

M^a Pilar Lapieza Remón

Aportación de la cromatografía en capa fina de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas y de la fluorescencia de flavoenzimas a la lipidómica y a otros problemas del análisis de lípidos

Departamento
Química Analítica

Director/es
Cebolla Burillo, Vicente Luis
Sanz Vicente, Isabel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**APORTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA
FINA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y DE LA
FLUORESCENCIA DE FLAVOENZIMAS A LA
LIPIDÓMICA Y A OTROS PROBLEMAS DEL
ANÁLISIS DE LÍPIDOS**

Autor

M^a Pilar Lapieza Remón

Director/es

Cebolla Burillo, Vicente Luis
Sanz Vicente, Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Analítica

2018

- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS -

INSTITUTO DE CARBOQUÍMICA

GRUPO DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

**APORTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE
ALTA EFICACIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS Y DE LA FLUORESCENCIA DE FLAVOENZIMAS A
LA LIPIDÓMICA Y A OTROS PROBLEMAS DEL ANÁLISIS
DE LÍPIDOS**

TESIS DOCTORAL

M^a Pilar Lapieza Remón

- UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA -

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

GRUPO DE BIOSENSORES ANALÍTICOS

ZARAGOZA, 2018

Instituto de Carboquímica (CSIC)

Miguel Luesma Castán, 4

50018 Zaragoza (España)

Tel: (+34) 976733977

Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias (Edif. D)

Pedro Cerbuna, 12

50009 Zaragoza (España)

Tel: (+34) 976761290

Dña. Isabel Sanz Vicente, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y D. Vicente Luis Cebolla Burillo, Investigador Científico del Instituto de Carboquímica de Zaragoza,

CERTIFICAN,

que la presente Memoria titulada:

“APORTACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y DE LA FLUORESCENCIA DE FLAVOENZIMAS A LA LIPIDÓMICA Y A OTROS PROBLEMAS DEL ANÁLISIS DE LÍPIDOS”,

correspondiente al Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, ha sido realizada por **Dña. M^a Pilar Lapieza Remón** en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y el Instituto de Carboquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Zaragoza, bajo nuestra dirección para optar al grado de Doctor.

Y asimismo,

AUTORIZAN

la presentación de la citada Memoria de Tesis Doctoral para su defensa y calificación ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 14 de marzo de 2018,

Fdo. Isabel Sanz Vicente

Fdo. Vicente Luis Cebolla Burillo

Este trabajo se ha desarrollado dentro de proyectos de investigación diferentes:

- *“Desarrollo de un sistema de diagnóstico y monitorización del tratamiento de las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) basado en separación por Desarrollo Múltiple Automático-Cromatografía en Capa Fina y detección por densitometría de barrido”*. CTQ2012-35535.

Gracias al MINECO por el contrato FPI con referencia BES-2013-063673 asociado a este proyecto.

- *“(Nano)plataformas enzimáticas label-free para el control de aminos biógenas en alimentos. Biosensores y envases inteligentes”*. CTQ2016-76846-R.
- *“Desarrollo de nanobiosensores ópticos reversibles basados en proteínas autoindicadoras. Estudio de su utilización como dispositivos de monitorización implantados”*. CTQ2012-34774.
- *“Desarrollo de sensores químicos que facilitan el aprovechamiento sostenible de aceites usados en alimentación”*. GA-LC-036/2011.
- *“Grupo de Nanoterapia y Nanobiosensores (NAP)”*. G.C.I.A. E93.

Agradecimientos

Quiero aprovechar estas líneas para dar las GRACIAS a todas las personas, que de una forma u otra, me habéis ayudado y habéis hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis directores Isa y Vicente que me habéis brindado la oportunidad de llevar a cabo este doctorado. Durante todo este camino que hemos realizado juntos, me he guiado por vuestra motivación científica, acompañada de vuestra experiencia, confianza y amistad. Gracias por creer en mí y por todas vuestras enseñanzas.

A Javier y Susana, porque un día me abristeis las puertas de vuestro laboratorio, por toda la ayuda, apoyo y orientación que he recibido de vosotros iniciándome en este mundo de la investigación.

Para mis compañeros del grupo de Biosensores Analíticos de la Facultad de Ciencias solo tengo palabras de agradecimiento: a las dos Elenas, Estefanía, Melisa, Arancha, Andrés, Javi, Carlos, Ester, Jesús, Alba y el resto de compañeros del departamento de Química Analítica, por todos esos buenos ratos de laboratorio (y lo que no es laboratorio) que hemos pasado juntos, por vuestro compañerismo y por estar ahí siempre que os he necesitado.

A mis compañeros del Instituto de Carboquímica gracias por esta última etapa que hemos vivido: a Luis, Jesús, Rosa, las dos Cármenes, de nuevo a Andrés, Pilar, Sergio, Sandra, Chus, Teresa, Javi, Cristina, Isabel, Anabel y tantos otros... porque he tenido la inmensa suerte de poder contar con vosotros. De igual modo, quiero agradecer al resto de personas que formáis el Instituto porque ha sido un placer compartir juntos estos últimos años.

Por otra parte, este trabajo se ha logrado gracias a la colaboración de Jesús Martínez de la Fuente, Vanesa Andreu, Pilar Alfonso, Colette Jungas y

Melanie Broszat; por suministrarnos las muestras y los equipos necesarios para que esto pudiera salir adelante.

A María, Jesús e Iñaki, nuestros expertos en espectrometría de masas, por todo vuestro tiempo que nos habéis dedicado.

Thanks to Gertrud E. Morlock for her help and for giving me the opportunity to spend several months learning from her experience in the Institute of Nutritional Science (Justus-Liebig-University) in Giessen (Germany).

A mis amigas Vero, las dos Estheres, Nati, Asun y Mapi, por vuestra amistad de tantos años, por todos vuestros ánimos y por estar siempre tan cerca de mí. A los amigos de mi marido y ahora míos, a los Cinefiestas, en especial a mis Damas de Loreto, al conjunto de la Coral de Santa Engracia con Ricardo al frente y a mis queridas Divinas, a mis amigos del Prendimiento, junto con el resto de mi familia, por todo vuestro apoyo.

A M^a José, Nacho y a mis pequeños sobris María e Ignacio, gracias por ser mi segunda familia, por todo el cariño y alegría que me transmitís en cada momento que pasamos juntos, no cambiéis nunca.

A mis padres, gracias por todo vuestro esfuerzo y consejos desde el inicio de esta aventura, y especialmente por ser el pilar fundamental de todo lo que soy.

A Emilio, mi marido porque has sido mi mayor motivación, por estar siempre junto a mí apoyándome, por todo lo que hemos vivido juntos y lo que aún nos queda por vivir. A tu lado el tiempo pasa volando.

A mis padres, Chéncho y M^a José

A mi marido, Emilio

“Lo que sabemos es una gota de agua;

lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
AMD2	Desarrollo múltiple automático 2
AP	Fosfatasa alcalina
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ATS4	Inyector automático de muestra TLC 4
au	Unidad arbitraria
Ch	Colina
Ch-PL	Fosfolípidos que contienen colina
CHCl₃	Cloroformo
ChoP	Fosfato de colina, fosforilcolina, fosfocolina
ChOx	Colina oxidasa
ChOx-FS	Colina oxidasa unida a fluoresceína
ChOx-SE	Colina oxidasa unida a succinimidil éster
CID	Disociación inducida por colisión
CL	Cardiolipinas
DART	Direct analysis in real time
DCM	Diclorometano
DG	Diacylglicéridos
EDL	Enfermedades de depósito lisosomal
ESI	Ionización por Electrospray
EtOH	Etanol
FA	Ácidos grasos
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FDIC	Detección fluorescente por cambios de intensidad

FS	Fluoresceína
Gb₃	Globotriaosilceramidas
Gb₄	Globotetraosilceramidas
GluCer	Glucosilceramidas
HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPTLC	Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta resolución
IT-MS	Espectrometría de Masas de trampa de iones
LacCer	Lactosilceramidas
LC-MS	Cromatografía Líquida en Columna acoplada a Espectrometría de Masas
LESA®	Liquid Extraction Surface Analysis
liso-Gb₃	Liso-globotriaosilceramidas
liso-SL	Liso-esfingolípidos
LOD	Límites de detección
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MeOH	Metanol
MG	Monoacilglicéridos
MP	Proteínas de membrana
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Espectrometría de Masas en tándem dos etapas
MSⁿ	Espectrometría de Masas en tándem multi-etapas
m/z	Relación masa/carga
PC	Fosfatidilcolinas
PDL	Complejo Proteína-Detergente-Lípido
PE	Fosfatidiletanolaminas

PG	Fosfatidilgliceroles
PL	Fosfolípidos
PT	Proteínas de transporte
QqQ	Triple cuádrupolo
QTOF	Cuádrupolo tiempo de vuelo
SE	Succinimidil éster
SL	Esfingolípidos
SM	Esfingomielinas
TBME	<i>terc</i> -butil metil éter
TG	Triacilglicéridos
THF	Tetrahidrofurano
Trp	Triptófano

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	LÍPIDOS, MEZCLAS COMPLEJAS DE LÍPIDOS Y LIPIDÓMICA	1
1.2	ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA LIPIDÓMICA: TECNOLOGÍAS	5
1.2.1	Técnicas de ionización	5
1.2.1.1	ESI.....	5
1.2.1.2	MALDI.....	8
1.2.2	Analizadores de masas y técnicas MS tandem y alta resolución, HRMS	8
1.3	IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS.....	10
1.4	ENFOQUES ACTUALES DE LA MS EN LIPIDÓMICA.....	13
1.4.1	Shotgun.....	13
1.4.2	LC-MS.....	14
1.4.2.1	<i>Ventajas e inconvenientes de LC-MS</i>	16
1.5	VARIABLES Y DIFICULTADES DEL ANÁLISIS LIPIDÓMICO POR MS.....	17
1.5.1	Supresión iónica	18
1.6	SEMICUANTITATIVIDAD Y CUANTITATIVIDAD EN EL ANÁLISIS LIPIDÓMICO	19
1.6.1	Obtención de perfiles semicuantitativos dentro de una clase de lípidos.....	20
1.7	LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC), SU ACOPLAMIENTO CON MS Y SU POTENCIAL USO PARA LA LIPIDÓMICA.....	22
1.7.1	Acoplamiento HPTLC-MS: estado del arte.....	24
1.7.1.1	<i>Técnicas basadas en la elución</i>	25
1.7.1.2	<i>Técnicas basadas en la desorción</i>	29
1.8	OTRO PUNTO DE VISTA: MÉTODOS SELECTIVOS ENZIMÁTICOS.....	31
1.8.1	Fluorescencia de las flavoenzimas: Metodología enzimática	33
1.9	JUSTIFICACIÓN, INTERÉS Y OBJETIVOS	37
1.9.1	HPTLC-MS tandem/HRMS.....	38
1.9.2	Metodologías enzimáticas basadas en la fluorescencia	42

