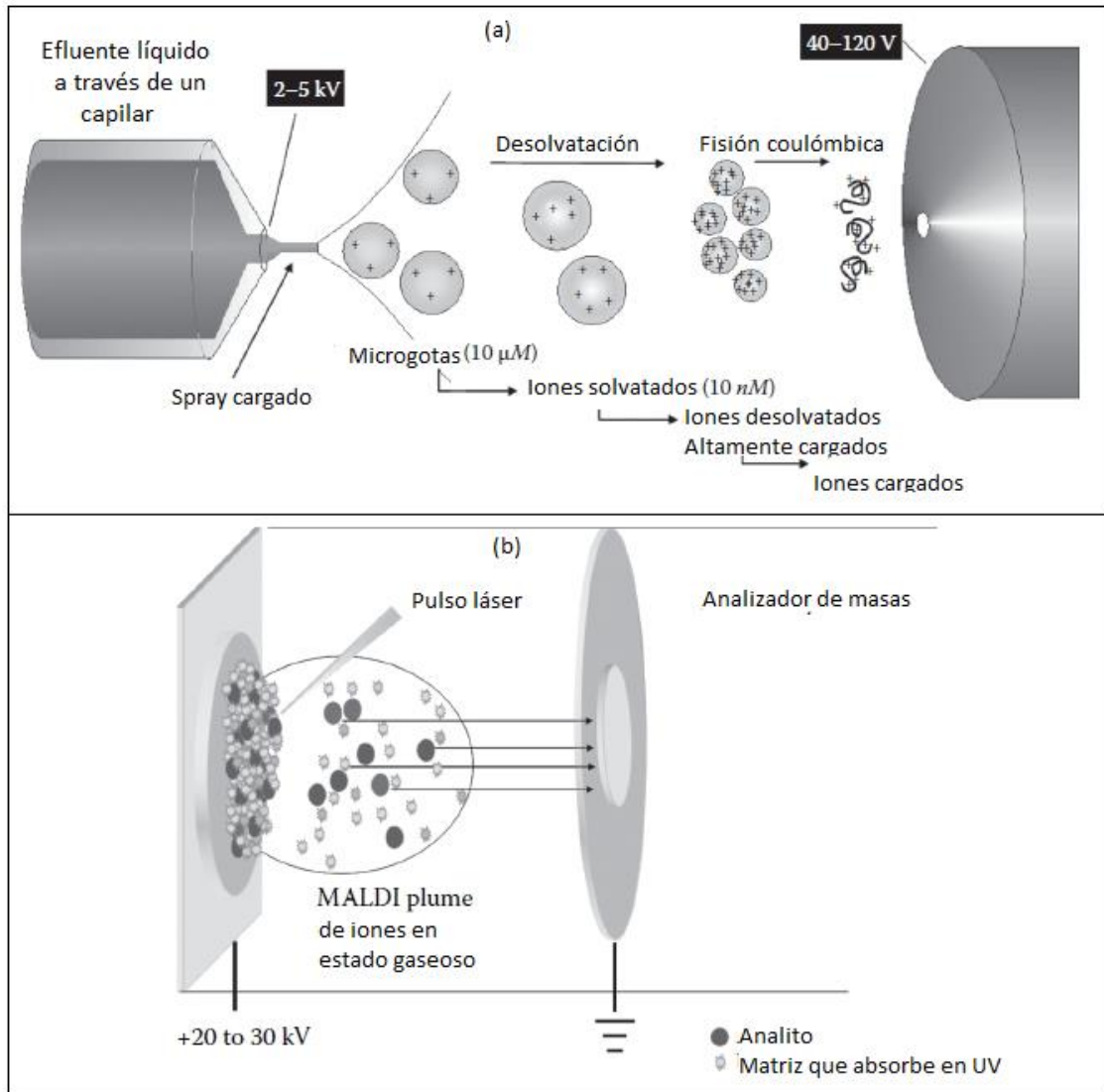
El análisis por ESI se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Permite la obtención del ión molecular y, si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir aumentando el voltaje en la punta del cono del capilar. Este proceso se utiliza con frecuencia en espectrometría de masas en tándem (9, 27-30).