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1	INTRODUCCIÓN	47
2.2	TÉCNICA BASADA EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC).....	47
2.2.1	Placas de HPTLC	47
2.2.2	Aplicación de la muestra.....	47
2.2.3	Desarrollo cromatográfico.....	49
2.2.4	Impregnación post-cromatográfica	51
2.2.5	Calentamiento y secado post-cromatográfico	51
2.2.6	Detección, evaluación y documentación	52

2.3 TÉCNICA BASADA EN HPTLC ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPTLC-MS)	53
2.3.1 Acoplamiento HPTLC-MS.....	53
2.3.2 Espectrometría de masas (MS)	57
2.4 TÉCNICA BASADA EN ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	60
2.4.1 Lector de placas.....	60
2.4.2 Fluorímetro.....	62
2.5 OTRO MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO.....	64
2.6 REACTIVOS	64
2.6.1 Patrones y muestras	64
2.6.1.1 Identificación de SL en plasma humano.....	65
2.6.1.2 Identificación de lípidos neutros y ácidos grasos (FA) en biodiésel.....	65
2.6.1.3 Identificación de fosfolípidos (PL) unidos a proteínas de membrana en bacterias púrpuras fotosintéticas	66
2.6.1.4 Identificación de Ch-PL en leche materno-infantil.....	66
2.6.2 Disolventes generales.....	67
2.6.3 Sondas fluorescentes	68
2.6.4 Agentes derivatizantes selectivos de azúcares	70

CAPÍTULO 3: SEPARACIÓN, OBTENCIÓN DE PERFILES E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MOLECULARES DE ESFINGOLÍPIDOS NEUTROS EN PLASMA HUMANO

3.1 INTRODUCCIÓN	75
3.1.1 HPTLC de SL.....	76
3.2 OBJETIVOS	79
3.3 RESULTADOS.....	81
3.3.1 Preparación de muestra.....	81
3.3.2 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC.....	82
3.3.3 Desarrollo cromatográfico AMD.....	85
3.3.4 Detección por densitometría de barrido.....	87
3.3.5 Obtención de perfiles e identificación de SM en extractos de plasma humano	89
3.3.6 Obtención de perfiles e identificación de Gb ₃ en extractos de plasma humano	94
3.3.7 Obtención de perfiles e identificación de Gb ₄ patrón.....	99
3.3.8 El problema de la liso-Gb ₃	102
3.3.8.1 Separación HPTLC en fase reversa con desarrollo cromatográfico AMD de liso-Gb ₃ en el extracto acuoso de plasma	103
3.3.8.2 Detección mediante videodensitometría	104
3.3.8.3 Obtención de perfiles e identificación de liso-Gb ₃ patrón.....	105

CAPÍTULO 4: SEPARACIÓN, OBTENCIÓN DE PERFILES E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MOLECULARES DE LÍPIDOS NEUTROS Y ÁCIDOS GRASOS EN BIODIÉSEL

4.1 INTRODUCCIÓN	111
4.1.1 HPTLC de biodiésel	112
4.2 OBJETIVOS	114
4.3 RESULTADOS	115
4.3.1 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC	115
4.3.2 Desarrollo cromatográfico AMD	117
4.3.3 Detección por densitometría de barrido. Evaluación densitométrica	124
4.3.4 Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de MG en FAME	126
4.3.5 Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de DG en FAME	130
4.3.6 Obtención de perfiles e identificación de FA en FAME	131

CAPÍTULO 5: IDENTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS UNIDOS A PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN BACTERIAS PÚRPURAS FOTOSINTÉTICAS

5.1 INTRODUCCIÓN	137
5.1.1 Las MP del aparato fotosintético de las bacterias púrpuras	138
5.1.2 Solubilización de MP	140
5.1.3 Influencia de los fosfolípidos en la solubilización y cristalización de las MP	141
5.1.4 Influencia de los fosfolípidos en la función de las MP de bacterias fotosintéticas	143
5.1.5 Técnicas analíticas para caracterización de los PL de membrana	145
5.2 OBJETIVO	147
5.3 RESULTADOS	148
5.3.1 Preparación de muestra	148
5.3.1.1 Aislamiento de las membranas	148
5.3.1.2 Aislamiento del complejo RC-LH1-PufX de <i>Rhodobaca bogoriensis</i>	149
5.3.2 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC	149
5.3.3 Desarrollo cromatográfico AMD	150
5.3.4 Los patrones de las clases de PL y su análisis por HPTLC-MS	152
5.3.5 Artefactos tipo “clúster”	158
5.3.6 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de <i>Rhodobacter (Rb.) blasticus</i>	158
5.3.7 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de <i>Rhodospirillum (Rd.) rubrum</i>	160
5.3.8 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de <i>Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis</i> A, B, y en el complejo purificado	161
5.3.9 Cadenas impares de ácidos grasos en PL	165
5.3.10 Especies de CL en extractos de membrana y en el complejo purificado	165

5.3.10.1 Modos de ionización de CL	166
5.3.10.2 ESI-MS negativo.....	167
5.3.10.3 ESI-MS positivo	169

CAPÍTULO 6: DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS QUE CONTIENEN COLINA EN LECHE MATERNO-INFANTIL MEDIANTE REACCIONES BASADAS EN LA FLUORESCENCIA DE LAS FLAVOENZIMAS

6.1 INTRODUCCIÓN	177
6.1.1 Fosfolípidos que contienen colina	177
6.1.2 Estrategias para el análisis de Ch-PL.....	178
6.2 OBJETIVOS	180
6.3 RESULTADOS EN DISOLUCIÓN	181
6.3.1 Preparación y tratamiento de muestra.....	181
6.3.2 Preparación de la enzima modificada ChOx-FS.....	182
6.3.3 Señal analítica	183
6.3.4 Optimización de parámetros.....	186
6.3.4.1 Concentración de enzima.....	186
6.3.4.2 pH de trabajo	188
6.3.5 Características analíticas para la determinación de ChoP.....	190
6.3.5.1 Consideraciones sobre la determinación de Ch y ChoP.....	191
6.3.6 Determinación de Ch y ChoP en leche materno-infantil.....	193
6.3.6.1 Eliminación de interferencias.....	194
6.3.6.2 Determinación enzimática de Ch y ChoP en la muestra.....	196
6.4 RESULTADOS CON EL BIOSENSOR.....	196
6.4.1 Preparación de la enzima modificada ChOx-FS y ChOx-SE para medidas en lámina.....	196
6.4.2 Preparación de la lámina sensora	197
6.4.3 Procedimiento experimental	197
6.4.4 Sensor de colina (Ch)	198
6.4.4.1 Ensayos previos. Elección del modificante enzimático	198
6.4.4.2 Optimización	204
6.4.4.3 Características analíticas.....	207
6.4.5 Sensor de fosfato de colina (ChoP).....	209

CHAPTER 7: THESIS SUMMARY

7.1 SCOPE.....	215
7.2 DEVELOPMENT OF A PLATFORM BASED ON HPTLC COUPLED TO DENSITOMETRY AND TO TANDEM-MS/HRMS	216

7.3 INFORMATION OBTAINED FROM THE MS SPECTRA OBTAINED FROM THE CHROMATOGRAPHIC PLATE. NOVELTY OF THE APPROACH.	217
7.4 APPLICATIONS.....	218
7.5 COMMENTS ON THE PROPOSED TECHNIQUE.....	229
7.6 ANOTHER POINT OF VIEW: ENZYMATIC SELECTIVE METHODS	230
7.6.1 Ch and ChoP determination in solution	232
7.6.2 Biosensor results	235

CHAPTER 8: GENERAL CONCLUSIONS

GENERAL CONCLUSIONS.....	239
--------------------------	-----

ANEXOS

A1. SECUENCIAS DE DESARROLLO CROMATOGRÁFICO ESTUDIADAS.....	247
A2. BIBLIOGRAFÍA	255

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 LÍPIDOS, MEZCLAS COMPLEJAS DE LÍPIDOS Y LIPIDÓMICA

Aunque no existe una definición satisfactoria o aceptada del término “lípidos”, podemos decir que, con pocas excepciones, los lípidos son moléculas anfifílicas, con partes hidrofóbicas e hidrofílicas, que, junto con las proteínas y los hidratos de carbono, constituyen los principales componentes estructurales de la célula.

El término lipidoma apareció por primera vez en la literatura en 2001, precisamente en un artículo sobre TLC “Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: Suitable methods for “lipidome” analysis”, que es uno de los objetivos de esta Tesis [1].

El término lipidómica hace referencia a la disciplina de investigación basada en el análisis de lípidos a gran escala mediante el estudio de los mecanismos subyacentes, el tráfico y la homeostasis en un sistema biológico después de un estímulo o crecimiento. Es decir, la identificación de las especies y el estudio de las reacciones que implican lípidos celulares en sistemas biológicos. La investigación en lipidómica incluye la identificación y cuantificación de las miles de especies moleculares de lípidos celulares y sus interacciones con otros metabolitos. Algunos autores estiman unas 10^5 especies, que pueden agruparse en una centena de clases [2]. Otros varían entre unas decenas de miles a millones [3, 4].

De entre esta gran variedad, definimos a continuación aquéllas que se encontrarán en esta Memoria. En primer lugar, distinguiremos entre categorías, clases, subclases y especies moleculares individuales.

La categoría de glicerolípidos engloba las especies de lípidos que sólo pueden ser hidrolizadas para dar glicerol, un grupo azúcar, ácidos grasos, y/o variantes alquiladas. Incluyen, entre otras, las clases monoacilglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG) y triacilglicéridos (TG), que aparecerán en el presente estudio y que constan de un esqueleto glicerol con ácidos grasos unidos a los grupos hidroxilo del glicerol (**Figura 1.1**).

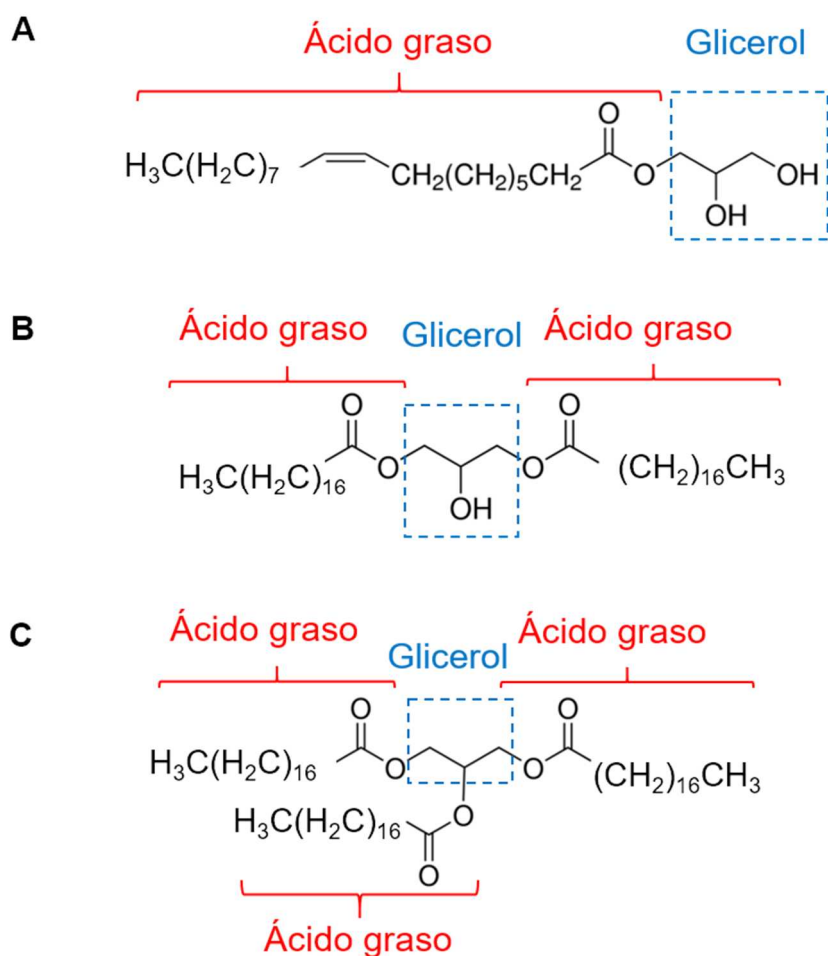


Figura 1.1 Estructura básica de los glicerolípidos: molécula de glicerol con ácidos grasos unidos a los grupos hidroxilo. Ejemplos: **A**) 1-oleoil-*rac*-glicerol (MG), **B**) gliceril 1,3-diesterato (DG) y **C**) gliceril triesterato (TG).

La categoría de glicerofosfolípidos (o fosfolípidos) se define por la presencia de al menos un grupo fosfato (o fosfonato) esterificado a uno de los grupos hidroxilo del glicerol. Es un grupo clave en los componentes celulares, metabolismo y señalización celular y está compuesto de diferentes clases, subclases y especies moleculares individuales. En la figura se muestran las clases que se tratarán en este estudio (**Figura 1.2**). De entre las subclases, sólo nos referiremos a la fosfatidil- (-O-CO-CH₂-R₁) dado que las subclases plasmanil- (-O-CH₂-CH₂-R₁) y plasmenil- (-O-CH=CH-R₁) no están presentes en las muestras sujeto de este trabajo.

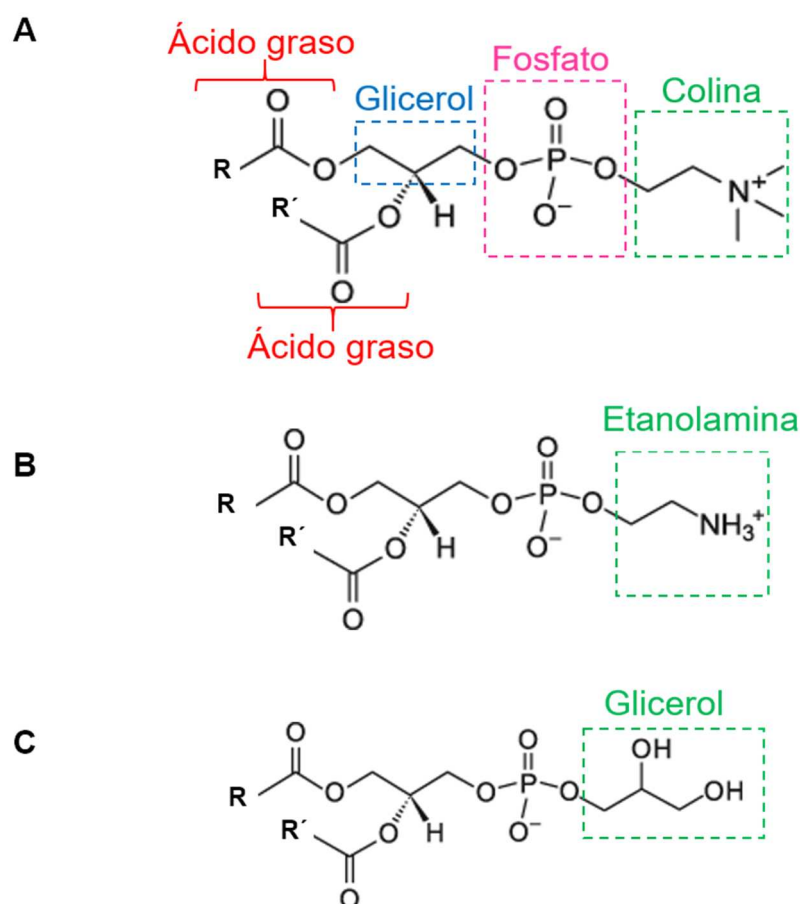


Figura 1.2 Estructura básica de los glicerofosfolípidos (o fosfolípidos): molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otras moléculas (p. ej. colina, etanolamina, glicerol, etc.). Ejemplos: **A**) fosfatidilcolina (PC), **B**) fosfatidiletanolamina (PE) y **C**) fosfatidilglicerol (PG).

Los esfingolípidos (SL) son otra categoría de lípidos celulares complejos. Las especies de SL contienen ceramida como estructura central. En nuestro caso (plasma de humanos) la base esfingoide predominante es esfingosina. Como en otras categorías, existe una gran variabilidad en las clases (Grupos de azúcares, globotriaosilceramidas (Gb₃), lactosilceramidas (LacCer), glucosilceramidas (GluCer), esfingomielinas (SM), etc.) (**Figura 1.3**).

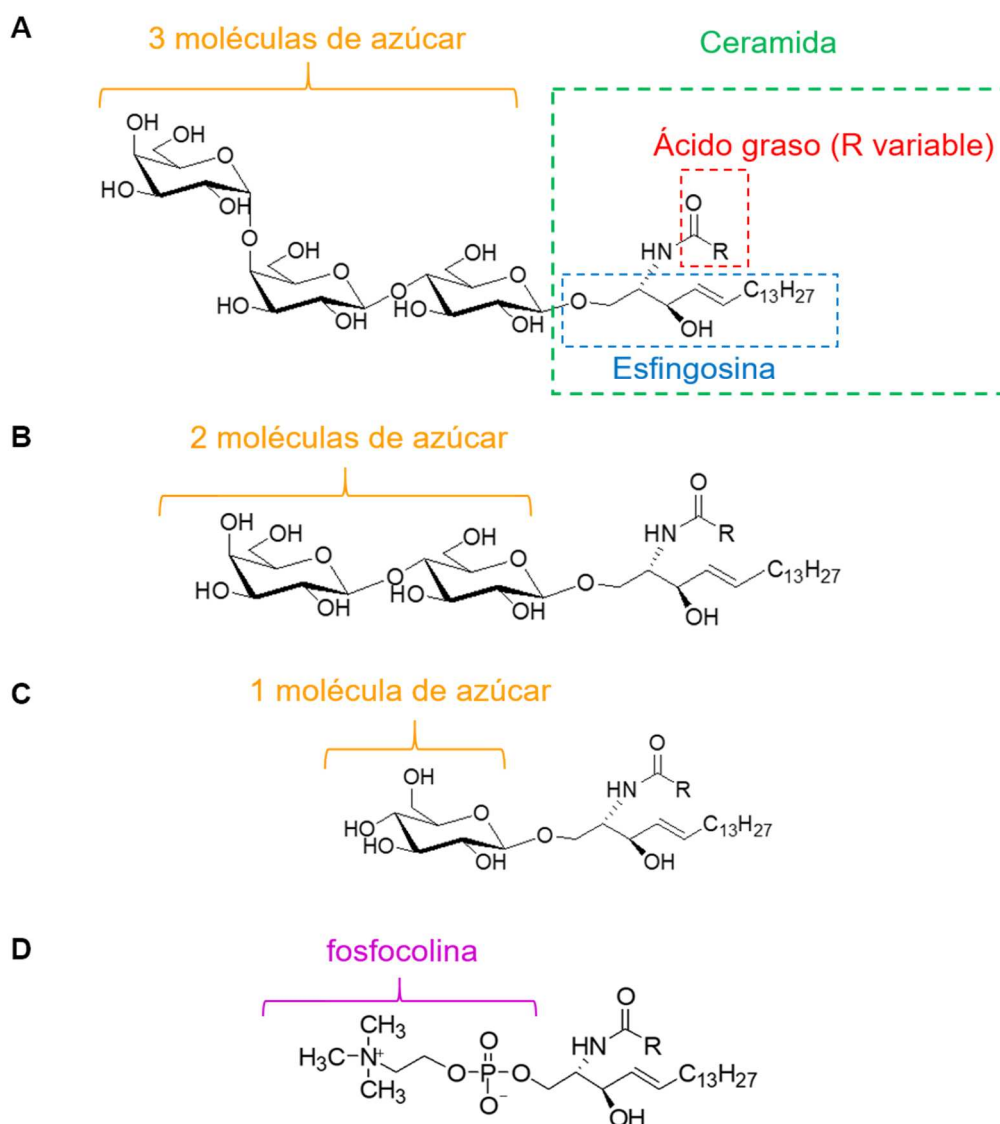


Figura 1.3 Estructura básica de los esfingolípidos: esqueleto de ceramida (formada por el grupo esfingosina y un ácido graso con R variable) y grupo unido en el alcohol primario. Ejemplos: **A)** Gb₃, **B)** LacCer, **C)** GluCer y **D)** SM.