A modo de ejemplo, cuando la muestra es introducida por ESI los compuestos de peso molecular de 4000 y con 10 cargas, pueden aparecer a  $[(4000 + 10 \times 1.008)/10]$  Da o aproximadamente 401.0 Da (1.008 corresponde a la masa de un protón), lo cual está dentro del intervalo de masa detectable (Parker *et al.*, 2010). En muchos casos, se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de  $\pm 0,005\%$ . Proteínas de 100 KDa o más pueden ser determinadas. La ionización por electrospray constituye la mejor interfaz cuando se acopla a la cromatografía de líquidos (LC) o la electroforesis capilar (CE) puesto que ofrece la posibilidad de introducir una muestra líquida previamente separada en sus componentes como microgotas que facilitan la discriminación a lo largo del proceso de la detección (30, 31).

**Técnica MALDI.** Para esta técnica se mezcla una disolución de la muestra con la sustancia matriz que se encuentra en mucha mayor proporción que la muestra (10,000:1) y que son compuestos como el ácido *trans*-cinámico o el ácido 2,5-dihidroxibenzoico ambos compuestos absorben en el rango del ultravioleta; esto es la clave del éxito del MALDI, ya que la matriz es capaz de absorber gran cantidad de energía a la longitud de onda del láser y de las moléculas de la muestra de una forma controlada, de manera que permite la desorción de las moléculas quedando como iones intactos en fase gaseosa.

Esta mezcla se deposita en un dispositivo portamuestras especialmente diseñado para este sistema de ionización. Tras la evaporación del disolvente, los cristales de la mezcla muestra-matriz se irradian con un haz láser de elevada potencia ( $10^6$  Wcm<sup>2</sup>) y de pulsos cortos durante algunos nanosegundos para comenzar la evaporación o desorción y la ionización. Tras la evaporación del disolvente, los cristales de la mezcla muestra-matriz se irradian con un haz láser de elevada potencia ( $10^6$  Wcm<sup>2</sup>) y de pulsos cortos durante algunos nanosegundos para comenzar la evaporación o desorción y la ionización de las moléculas de la muestra y la matriz, manteniéndolas en fase gaseosa (Figura 10b).



**Figura 10.** Ionización ESI (a) y MALDI (b). Tomado y adaptado de Parker *et al.*, 2010.

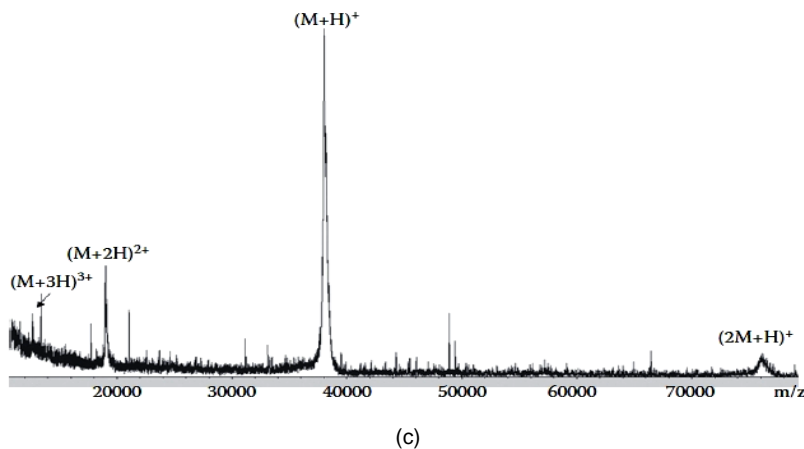
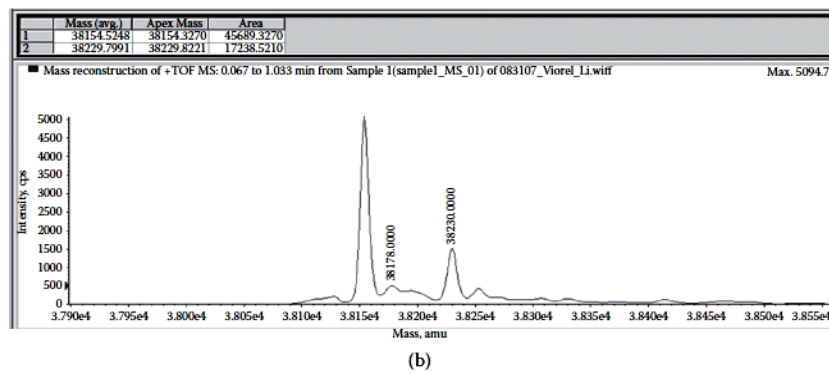
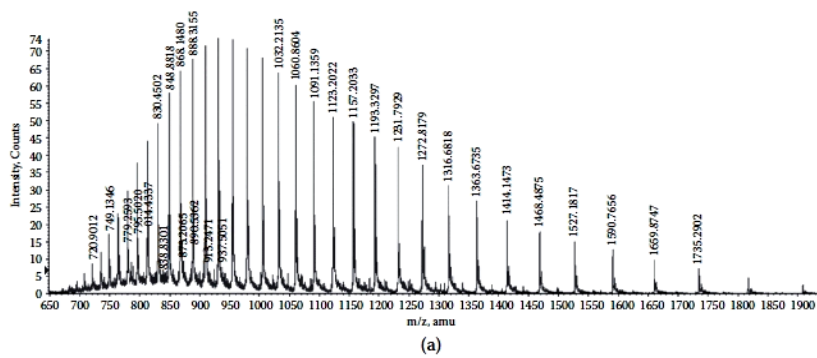
La matriz utilizada en el sistema MALDI puede ser orgánica o inorgánica, sólida o líquida, dependiendo de la naturaleza del analito. La matriz tiene dos misiones, la primera es absorber el fotón de energía procedente del haz láser, la segunda actúa como un disolvente del analito reduciendo las fuerzas intermoleculares y disminuyendo su agregación al mínimo. Los iones generados mediante MALDI son mayoritariamente moléculas protonadas con una sola carga, aunque también se forman iones oligoméricos protonados con doble y triple carga.