La clase de ácidos grasos pertenece a la categoría de acilos grasos junto con eicosanoides, docosanoides, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres grasos, y otros, que son los lípidos más simples. Se caracterizan todos ellos por tener en su estructura series repetitivas de grupos metileno. Los ácidos grasos son también bloques básicos de otras categorías y clases de lípidos más complejos, tales como los glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, etc., y que dan un alto grado de variedad a las estructuras moleculares individuales dentro de las clases y subclases.

En general, cada clase de lípidos comprende una variedad de especies de lípidos que contienen un grupo de cabeza idéntico y varias cadenas acilos grasos de diferentes números de átomos de carbono y grados de insaturación.

Los avances en tecnología analítica, especialmente en Espectrometría de Masas (MS) a presión atmosférica, han impulsado la investigación lipidómica y, en general, la del análisis de lípidos en matrices complejas de interés industrial, la mayoría de ellas relacionadas con la alimentación y la bioenergía [5-7].

Aunque la plataforma más utilizada es, sin duda, su acoplamiento con Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en columna, no hay un único esquema basado en MS que pueda cubrir la detección del lipidoma completo debido a la diversidad de las estructuras moleculares existentes [8]. El análisis suele ser finalmente abordado mediante una combinación de diferentes aproximaciones experimentales. Dependiendo de la técnica y la instrumentación se pueden obtener diferentes tipos y niveles de información sobre la estructura molecular de los metabolitos, con diversos grados de sensibilidad y selectividad.

1.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA LIPIDÓMICA: TECNOLOGÍAS

1.2.1 Técnicas de ionización

El analito es ionizado en la fuente de iones. Las dos fuentes de iones más importantes son la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

1.2.1.1 ESI

Las disoluciones son directamente transformadas en moléculas gaseosas ionizadas aplicando un alto voltaje a la disolución, que crea un fino aerosol de gotas altamente cargadas. Simultáneamente, también se aplica

calor y N₂ seco a las gotas cargadas para evaporar el disolvente a presión atmosférica.

ESI es una técnica de ionización suave, muy poco destructiva, que permite la observación de moléculas intactas con una o múltiples cargas. Se analizan fundamentalmente iones moleculares e incluso aductos, dímeros y otros complejos muy débilmente unidos en disolución, y que son detectados como agregados o complejos no-covalentes. Así, hablamos de mínima fragmentación en la fuente [5].

El número de cargas de una molécula particular depende de varios factores tales como estructura, tamaño, composición, disolventes y parámetros instrumentales. En general, se producen iones con una, dos o tres cargas en el caso de moléculas con pesos moleculares $<2 \cdot 10^3$ Da, mientras que para moléculas mayores, se observan iones con más de tres cargas. Esta capacidad de producir iones moleculares con múltiples cargas hace posible observar moléculas muy grandes tales como proteínas o fragmentos de ADN. También permite la detección de iones monocargados de bajo peso molecular [9].

ESI es la ionización más utilizada en el caso de los lípidos. Los procesos de ionización molecular pueden conducir a iones positivamente o negativamente cargados. Por ejemplo, se suele observar aductos protonados, con amonio o álcali en los espectros de masas ESI para moléculas positivamente cargadas, mientras que en el caso de las negativamente cargadas se observan moléculas desprotonadas [10].

Generalmente, la ionización en modo ESI positivo se usa para moléculas con grupos funcionales que aceptan fácilmente un protón (tal como las aminas), mientras que la ionización ESI en modo negativo se usa para moléculas con grupos funcionales que pierden fácilmente un protón (tal como los ácidos carboxílicos). Aunque la mayoría de las moléculas pueden ser inicialmente ionizadas en modo positivo, no siempre se puede llevar a cabo de manera satisfactoria. A menudo, puede ser necesario el uso del modo negativo ya que a veces genera menos ruido de fondo que el modo positivo.

ESI presenta una elevada sensibilidad, con LOD a concentraciones entre $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, que mejora con los nuevos desarrollos. Además, presenta dos características de gran importancia:

- Debido a su mínima fragmentación en la fuente, puede utilizarse en modo tándem tras la fragmentación inducida de uno o más iones seleccionados por colisión con gas inerte (Collision-Induced Dissociation, CID) (**Sección 1.3**). Esta propiedad es fundamental para el análisis de lípidos (**Sección 1.5**).
- Como ESI es una ionización muy adaptable desde el punto de vista de disolventes, flujo, modificadores, es fácilmente acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) [11] (**Sección 1.4.2**).

En el caso particular del análisis lipídico, hay que tener en cuenta que la mayoría de los lípidos son poco solubles en disolventes polares, así que forman agregados, micelas o vesículas conforme aumenta su concentración y, en estado agregado, no pueden ser eficientemente y cuantitativamente ionizados. Los disolventes orgánicos serán favorables en el análisis lipídico pues mejoran la solubilidad de los lípidos y también la desolvatación (p. ej. MeOH, CHCl_3 , etc.) y, en general, la ionización ESI.

Además, para decrecer el tamaño inicial de la gota y facilitar más la ionización, se añaden compuestos que pueden aumentar la conductividad (p. ej. HAc, HCO_2H , etc.).

Una especie de lípido puede aparecer en una variedad de tipos de iones bajo condiciones experimentales diferentes. Esta propiedad es importante para nuestro análisis pues los lípidos neutros pueden formar fácilmente aductos con pequeños cationes y aniones. En general, casi todos los lípidos no volátiles pueden ser ionizados.

Las especies individuales de lípidos pertenecientes a una misma clase, dado que poseen idénticas propiedades de carga intrínsecas debidas a la cabeza del grupo polar, poseen eficiencias de ionización (o factores de

respuesta) muy similares cuando se realiza ESI-MS en determinadas condiciones experimentales [5, parte III].

1.2.1.2 MALDI

Es otra técnica de ionización suave que empezó siendo una técnica de vacío. Fue la primera técnica de ionización a la que se acopló la HPTLC. Por este motivo, explicaremos su fundamento, ventajas, limitaciones generales y su aplicación a los lípidos más adelante (**Sección 1.7.1.2 A**).

1.2.2 Analizadores de masas y técnicas MS tándem y alta resolución, HRMS

Los iones resultantes se transmiten al analizador de masas, donde son separados conforme a su m/z . La tecnología es variada si bien los más utilizados para la lipidómica son los descritos a continuación, basados en cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF) y trampa de iones (IT-MS).

- Un **cuadrupolo (Q)** utiliza campos eléctricos oscilantes para estabilizar o desestabilizar selectivamente el flujo de iones que pasa a través de un campo de radiofrecuencia creado por cuatro barras paralelas. Solo los iones en un cierto rango de m/z pasan a través del sistema en un tiempo dado, pero los cambios en los potenciales de las barras permiten barrer rápidamente un amplio rango de m/z , o bien continuamente, o por una sucesión de saltos discretos. Un Q actúa como un filtro selectivo de masa.

Un **triple cuadrupolo (QqQ)** consta de tres cuadrupolos consecutivos. El primero actúa como un filtro de masa para transmitir un ion particular al segundo cuadrupolo, que constituye la celda de colisión. Allí el ion es fragmentado tras colisionar con un gas inerte (p. ej. He, Ar, N₂). El tercer cuadrupolo también actúa como un filtro de masa que transmite un ion particular al detector en un tiempo dado, que es monitorizado proporcionando información estructural. Así, QqQ puede ser empleado para llevar a cabo distintos tipos de MS/MS.

QqQ es el instrumento más popular en lipidómica puesto que se puede usar tanto en modo “shotgun” como acoplado a LC (**Sección 1.4**) [12]. Sus limitaciones son una reducida precisión en la masa, bajo poder de resolución y limitación de tándem a la segunda etapa (MS/MS) [13].

- Los analizadores de **tiempo de vuelo (Time Of Flight, TOF)** utilizan un campo eléctrico para acelerar los iones a través de un tubo con el mismo potencial y así determinar el tiempo que tardan en llegar al detector. Presentan una alta precisión y resolución en cuanto a la determinación de la masa molecular (masa exacta) [14]. Sin embargo, los instrumentos TOF originales presentaban dificultades para determinar MS/MS. Por este motivo, se desarrollaron instrumentos híbridos con cuadrupolos (QTOF) o trampa lineal de iones (Linear Ion Trap-Time Of Flight, LIT-TOF), que han mejorado notablemente el análisis de los iones producto conservando la precisión y la resolución para determinar la masa exacta.

En esta Memoria se ha utilizado un QTOF, que proporciona una resolución de masa de $4 \cdot 10^4$ y una precisión mayor de 5 ppm, de cara a obtener la composición elemental exacta, con una rápida y eficiente obtención del espectro completo. Sin embargo, su detector tiene un limitado rango lineal.

- **Trampa de iones (Ion Trap, IT-MS)** es otro tipo de espectrómetro de masas muy utilizado en lipidómica. Un IT-MS-3D (por ejemplo, el QIT) comparte los mismos principios físicos que un cuadrupolo aunque los iones son atrapados y secuencialmente expulsados en un espacio definido por un electrodo de anillo. Un IT lineal (LIT), sin embargo, atrapa iones en un campo bi-dimensional. Ambos poseen buena sensibilidad y permiten análisis tándem multi-etapa, no sólo MS/MS, pues permiten sucesivos aislamientos y fraccionamiento de iones producto [15]. Sin embargo, la resolución y el rango dinámico que proporcionan no son muy altos. En esta Memoria se utilizará un instrumento QIT.

La última adición a la familia de analizadores de alta resolución es Orbitrap, que comienza a ser bastante utilizado en lipidómica, aunque

presenta un coste elevado [16]. Los iones en Orbitrap son electrostáticamente atrapados en una órbita alrededor de un electrodo central con forma de huso.

Los iones orbitan alrededor a lo largo del eje del electrodo. La oscilación genera imágenes de corriente cuyas frecuencias dependen de los m/z de los iones. Los espectros de masas se obtienen a partir de las transformadas de Fourier de esas funciones. Presentan alta sensibilidad, altas precisión/resolución y ya se presentan en tamaño “bench-top”. Se están desarrollando híbridos LIT-Orbitrap (o Qq-Orbitrap). Estos instrumentos se consideran los sucesores de los analizadores de sector magnético como la resonancia ion-ciclotrón con Transformada de Fourier (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR).

1.3 IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La técnica de ionización ESI-MS proporciona una mínima fragmentación en la fuente, que es una gran ventaja y hace que pueda ser utilizada para obtener información estructural. Sin embargo, esto se suele complicar debido a que son muchas las especies que entran simultáneamente en la fuente, aunque ESI-MS esté acoplada a una separación cromatográfica. Así que la identificación de los lípidos debe pasar por el uso de las técnicas tándem, que requieren, o bien analizadores múltiples (p. ej. triple cuadrupolo), o trampa de iones.

Mientras que el esquema de fragmentación de una clase de lípidos depende de su estructura química y su carga, la aparición de iones producto tras disociación inducida por colisión (CID) con gases inertes depende de: la energía de colisión, la presión de gas de colisión (en el caso del cuadrupolo), el tiempo de colisión en la celda (en el caso de la trampa de iones), así como del instrumento empleado [5, capítulo 6].

En el caso de los instrumentos de trampa de iones (como el utilizado en esta Memoria), la duración de colisión suele ser baja, permitiendo poco tiempo para la colisión consecutiva de los iones producto resultantes. Aunque esto puede ser una desventaja para la caracterización estructural, es una ventaja

para elucidar las vías de fragmentación. Además, la capacidad de los instrumentos tipo trampa de iones para realizar análisis ion-producto multi-etapa a través de la continua selección y fragmentación de un ion producto dado, puede compensar la generación de menos iones producto. Asimismo, las cadenas alquílicas de los ácidos grasos muestran gran estabilidad en condiciones de fragmentación CID de baja energía como la proporcionada por los equipos de trampa de iones [17].

Los cuatro modos principales de llevar a cabo MS/MS en lipidómica son: Product-Ion Analysis, Neutral-Loss Scan (NLS), Precursor-Ion Scan (PIS) y Selected Reaction Monitoring (SRM), y se resumen en la **Figura 1.4** (adaptada en español de [5, p. 38]).

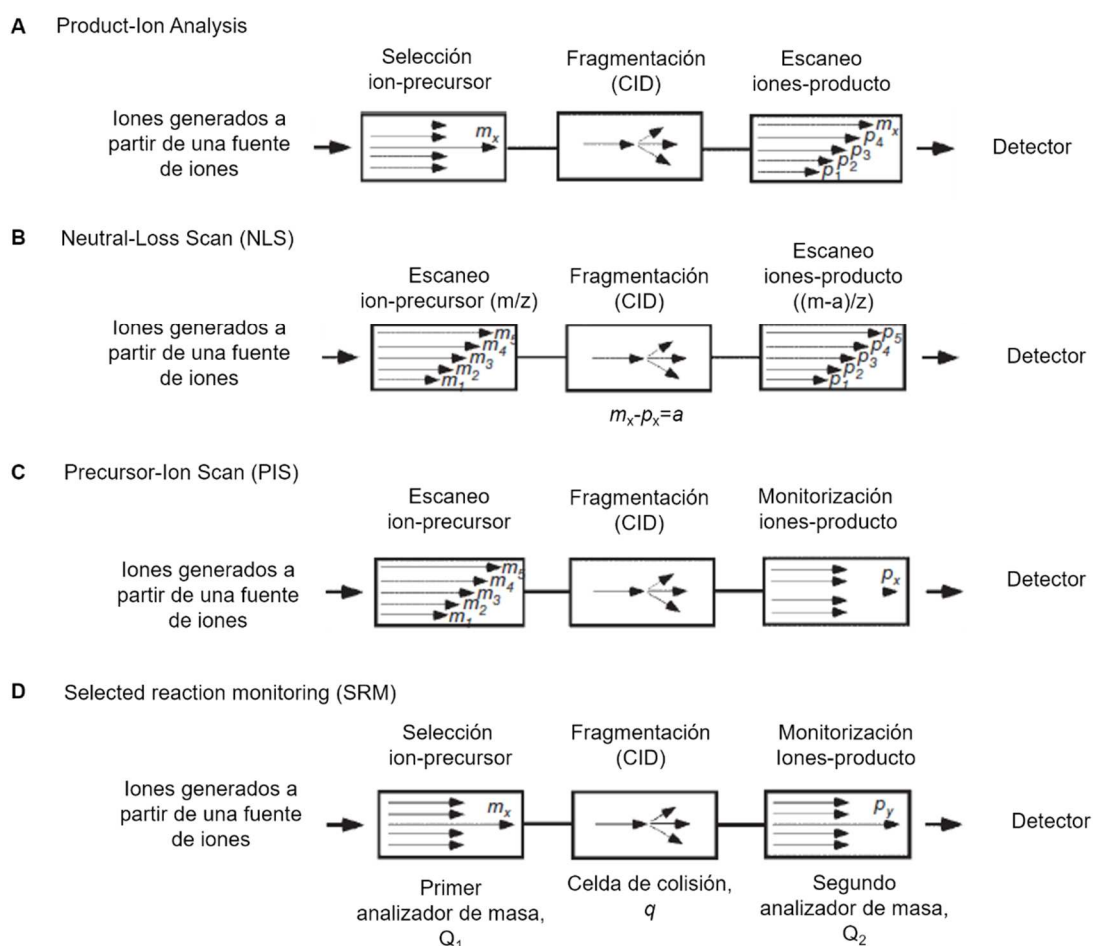


Figura 1.4 Diagrama esquemático de las técnicas de espectrometría de masas tandem. CID (disociación inducida por colisión). m_x y p_x ($x=1, 2, 3, \dots$) se refieren a iones precursor o producto, respectivamente.

En modo Product-Ion Analysis, el primer analizador de masas se usa para seleccionar un ion precursor particular de interés y transmitir sólo este ion, que es acelerado con un potencial eléctrico para inducir colisión en una celda (CID) con gases inertes. La estructura del precursor seleccionado puede ser elucidada a partir de la reconstrucción de los iones producto y/o los patrones de fragmentación, junto con la masa del precursor. Esta técnica MS/MS puede ser realizada iterativamente con la selección secuencial de iones producto resultantes para fragmentaciones subsiguientes, lo cual permite definir mecanismos de fragmentación. Esto se llama *tándem multi-etapas* (MS^n) y se lleva a cabo en equipos tipo trampa de iones [17].

Los modos NLS y PIS han sido utilizados en shotgun para detectar una clase o grupo de lípidos que poseen un fragmento idéntico, consecuencia de una diferencia constante de masa (NLS) o para detectar una clase o grupo de lípidos que producen, tras CID, el mismo ion producto (PIS) [3]. En el caso de SRM, lo que se suele es buscar un par precursor/producto, pudiéndose buscar varios pares simultáneamente (MRM, Multiple Reaction Monitoring). SRM suele ser utilizado en modo acoplado a LC, debido a la limitada cantidad de tiempo para la adquisición de datos [18]. Los modos NLS, PIS y SRM son propios de analizadores tipo triple cuadrupolo.

Con todo esto, la identificación de los lípidos incluye: las clases (definidas por los grupos de cabeza) y las subclases, ambas separadas cromatográficamente en nuestro caso, como paso previo a la identificación por MS. Luego, la longitud de las cadenas de ácidos grasos, el número total de átomos de carbono y dobles enlaces en las cadenas.

Una especie correspondiente a una misma clase lipídica puede aparecer en una variedad de tipos de iones bajo condiciones experimentales diferentes.

La obtención de la distribución posicional de los dobles enlaces en los lípidos sigue siendo un reto, aunque se están realizando avances en este sentido, fundamentalmente mediante trampa de iones con técnicas multi-etapa [19], y mediante espectrometría de masas de movilidad iónica (Ion-Mobility MS, IM-MS). IM-MS permite separar moléculas ionizadas en fase gas

basándose en su movilidad, que es función de la masa del ion, carga, tamaño y forma, en un gas portador bajo voltajes diferenciales. El área de un ion que es “golpeado” por las moléculas de gas es una sección transversal de colisión (collision cross section), que está directamente relacionada con la forma y el tamaño del ion, y es un indicador de la masa y la estructura del ion. Esta técnica puede ser utilizada acoplada en modo LC-IM-MS. Un trabajo reciente muestra su aplicación al campo de la lipidómica [20].

A pesar de los avances en Bioinformática y de la existencia de librerías y bases de datos de lípidos, es inevitable tener que recurrir en bastantes casos a una búsqueda manual para la identificación específica de una especie [5, capítulo 5].

1.4 ENFOQUES ACTUALES DE LA MS EN LIPIDÓMICA

Las dos estrategias analíticas dominantes en lipidómica se llevan a cabo mediante ESI-MS y se clasifican en: técnicas de infusión directa (shotgun) y las basadas en cromatografía de alta eficacia en columna, que se suelen denominar técnicas LC-MS.

1.4.1 Shotgun

Se caracteriza por una infusión directa de una concentración constante de la solución de lípidos durante todo el tiempo de análisis. Se basa en la hipótesis de que todas las clases de lípidos experimentan un entorno idéntico en la fuente de iones, e incluso la supresión iónica que experimentan los lípidos entre sí, dentro de una clase o entre clases diferentes, puede considerarse constante [21]. Esta aproximación ha experimentado impulso gracias al desarrollo de los sistemas de infusión basados en nano-electrospray, integrados en chips de silicio con boquillas que permiten inyectar flujos de $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ [22].