Una matriz debe tener las siguientes características: fuerte absorción de radiación a la longitud de onda del láser. Buena capacidad de mezcla con el analito, para favorecer la formación de microcristales bien definidos. Una baja temperatura de sublimación que permita la formación de forma instantánea de un conjunto matriz-muestra durante la permanencia del pulso de láser. Participación en algún tipo de reacción fotoquímica, que permita que las moléculas de la muestra puedan protonarse o desprotonarse con una elevada eficacia (30).

Para el acoplamiento de la técnica de LC con el MALDI se han desarrollado varias interfaces como microdispensadores, nebulizadores de calentamiento capilar, y dispensadores de vacío. El acoplamiento LC/MALDI mejora la identificación de proteínas por el análisis de huella de péptidos y para la asignación de modificaciones post-traduccionales de proteínas, además de que elimina los posibles problemas de alteración en la resolución y eficiencia de la asignación de masas por MALDI.

Una vez que se han generados los iones por cualquier técnica seleccionada, la separación de los mismos se debe a la alta aceleración de estos en la mezcla producida por la evaporación y a la atracción de los iones hacia el electrodo generalmente cargado negativamente. De acuerdo a la segunda ley de Newton en donde la Fuerza es directamente proporcional al producto de la masa por la aceleración, encontramos que la aceleración es proporcional al cociente de la fuerza aplicada entre la masa, si la fuerza se mantiene constante, a mayor aceleración menor masa. Lo que explica que en los espectros producidos de la ionización ya sea MALDI o ESI, los picos que salen primero del analizador son los de menor masa, y el tamaño del pico muestra la abundancia de la muestra (Figura 10).



**Figura 11.** Comparación de los espectros obtenidos por ESI y MALDI de una proteína de 38 kDa. a) Espectro ESI; b) Espectro resuelto del espectro a; y c) Espectro MALDI. Tomado de (31).



MALDI y ESI son consideradas técnicas complementarias. Ambos métodos trabajan con el analito en diferentes estados físicos (sólido y líquido). Así como el electrospray, MALDI produce múltiples analitos cargados, aunque menos que los que se encuentran en electrospray. Al comparar los espectros de masas por MALDI o ESI (Figura 11), se puede observar claramente que el número de cargas que la proteína incorpora en el espectro de ESI es mayor, pero la mejor resolución de la proteína la tiene el MALDI (Figura 11c), como se observa en ese ejemplo de la Figura 11, el pico de mayor intensidad corresponde al peso molecular que tiene la proteína que en este ejemplo es de 38 kDa.

Adicionalmente, MALDI puede detectar proteínas con pesos moleculares de hasta 250 kDa, mientras que ESI el límite de masa es de 65 a 70 kDa. Aunque en algunos detectores pueden mejorar estos límites para ESI para analizar moléculas de hasta 800 kDa. Una desventaja del electrospray es que es sensible a sales y detergentes en las muestras y que el tiempo para el proceso de una cantidad grande de muestras es mucho mayor que MALDI, en donde este último si es de gran capacidad de procesamiento de muestras, ya que los espectros se pueden obtener en segundos por muestra (31).

La ionización MALDI tiene una mejor resolución y precisión en la masa de los iones analizados que ESI, y se debe a que la fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o bien son acoplados a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador encargado de monitorear los iones y seleccionar un determinado ión padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF. El hecho de que la ionización por MALDI permita detectar moléculas termolábiles como son las proteínas de forma intacta, la incluye dentro de los



métodos de ionización suave (“soft-ionization”). No obstante, durante el proceso de aceleración ó durante el “vuelo” a través del tubo, se da un proceso de descomposición metaestable denominado PSD (“*Post SourceDecay*”). El análisis de los iones que se producen mediante este fenómeno proporciona una información estructural de la molécula original muy útil para lo cual es necesario separar estos fragmentos. En un analizador de tipo linear esto no es posible ya que los iones formados por PSD tienen la misma velocidad que el ion original y viajan juntos hasta el detector; para separarlos se emplean analizadores de tipo reflector que trabajan con voltajes variables para finalmente obtener un único espectro de fragmentación-PSD compuesto de tantos espectros como voltajes empleados que se pegan con ayuda informática.

### III. Analizadores

El analizador es la parte del espectrómetro de masa donde tiene lugar la separación de los fragmentos iónicos generados en función de su relación  $m/z$ . Esta separación se produce por aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos.

Existen diferentes tipos de analizadores que poseen características diferentes en cuanto a sensibilidad y resolución. Los tipos de analizadores más utilizados son: cuádruplo (Q), trampa de iones (IT), sector electromagnético (BE), tiempo de vuelo (TOF) y resonancia iónica ciclotrónica (ICR). A continuación se describen el TOF y el cuádrupolo porque son los más utilizados para la identificación de analitos entre ellos proteínas, posterior al análisis con HPLC actualmente.

**Analizador de masas cuádrupolo.** Se compone de cuatro varillas o barras paralelas dispuestas en un cuadrado hechas de un monolito de vidrio con forma hiperbólica, el uso de la forma hiperbólica proporciona una mejor forma de pico y





la mejor resolución en la filtración de las masas. El monolito de vidrio es recubierto con oro para crear una superficie eléctricamente conductora.

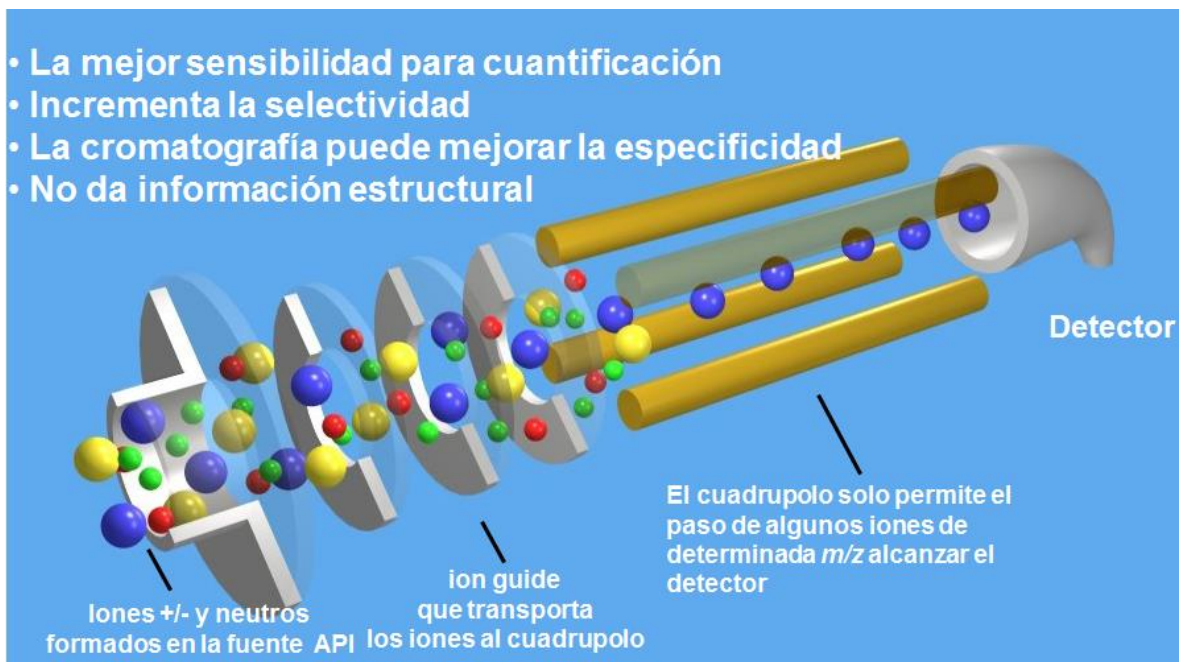
En el funcionamiento del cuadrupolo el analito se dirige hacia el centro de éstas barras que se encuentran opuestas y alineadas milimétricamente. A dos barras se les aplica una tensión continua positiva (“barras positivas”) y al otro conjunto de dos barras se les aplica un conjunto de tensión negativa de la misma magnitud (“barras negativas”), además las cuatro barras tienen un voltaje de RF (radio frecuencia) oscilante de 1 Mhz. Los iones entrantes a las barras se someten a movimientos oscilantes debido a campos eléctricos de RF y DC (corriente directa) de esta manera si la masa del ion es demasiado baja el ion se dirige hasta las barras positivas y nunca llegará a la salida del cuadrupolo, ahora si la masa del ion es muy alta el ión se dirigirá hacia las barras negativas, solo los iones que cumplen con el rango de masa especificada tendrán oscilaciones estables lo que permitirá salir del cuadrupolo y ser detectado en el multiplicador de electrones.