Pueden utilizarse todos los sistemas MS tándem y de alta resolución para llevar a cabo shotgun [23]. Sin embargo, la resolución de masa de la mayoría de los aparatos comercialmente disponibles no es lo suficientemente

alta para resolver completamente todos los solapamientos presentes en un análisis de lípidos por infusión directa de cara a la cuantificación [5, p. 328] [24].

Hay autores que valoran la necesidad de la introducción de una etapa cromatográfica [25].

1.4.2 LC-MS

Es quizás el enfoque analítico más popular para el análisis de lípidos. Permite aunar una tecnología de separación eficiente con la tecnología de detección más sensible. LC-MS suele ser usada para analizar compuestos no volátiles y térmicamente inestables.

La gran ventaja de LC-MS es el uso de una potente separación cromatográfica para resolver mezclas de lípidos en clases de lípidos utilizando columnas HPLC de fase normal [26], que aprovechan las interacciones polares entre los grupos de cabeza lipídicos y la fase estacionaria (p. ej. sílica gel, diol, amino, etc.) o en especies de lípidos individuales, utilizando columnas HPLC de fase reversa [27], que aprovechan la hidrofobicidad de los ácidos grasos de los lípidos, con sus diferentes longitudes de cadena, y número y posición de los dobles enlaces. Otras fases estacionarias tales como las de intercambio iónico, afinidad, interacción hidrofóbica (HIC) o de interacción hidrofílica (HILIC) han sido también utilizadas [28]. HILIC es una variante de la fase estacionaria normal pero que emplea eluyentes tipo fase reversa (p. ej. acetonitrilo, MeOH, THF, etc.) [29].

Los recientes avances en tecnología HPLC han dado lugar a las columnas tipo UPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) que, con una disminución del tamaño de partícula del relleno y mejora del empaquetamiento y de los materiales, logran columnas de pequeño tamaño y separaciones más eficaces, con una sola columna [30].

La separación en columna proporciona la dimensión de tiempo de elución para la identificación de las especies de lípidos individuales.

El segundo factor a considerar es el acoplamiento LC-MS. La ionización ESI permite evaporar continuamente el disolvente que constituye la fase móvil usada en la separación y ha llegado a ser la interfaz “estándar” en las técnicas LC-MS [11]. Conforme el eluato fluye de la columna cromatográfica, es transformado en moléculas gaseosas ionizadas. Si bien una fuerza iónica alta puede favorecer la supresión iónica, a veces la introducción de iones en la fase móvil es esencial, o bien para facilitar la formación de aductos o bien para formar gradientes de fase móvil en el caso de columnas de fase reversa.

El tercer factor a considerar es el análisis MS y MS/MS de las especies lipídicas eluidas, teniendo en cuenta que la concentración de la solución de lípidos que entra en la fuente de iones está cambiando constantemente y que la identificación de los lípidos debe hacerse en una pequeña ventana de tiempo. Existen tres métodos fundamentales para el análisis de lípidos por LC-MS:

- **SIM (Selected Ion Monitoring)**: es un método propio de LC-MS en el que el ion de interés puede ser extraído exclusivamente del cromatograma. De este modo, se obtienen todas las especies de lípidos existentes con el mismo peso molecular. Aunque se pueden obtener perfiles útiles, presenta limitaciones en cuanto a la identificación inequívoca y a la cuantitatividad [31].

- **SMR/MRM (Sección 1.3)**: esta aproximación sólo determina las especies que contienen los pares de transición predeterminados. Sin embargo, la identificación definitiva de las especies tiene que ser realizada mediante MS en modo ion-producto (Product Ion) para encajar el único esquema de fragmentación para cada lípido.

- **Product Ion Analysis (Sección 1.3)**: las especies se identifican una por una. Es una buena opción para identificación aunque está típicamente limitada a un pequeño número de iones abundantes.

1.4.2.1 Ventajas e inconvenientes de LC-MS

A pesar de que es una de las técnicas más utilizadas, se han puesto de manifiesto varios problemas asociados a la LC-MS de lípidos [5, p. 72]:

- La eficiencia en la ionización se mide generalmente a diferentes tiempos de elución en la separación LC. Esto introduce variaciones en la eficacia de la ionización ya que se usan diferentes composiciones de fase móvil.
- Cuando se separan diferentes clases de lípidos, las diferentes especies en una clase determinada no están uniformemente distribuidas en la banda eluida. Cada especie molecular individual posee su propio y distinto tiempo de retención y forma de pico, debido a las interacciones diferenciales con la fase estacionaria y los agentes par-iónicos empleados.
- Para resolver especies moleculares individuales con columnas de fase reversa, se suelen usar gradientes. Los cambios de composición de éstos pueden causar inestabilidades en la ionización y/o afectar a la eficiencia de la ionización de las especies eluidas con diferentes composiciones de fase móvil [32].
- Los gradientes utilizados en fase reversa se suelen iniciar con fases móviles acuosas, lo cual produce problemas de solubilidad dependiendo de las especies. Esto puede inducir problemas de agregación y eficiencias de ionización diferenciales. No es inusual que ciertos lípidos no sean eluidos y permanezcan en la columna [33].
- Pueden existir diferentes factores de respuesta, dentro de una determinada clase, debido a los mencionados problemas en la ionización. Asimismo, otros autores [34], han puesto de manifiesto que los sistemas LC-MS están diseñados para procesar una cantidad enorme de datos y obtener toda la información en un experimento único e individual. Una vez que la manipulación comienza, no puede ser detenida, con lo cual los experimentos acumulan cantidad de datos que pueden no ser necesarios, y son caros en tiempo y disolvente.

Algunos de estos problemas pueden ser parcialmente resueltos y enfocados de otro modo, empleando HPTLC-MS, como se explicará a lo largo de esta Memoria.

1.5 VARIABLES Y DIFICULTADES DEL ANÁLISIS LIPIDÓMICO POR MS

Las principales dificultades proceden de la enorme variabilidad y complejidad de los lipidomas celulares, pues son diferentes entre especies, tipos de células y orgánulos celulares, membranas, microdominios de membranas, etc. Además, la célula es dinámica y depende de su estatus nutricional, concentraciones hormonales, condiciones de salud y muchos otros factores, por lo que hacer análisis comparativos concluyentes es complicado. Además, los lípidos forman agregados, lo cual resulta en dificultades substanciales para el análisis cuantitativo de las especies moleculares individuales en su forma intacta por MS. Adicionalmente, existen muchas variables a considerar en cada una de las etapas del proceso analítico: preparación de muestra, introducción, separación, ionización, identificación y cuantificación.

Cómo obtener y preparar una muestra es una de las cuestiones más importantes en lipidómica, en cuanto a: almacenamiento, minimización de la oxidación y extracción.

Algunas consideraciones de importancia [5, capítulo 4], y que muestran la complejidad analítica, son:

- Muchos lípidos asociados con proteínas y polisacáridos en membranas celulares no son fácilmente extraíbles.
- Algunos lípidos pueden estar físicamente atrapados en una matriz tisular.
- Las membranas celulares de algunos organismos son menos permeables que otras a los disolventes.
- Cada clase de lípidos necesita distintos disolventes.

- Es muy difícil obtener una recuperación completa de cada clase de lípidos por cualquier método conocido de extracción. Se puede emplear un patrón interno, de la misma naturaleza que los lípidos a extraer, a fin de controlar el porcentaje de extracción.

Las condiciones de pH, la polaridad del disolvente de la extracción y las propiedades intrínsecas de los lípidos a analizar, constituyen las variables más importantes en la preparación de muestra. Posteriormente, dependiendo o no de que haya un paso cromatográfico intermedio, se deben seleccionar las variables que influyen en la ionización ESI: modo de ionización, temperatura de la fuente, voltaje del spray y flujo de eluyente. Posteriormente, en la etapa del análisis tandem-MS, hay que controlar las variables en la CID: energía de colisión, presión del gas de colisión y tipo de gas.

1.5.1 Supresión iónica

El término supresión iónica se usa para describir el hecho de que la eficiencia en la ionización o la intensidad de un compuesto o grupo de compuestos está significativamente reducida debido a la presencia de otros compuestos, cambios en los componentes de una matriz, o simplemente debido a cambios importantes de la concentración de los compuestos, como, por ejemplo, en el caso de agregación de lípidos. Tal reducción es debida a cambios en la eficiencia en la formación o desolvatación de la gota ante la presencia de dicho compuesto. Este proceso es dependiente del tipo de compuesto y su concentración [35, 36].

La supresión iónica puede afectar a la formación del ion y, por ello, al rango lineal, a la precisión de la detección, y a la fiabilidad de la cuantificación [5, p. 341-343].

Es preciso trabajar a bajas concentraciones y, aun así, la supresión iónica ocurre inevitablemente tanto en las técnicas shotgun como en LC-MS [37].

En el caso de LC-MS puede depender de la elución de varios compuestos en la misma ventana de elución (una señal suprime la otra), de

la variación de composición de la fase móvil, etc. Es conocido que el uso de detergentes puede causar supresión iónica severa en técnicas shotgun, o afectar la separación LC de los lípidos.

1.6 SEMICUANTITATIVIDAD Y CUANTITATIVIDAD EN EL ANÁLISIS LIPIDÓMICO

La cuantificación en lipidómica se puede considerar como absoluta y relativa [5, p. 304]. La determinación de los niveles cuantitativos de una especie molecular de lípido, sólo puede ser realizada en escasas ocasiones y conlleva largos y cuidadosos análisis con varios patrones internos.

La cuantificación absoluta de un lípido mediante ESI-MS puede ser realizada solamente como una medida relativa respecto a uno o varios patrones internos estables, que son isotopólogos (abreviatura de análogos isotópicamente marcados, es decir, moléculas que difieren solamente en su composición isotópica).