La magnitud del voltaje de radiofrecuencia determina la relación  $m/z$  que es capaz de describir una trayectoria tal que atraviesa el analizador y alcanza el detector. Variando dicha magnitud se podrán detectar los fragmentos iónicos cargados positivamente que se generaron en la fuente de ionización y que son característicos de cada compuesto (Berg, 2007). Las ventajas de su uso son determinaciones robustas con alta fiabilidad espectral y alta selectividad.

**TOF (Time of flight).** Los analizadores TOF funcionan mediante la aceleración de iones a través de un alto voltaje. La velocidad de los iones está relacionada con el tiempo necesario para viajar por un tubo largo de vuelo para llegar al detector y esto depende de sus valores  $m/z$ . Si la aceleración inicial del voltaje es pulsado, la salida del detector está en función del tiempo y esto se convierte en un espectro de masas. El analizador TOF puede adquirir espectros de forma extremadamente rápida con alta sensibilidad, generando alta precisión.



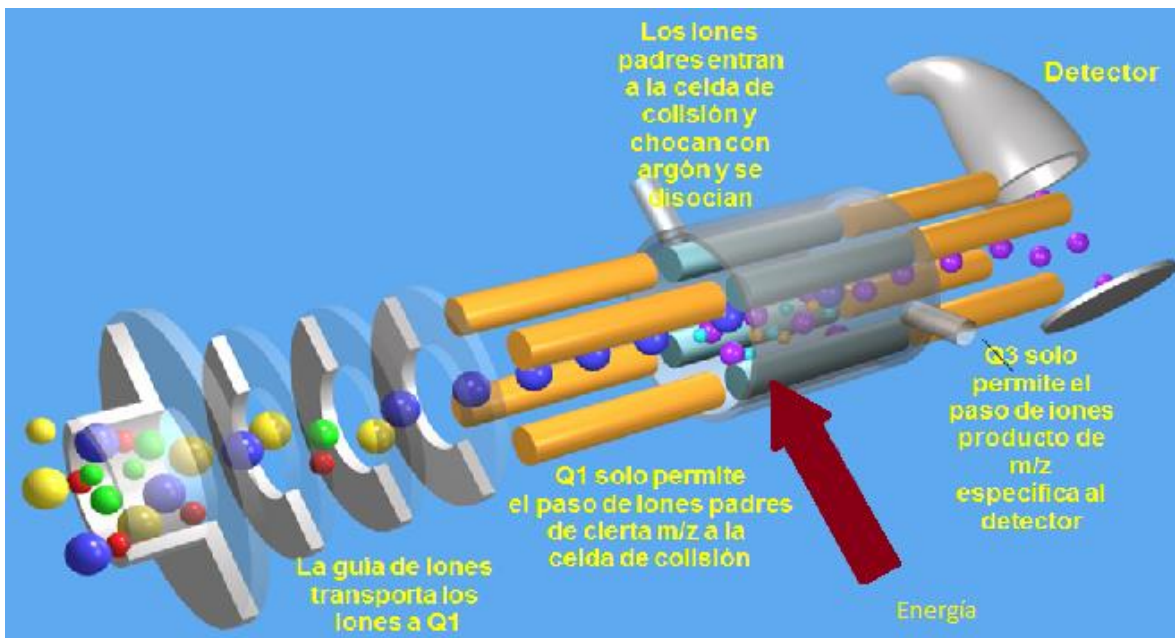
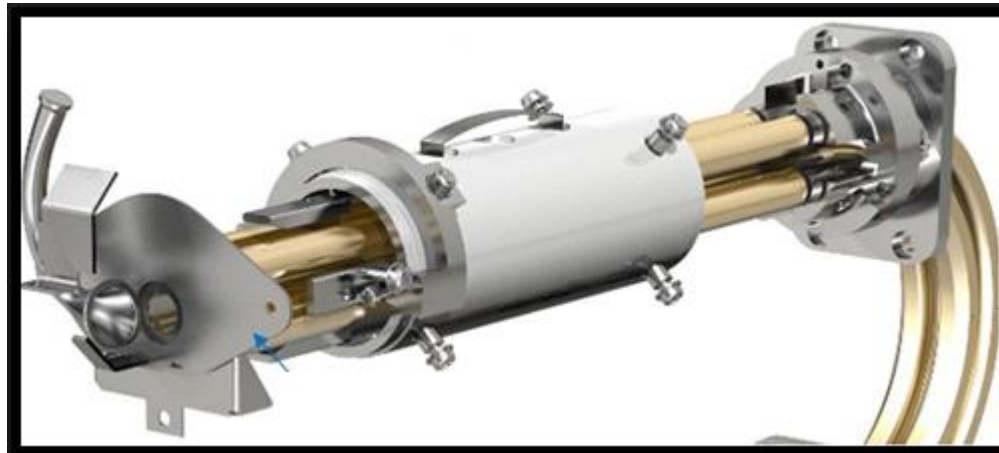
Los instrumentos que combinan un analizador TOF con un cuadrupolo simple (Figura 12), se les llama QTOF (Figura 13) y consisten de tres cuadrupolos conectados en serie (Figura 14). El primer cuadrupolo (Q1) filtra las masas con ayuda del campo magnético; es decir los iones seleccionados, después el ión característico pasa por él, en el segundo (Q2) en donde se encuentra una entrada de nitrógeno e cual se calienta a 300°C para que la celda de colisión rompa el ión seleccionado en fragmentos menores, llamados iones secundarios. Por último el tercer cuadrupolo (Q3), sólo permite el paso de iones producto de  $m/z$  específica al detector, es decir monitorea sólo fragmentos característicos filtrando los iones.



**Figura 12.** Esquema de un cuadrupolo. Tomado y adaptado de (32).

Este tipo de instrumentos son poco sensibles pero muy útiles en el análisis de sustancias desconocidas que presentan estructura similar a alguna sustancia conocida, bien porque pertenezcan a la misma familia farmacológica o porque sea producto de su metabolismo También han sido utilizados ampliamente en el campo de la proteómica, sobre todo en la determinación de modificaciones post-traduccionales de las proteínas, glicosilaciones, fosforilaciones, cambios en la

proteína que le permiten modificar su función y afectar el metabolismo celular o la fisiología completa de un tejido u organismo(27).



**Figura 14.** Esquema de un equipo QTOF. Tomado y adaptado de (32).

#### IV. Detectores

Como ya se habían mencionado; los detectores también proporcionan información sobre el flujo de iones o la abundancia de iones que salen del analizador de masas. Convierten el flujo de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada, almacenada y presentada mediante el sistema de tratamiento de datos de forma que se pueda interpretar. Sus características más importantes son



sensibilidad, exactitud, resolución, tiempo de respuesta, estabilidad, amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo. Se utilizan detectores del tipo de fotomultiplicadores, copa de Faraday y otros.



## 6. Identificación de proteínas por MS

La **Espectrometría de Masas** es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

Las proteínas de interés en un experimento de proteómica pueden ser analizadas directamente mediante espectrometría de masas. El punto de partida puede ser diferente. Si partimos de proteínas separadas mediante 1 D o 2D PAGE, el primer paso del análisis consistiría en recortarlas directamente del gel dónde han sido resueltas (*"picado" de spots*). Este proceso de recorte se lleva a cabo en una estación automática de picado de geles (*ProPic, GenomicsSolutions*). Con el uso del robot se evita la manipulación del gel y la posible contaminación con queratinas.

Si partimos de muestras líquidas (fracciones de una cromatografía o un extracto proteico que contenga mezcla de proteínas), comenzaríamos llevando a cabo una limpieza de la muestra, seguida de la desnaturalización, reducción y alquilación de la misma.

En ambos casos proteínas separadas en gel o proteínas en solución separadas previamente por LC, el siguiente paso en el procedimiento sería la digestión de las mismas mediante una proteasa específica (generalmente tripsina), que genera un conjunto de péptidos que pasan a ser analizados por espectrometría de masas.