El problema de la determinación cuantitativa es que no existe una relación directa en MS entre la intensidad de los iones y la concentración de un analito que genera esos iones. Hay varias razones para ello, siendo las fundamentales las de tipo instrumental (diferencias en diseño de fuentes de iones, transmisión de iones, detectores, etc.) y las diferencias en las respuestas de los analitos frente a cada instrumento. Así, intensidades muy diferentes de iones pueden ser obtenidas a partir de la misma disolución en diferentes instrumentos bajo, aparentemente, idénticas condiciones experimentales. Pequeñas variaciones en estabilidad del vacío, condiciones de la fuente de iones, niveles de humedad y ruido electrónico, pueden afectar a la intensidad.

Desde la toma de muestra hasta el procesamiento de datos se debería mantener el mayor grado de fiabilidad y precisión posible. La propagación de errores debería ser pre-estimada y controlada. Sin embargo, existen muchas incertidumbres o variaciones durante todo el proceso analítico, desde el muestreo, la preparación de muestra, el análisis propiamente dicho y el

procesamiento ulterior de los datos. Así, las variaciones en el muestreo pueden ser ya sustanciales e incluso ser mayores que los errores analíticos.

Otro ejemplo que también influye en los resultados cuantitativos es el del uso de proteínas u otras biomoléculas como “normalizadores” o referencias para la determinación de una sustancia. Por ejemplo, detección de creatinina en orina para determinar indirectamente Gb₃. Este tipo de determinación añade un error no despreciable al resultado analítico. Hay que considerar también otros factores como la eficiencia en la ionización del analito, o la agregación, que influye en la solubilidad y también sobre la eficiencia en la ionización; también los instrumentos, las matrices, etc. Asimismo, la elección de métodos estadísticos y la selección personalizada de parámetros pueden llevar a conclusiones diferentes, según el operador. Han [5] considera que un método lipidómico que emplee factores de corrección para clases de compuestos, que use varios patrones internos adecuados, que corrija el sesgo en la extracción de la muestra y que controle las eficiencias en la ionización (que son dependientes de cada especie), suele proporcionar un 10% de error, que se considera aceptable.

El uso de uno o varios patrones internos (por ejemplo, en el caso de una elución LC en la que las propiedades de la fase móvil varían durante la elución) hace que el análisis cuantitativo absoluto sea impracticable y poco menos que imposible para analizar miles de especies de interés en sistemas complejos tales como los involucrados en la lipidómica [38]. En la mayoría de los casos, pues, la cuantificación no es necesaria. La semicuantificación o cuantificación relativa mide la variación del patrón de especies en un sistema lipidómico, la cual puede ser utilizada como herramienta para monitorización de un sistema tras estimulación, o para descubrir nuevos biomarcadores.

1.6.1 Obtención de perfiles semicuantitativos dentro de una clase de lípidos

Ha sido demostrado que los factores de respuesta de las especies individuales de una clase polar de lípidos por ESI-MS, dependen

predominantemente de las propiedades de la carga del grupo de cabeza en el rango de concentración de $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ o menor [5, capítulo 14] [39-42].

Las eficiencias de ionización (o factores de respuesta) de las especies moleculares individuales dentro de una clase de lípidos polares, detectada por su espectro de masas ESI completo, son esencialmente idénticas. Las cadenas acilo de sus ácidos grasos sólo contribuyen mínimamente a las eficiencias de ionización en las condiciones experimentales. De este modo, es a menudo práctico utilizar esa “constancia” en las eficiencias de ionización de las especies de una clase de lípidos para obtener un perfil semicuantitativo, que muestra una proporción relativa (normalizada) entre la intensidad de los iones de las especies moleculares de esa clase de lípidos y su abundancia en la muestra.

En el caso de los análisis LC-MS, esta propiedad no siempre se cumple y debería ser verificada antes de efectuar las medidas puesto que, si se emplea un gradiente de fase móvil o se cambia constantemente la concentración de un eluyente, puede resultar en factores de respuesta diferentes para especies lipídicas individuales dentro de una misma clase [32].

Como se verá a lo largo de esta Memoria, esto representa una ventaja de la Cromatografía en Capa Fina (HPTLC)-MS frente a LC-MS puesto que, en la primera, la fase móvil es eliminada de la placa por secado tras la cromatografía y, posteriormente, la extracción on-line mediante la interfaz se suele realizar con un único eluyente, en nuestro caso MeOH (**Sección 1.7.1.1**). Así pues, una clase de lípidos, tras ser separada mediante HPTLC y transferida al equipo de ESI-MS, mostrará una distribución de iones que representará un perfil semicuantitativo de especies moleculares de esa clase.

En general, la obtención de perfiles puede proporcionar una comparación rápida y extensiva de muestras biológicas. La ocasional falta de reproducibilidad de los perfiles puede estar asociada más a la variabilidad individual e intrínseca de las propias muestras biológicas que a la asociada a la técnica MS (**Capítulo 3**).

1.7 LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC), SU ACOPLAMIENTO CON MS Y SU POTENCIAL USO PARA LA LIPIDÓMICA

La Cromatografía en Capa Fina (TLC), conocida ahora en su versión instrumental moderna como HPTLC, es actualmente una técnica modular, automatizada y controlada por ordenador en cada una de sus etapas, esto es, aplicación de muestra, desarrollo cromatográfico y detección. Mediante esta técnica, en sus actuales configuraciones se pueden obtener separaciones eficientes. Asimismo, es posible llevar a cabo diferentes acoplamientos instrumentales para la detección, que proporcionan resultados fiables y precisos, con un alto número de muestras procesadas por la placa, con un mínimo consumo de disolventes, y todo ello en un tiempo reducido de trabajo. HPTLC cumple los requerimientos de las normas GMP (Good Manufacturing Practice) [43].

La TLC ha sido y es una técnica muy popular para el análisis de lípidos debido a su sencillez, rapidez y el elevado número de muestras que pueden ser analizadas en paralelo en una misma placa [44]. Aunque ahora HPTLC ha sido adaptada instrumentalmente para proporcionar separaciones bastante eficientes de clases de lípidos, no se suele considerar como suficientemente eficaz para separaciones dentro de esas clases. Además, a pesar de que hace algún tiempo que se han propuesto técnicas para acoplarla a MS, ha sido muy poco usada para el análisis de lípidos, sólo para mezclas bastante sencillas, y apenas ha sido utilizada junto con técnicas tándem MS o HRMS para el análisis lipidómico o, en general, para el análisis de muestras complejas basadas en lípidos.

Esto es tanto más curioso cuanto que, como ya se ha comentado [1], el término lipidoma apareció por primera vez en la literatura en 2001, precisamente en un artículo sobre TLC.

En esta sección se introducirán las principales técnicas modernas de HPTLC y su acoplamiento con MS que aparecen en la literatura, recogido en un review publicado por nuestro grupo de investigación [45]. Como esta

introducción bibliográfica se orienta con un enfoque instrumental, sólo se tratarán algunos sistemas MS que han tenido relación con el análisis de lípidos. La bibliografía sobre aplicaciones de la HPTLC-MS a los problemas analíticos de las diversas clases de lípidos y matrices planteados en esta Memoria (SL neutros en plasma humano; lípidos neutros y ácidos grasos en biodiésel; y fosfolípidos en membranas bacterianas) será expuesta en la introducción de cada uno de los capítulos relacionados (**Capítulos 3-5**).

Asimismo, aquí se abordará la cuestión de por qué HPTLC no se ha acoplado hasta ahora para tal fin con técnicas tándem MS y/o de alta resolución.

Cada etapa HPTLC muestra un abanico de posibilidades en cuanto a instrumentación. Existen diferentes niveles de sofisticación instrumental para cada etapa, que puede ser elegido en función del objetivo analítico que se proponga. Esto confiere a la técnica un alto grado de flexibilidad [45].

En lo referente a la aplicación automática de muestra, los aplicadores tipo “spray-on”, por nebulización, son el referente ya que permiten aplicar la muestra a densidad constante y en forma de bandas rectangulares, de tamaño variable o de puntos. En lo referente al desarrollo cromatográfico, existen cubetas verticales con sensores de desarrollo, cubetas horizontales, y también un sistema de desarrollo múltiple automatizado (AMD2) que permite eficientes separaciones de lípidos, combinando un desarrollo múltiple incremental y una elución con gradiente de disolventes [46].

En lo referente a la detección, la técnica más popular es la densitometría de barrido, en modos UV (para lípidos, a 190 nm) y fluorescencia, nativa o inducida. En el caso de los lípidos insaturados, se puede trabajar en UV a 190 nm. En el caso de la fluorescencia, se puede inducir la emisión mediante un fluoróforo, por ejemplo, primulina, que permite la detección de lípidos incluyendo los saturados [47]. Habitualmente, la detección se realiza post-cromatográficamente mediante una placa impregnada en el fluoróforo. El principio y detalle de los sistemas mencionados está descrito en el **Capítulo 2**. Además de la densitometría de barrido, se han desarrollado técnicas de

detección de videodensitometría y de actividad biológica [48, 49], aunque apenas se han empleado en el caso de los lípidos, al igual que los sistemas de documentación electrónica.

Pero sin duda, el mayor avance en la instrumentación HPTLC ha sido su acoplamiento con MS, que está estableciéndose firmemente en los laboratorios en el momento actual, particularmente mediante la interfaz HPTLC-MS basada en elución, extracción y transferencia directa automatizada de la correspondiente banda cromatográfica a equipos MS (ver su funcionamiento en el **Capítulo 2**) [34, 50].

A pesar de este progreso, la identificación de lípidos se continúa haciendo todavía en gran medida en muchos laboratorios mediante raspado de la zona de la placa tras el desarrollo cromatográfico, seguido de la extracción manual con disolventes y filtrado sílica gel, antes de realizar el análisis MS. Este procedimiento es tedioso y la recuperación de lípidos es pobre [51].

El uso de la interfaz ha permitido el diseño de sistemas acoplados y ha abierto la posibilidad de conectar la HPTLC con otros detectores. A continuación, se revisa el estado del arte en acoplamiento HPTLC-MS.

1.7.1 Acoplamiento HPTLC-MS: estado del arte

Ha sido posible gracias al desarrollo previo de fuentes de ionización que trabajan a temperatura ambiente y presión atmosférica, tales como Electrospray (ESI) o Ionización química a presión atmosférica (APCI) [52, 53].