En la Identificación de proteínas mediante Huella Peptídica MS-MS/MS (MALDI-QTOF) los péptidos resultantes de la digestión de proteínas (generalmente separadas mediante 1 D o 2D PAGE) se depositan muestra a muestra sobre una placa MALDI junto con una matriz ( $\alpha$ -ciano-4-hidoxicinámico) usando por ejemplo una estación automática de dispensación de proteínas sobre placa de MALDI (Pro MS MALDI).



Las muestras depositadas, se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-QTOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella peptídica”. Adicionalmente, se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas.

La identificación de proteínas se realiza automáticamente mediante el sistema GPS (*Global Protein Server*) acoplado a los datos del QTOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (*MatrixScience*, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (5).



## Discusión

La aplicación de la espectroscopia de masas para el análisis de biomoléculas ha sido una herramienta que ha ayudado al avance en la investigación de proteínas. Esto ha ocurrido debido al desarrollo de las técnicas de ionización de la muestra como el MALDI y ESI; además de la mejora en la instrumentación (9,31).

No obstante que los espectrómetros de masa proporcionan una sensibilidad y exactitud alta, la concentración de proteína que se encuentran en las muestras biológicas es baja y su composición es compleja (29). El problema ha sido tradicionalmente enfrentado por la separación de la mezcla de proteínas a través de electroforesis en dos dimensiones, con la subsecuente digestión de la proteína en el gel seguida de la espectrometría de masas ESI o MALDI. Si bien, este procedimiento es el más popular, especialmente cuando se desea la identificación y cuantificación de proteínas, no es siempre el más adecuado, principalmente, porque el método funciona mejor con proteínas de abundancia alta y con pesos moleculares mayores a los 12-14 kDa, además de que algunas proteínas como las proteínas membranales o aquellas que contienen puntos isoeléctricos extremos, no se resuelven bien (17). Además, también existen complicaciones en el tratamiento de múltiples muestras.

Una alternativa muy eficiente y recomendable para el pre-fraccionamiento de mezclas proteicas o de lisados celulares antes de utilizar el paso final del análisis por espectrometría de masas es la separación cromatográfica. Para ello la muestra de proteína pasa por una digestión proteolítica, por 1 o varias separaciones cromatográficas y, posteriormente, los péptidos resultantes se detectan por espectrometría de masas en tándem (9, 25). De esta forma, se reduce considerablemente el problema de la complejidad en la separación comparada con la muestra original, por lo que la técnica de HPLC conectada en serie al espectrofotómetro de masas (HPLC-ESI) o bien realizando el proceso





separado, es decir primero la separación de la muestra por HPLC y luego aplicando al aparato de masas, es el método que ha probado ser el más poderoso y de alto rendimiento en proteómica (27).

Debido a la variabilidad que existe en la naturaleza con las proteínas y sus modificaciones en distinto ambiente; la automatización total no es muy recomendada al menos que se tenga un método bien estandarizado para realizar el análisis, aunque siempre existen pasos previos antes de la inyección de la muestra en el equipo.

El avance de la tecnología proporciona nuevos tamaños de partículas para las columnas, más angostas y pequeñas que ayudan en la eficiencia y resolución de los analitos, además de sistemas de bombeo que empujan a velocidades más altas la fase móvil y mejoran principalmente la eficiencia de las separaciones en comparación con el tradicional HPLC.

Los avances en ésta técnica continúan (UPLC, nano LC), sin embargo no pierde las propiedades tan esenciales que la caracterizan para la identificación de proteínas. Aunque no hay que perder de vista que HPLC es una técnica muy versátil tanto que industrias biofarmacéuticas han costado equipos para control de calidad en biofármacos, así concluimos que puede realizar infinidad de tareas siempre y cuando tenga el método y el manejo adecuado de las muestras.

Con el paso del tiempo se va haciendo más popular para el avance en muchos campos de trabajo para el beneficio de la humanidad y cuidado del medio ambiente.



## Conclusiones

El avance en la identificación de proteínas de mezclas complejas puede llevarse a cabo a través del análisis por espectrometría de masas, pero su acoplamiento con la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución, mejora y da certidumbre a los datos obtenidos con el analizador de masas. Proceso que ya se usa de manera común en la investigación en el área de la proteómica y que seguramente se extenderá a otras áreas, conforme la tecnología del procesamiento inicial de la muestra y otros pasos del proceso vayan mejorando.



## REFERENCIAS

- 1 Stein LD (2004) Human Genome: End of the beginning. *Nature* 431, 915-916.
- 2([http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced\\_genomes/genome\\_guide\\_p1.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p1.shtml)) 23:04, 25-mar-2013.
- 3([http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/genenumber.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/genenumber.shtml)).
- 4 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman
- 5 Campbell MK, Farrell SO (2004) *Bioquímica*, Editorial Thompson, 4ta. Edición, pág.77-83.
- 6 Voet D (2006) *Bioquímica*, Editorial Medica Panamericana pag. 169-171.
- 7 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Bioquímica*. Editorial Reverté, S.A., 6° edición, pag.49,60,188, 433.
- 8 <http://www.guiametabolica.org/noticia-articulo/opciones-terapeuticas-actuales-iiiv-terapia-enzimatica-sustitutiva> 15:17, 29-jun-13.
- 9 Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry* 70, 437-473.
- 10 Braitbard O, Bishara-Shieban J, Glickstein H, Kott-Gutkowski M, Pace U, Rund DG, Stein WD (2006) An ELISA-based procedure for assaying proteins in digests of human leukocytes and cell lines, using specifically selected peptides and appropriate antibodies. *Proteome Science* 2006, 4, 14
- 11 Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B (2012) Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 939–965
- 12 Ferguson PL, Smith RD (2003) Proteome analysis of mass spectrometry. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 32, 399-424.
- 13 Sogorb MA y Vilanova E (2004) *Técnicas analíticas de contaminantes químicos aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. Díaz de Santos. ISBN: 84-7978-662-0.
- 14 O'Farrel PH. 1975 High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250(10), 4007-4021.



- 15 Vollmer M, Nägele E, Hörth P (2003) Differential proteome analysis: Two-dimensional nano-LC/MS of *E. coli* proteome grown on different carbon sources. *Journal of Biomolecular Technology* 14(2), 128–135.
- 16 Somiari RI, Somiari S, Rusell S, Shriver CD (2005) Proteomics of breast carcinoma. *Journal of Chromatography B* 815, 215–225
- 17 Blonder J, Goshe MB, Moore RJ, Pasa-Tolic L, Masselon CD, Lipton MS, Smith RD (2002) Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 1, 351-361.
- 18 Agilent Technologies (2009) Guía de selección de columnas para HPLC Agilent, Número de publicación 5990-4435ES, [www.agilent.com/chem/store](http://www.agilent.com/chem/store)
- 19 Douglas DJ, Collings BA, Numao S, Nesaty VJ (2001) Detection of noncovalent complex between  $\alpha$ -amylase and its microbial inhibitor tendamistat by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15, 89-96.
- 20 Skoog D, Holler FJ, Nieman TA (2001) Principios de análisis instrumental, 5ª ed, McGraw-Hill.
- 21 Lennon JJ, Walsh KA (1999) Locating and identifying posttranslational modifications by in-source decay during MALDI-TOF mass spectrometry. *Protein Science* 6(11), 2487-2493.
- 22 Hernández L (2002) Introducción al análisis instrumental, 1ª edición, editorial Ariel.
- 23 Agilent Technologies (1999 Junio). Reversed phase HPLC of fatty acids. Número de publicación 5990-8158EN. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59686294.pdf>
- 24 Agilent Technologies (1999b Junio). Spectral analysis of peptides and proteins using diode-array detection for important structural information. Número de publicación 5968-6294E.



- 25 Agilent Technologies (2001 Febrero).CL-MS, Basics of LC/MS, Primer.Número de publicación 5988-2045EN.  
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59686294.pdf>
- 26 Rubinston KA, Rubinson JF (2000) Chromatography In: Contemporary instrumental analysis. Prentice Hall.Upper Saddle River, NJ, EU.
- 27 Pitt JJ (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry.*Clinical Biochemistry Reviews* 30, 19-34.
- 28 Swartz ME (2005) Ultra performance liquid chromatography (UPLC): an introduction. Separation science redefined 1-11.  
[www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com)
- 29 Agilent (2003 Octubre). Improved 2D nano LC/MS for proteomics,
- 30 Martín-Gómez C, Ballesteros-González M. 2007.Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- 31 Parker CE, Warren MR, Mocanu V (2010) Mass spectrometry for proteomics In: Neuroproteomics. Alzate O, editor. Boca Raton (FL): CRC Press. Capítulo 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56011/>
- 32 Agilent Technologies (2012, Marzo).Agilent 6400 Series Triple quadrupole LC/MS System, G3335-90127.
- 33 [www.Agilent.Com/ChEm/IC](http://www.Agilent.Com/ChEm/IC)
- 34 [http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007\\_s00216-011-5207-9-3](http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_s00216-011-5207-9-3)