El acoplamiento a MS es operacionalmente diferente en HPTLC al de las técnicas LC en columna. HPTLC permite que el acoplamiento se haga solo en las zonas seleccionadas de la placa. Esto es una consecuencia de la configuración abierta de HPTLC, de la evaporación post-cromatográfica de la fase móvil y de la pre-identificación de las zonas cromatográficamente relevantes por densitometría. Esto permite llevar a cabo un análisis económicamente eficaz, en términos de tiempo y de consumo de disolvente.

Pueden encontrarse, en las referencias citadas anteriormente, descripciones detalladas de los diferentes desarrollos instrumentales. Aquí describiremos las técnicas que han sido o están siendo comercializadas, o aquellas más prometedoras.

1.7.1.1 Técnicas basadas en la elución

A) Interfaz automatizada HPTLC-MS

La versión inicial de esta interfaz fue desarrollada por Luftmann [54] y, seguidamente mejorada por el trabajo de otros investigadores como Morlock y Aranda [53, 55-57]. Fue comercializada en 2009 por Camag (Müttlenz, Suiza).

Esta interfaz se ha convertido en una herramienta de rutina y ha sido responsable de la mayoría de publicaciones en las que se ha requerido una identificación estructural. Opera en modo “manos libres”. Su funcionamiento se muestra en el **Capítulo 2 (Figura 2.6)**. Se describe aquí un resumen.

Una cabeza oval o circular (en el pistón) es posicionada sobre la banda cromatográfica deseada por medio de un láser que utiliza las coordenadas que proporciona el densitómetro. La cabeza sella la zona de la banda. La extracción on-line se lleva a cabo como sigue: un disolvente (o mezcla) es bombeado a través de un capilar de entrada en la cabeza, disuelve y eluye la sustancia extraída (en todo el grosor completo de la banda), incluido el perfil más profundo, extrayéndola así de la placa de HPTLC. El “eluato” es dirigido a través de un filtro “fritado” de acero inoxidable de 2 μm para filtrar la sílica gel. Seguidamente, el disolvente es dirigido a un espectrómetro de masas, vía un capilar de salida. Toda esta operación se completa en segundos.

Para usos cuantitativos se prefiere utilizar una cabeza oval de 4x2 mm [57]. Esta técnica es satisfactoria para cuantificaciones por debajo del rango pg/banda. Morlock concluyó que las señales de intensidad y las precisiones obtenidas usando esta interfaz eran similares a las obtenidas utilizando LC-MS.

La interfaz permite una conexión sencilla, directa y modular, no solo con MS sino también con otros sistemas de detección [50], y con cualquier tipo de combinación de columnas LC. Además, puede ser también utilizada con otros fines preparativos, tales como extracción o análisis por DBS (dried blood spots) [58].

Como el “eluato” es líquido, la ionización es la misma que en LC-MS. La fragmentación ESI ha sido utilizada para caracterizar sobre todo compuestos polares. Sin embargo, un grupo importante de compuestos apolares o poco polares (entre ellos algunos lípidos) puede no ser ionizado correctamente en ESI. En este contexto, la ionización APCI también ha sido de ayuda con esta interfaz, proporcionando información complementaria para caracterizar este tipo de moléculas. Nuestro grupo utilizó APCI-MS en combinación con ESI-MS, comparando los espectros de la muestra (esfingomielinas (SM) en plasma) con los de patrones (de SM), a través de la interfaz. Aunque la identificación no era completamente segura, sí que aportaba información para identificar (SM) [59].

En lo que conocemos, antes de esta Tesis sólo ha sido publicado otro trabajo relativo al análisis de lípidos utilizando la interfaz. Park *et al.* [60] la usaron en combinación con ESI (en modo negativo) para identificar glicoesfingolípidos ácidos (gangliósidos y sulfátidas).

Estas citas se discuten con más detalle en el **Capítulo 3**.

B) Muestreo de superficie basado en extracción líquida automática

Un sistema miniaturizado de introducción de muestra en un equipo nano-ESI (sistema TriVersa NanoMate), el cual fue originalmente desarrollado para muestras líquidas [61], fue combinado con un procedimiento de muestreo de superficie basado en extracción con disolvente (LESA[®], Liquid Extraction Surface Analysis), para realizar espectrometría de masas nano-ESI a partir de superficies [62]. Este sistema ha sido comercializado por Advion BioSciences Inc. (Itaca, NY, USA).

El sistema TriVersa NanoMate es una plataforma de nanospray automatizada que utiliza una tecnología de infusión basada en un chip (microfluídica) que contiene una serie de boquillas para nanoelectrospray (nanoESI) con diámetros muy pequeños, grabados en una oblea de silicio.

Las aplicaciones de LESA a placas de HPTLC fueron desarrolladas por Kertesz y Van Berkel [63]. El procedimiento permite extraer un analito de una superficie por medio de una micro-unión líquida sin pared entre el extremo de muestreo de una punta y la superficie. No es una técnica sellada porque el solvente se aspira y se dispensa desde un depósito en la superficie de la muestra a través de un capilar de suministro de solvente.

El solvente forma una micro-unión sin pared con la superficie y la extrae. El material de la superficie disuelta en el solvente se aspira desde la superficie a través del capilar interno de muestreo, se transfiere y se dispensa en forma de aerosol en el sistema nano-ESI. La operación se realiza utilizando muestreo coaxial y capilares de suministro de disolvente. Un esquema de los pasos individuales de este proceso de muestra de superficie se describe en la **Figura 1.5** [64].

En HPTLC, la mayoría de las fases estacionarias utilizadas (aproximadamente el 95%) son placas de sílica gel. Un inconveniente de LESA es su limitación al uso de placas de HPTLC de fase reversa. Sin embargo, se ha publicado un tratamiento de silicona para permitir micro-uniones líquidas en superficies humectables [65]. Se puede pulverizar un recubrimiento hidrófobo en una placa y secarlo. De esta manera, el solvente de extracción penetra el recubrimiento y moja la superficie solo en el punto de muestreo. Aunque esta es una técnica prometedora, no puede descartarse la presencia de algún material de recubrimiento extraído de la superficie, lo cual puede dar interferencias en los espectros ESI-MS.

Teniendo en cuenta la resolución espacial como el diámetro del área de desorción, LOD es inferior a 20 pg/banda.

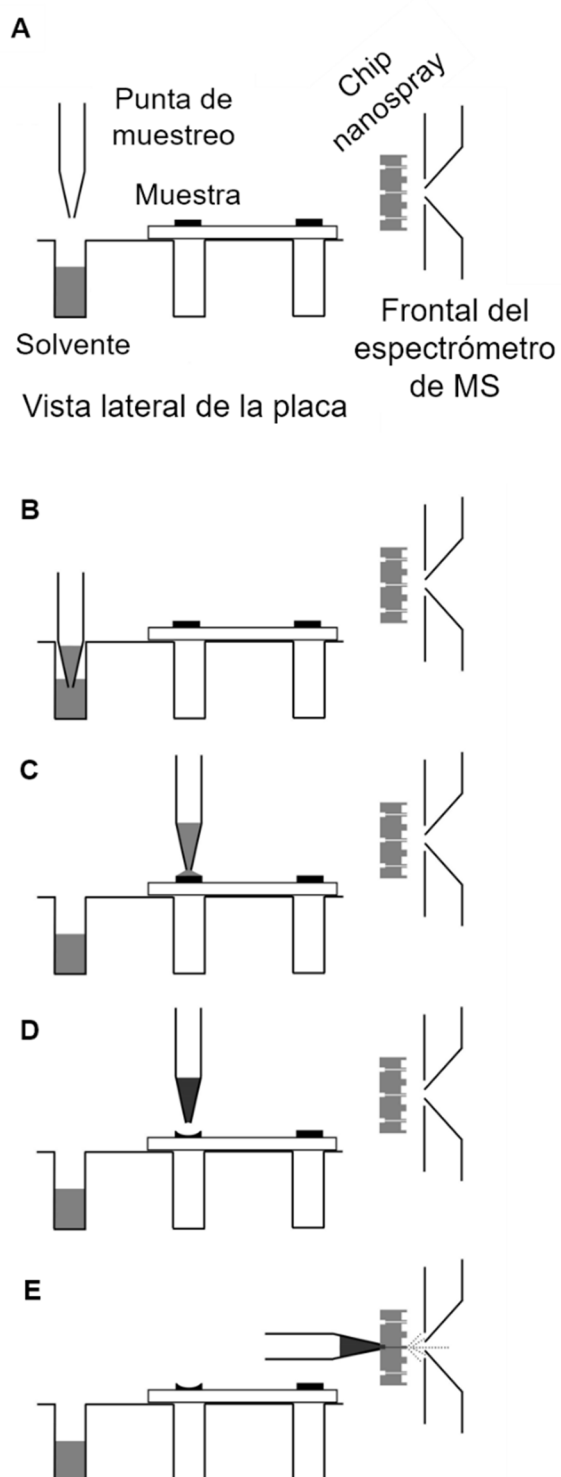


Figura 1.5 Pasos individuales del proceso de muestreo LESA TriVersa en el que se observa la aspiración (a través de un capilar que lo suministra), del material de superficie disuelto en el solvente.

1.7.1.2 Técnicas basadas en la desorción

En estas técnicas, un láser pulsado produce desorción e ioniza la banda en la superficie de la placa. Solo una parte de la banda se ve afectada en su superficie. Por este motivo y, en general, al utilizar estas técnicas, los análisis cuantitativos deben llevarse a cabo utilizando patrones internos.

Una enorme cantidad de acrónimos se han acuñado para dar cuenta de los diferentes enfoques basados en desorción. Por ejemplo, y es una lista no exhaustiva, la desorción se ha realizado: por bombardeo con átomos rápidos (FAB); por bombardeo iónico (SIMS); mediante láser (MALDI, formación de imágenes MALDI, SALDI, ELDI, LIAD-ESI); por un haz de pulverización (DESI, EASI); por un haz de gas excitado (DART, FA-APGD). Ver [50, 52] para la nomenclatura y comparación de enfoques.

Algunos de ellos, fueron estudiados en el pasado, otros están actualmente en progreso y solo unos pocos han sido comercializados. Estos últimos se realizan bajo presión atmosférica y condiciones ambientales, y se resumen aquí.

A) HPTLC-(AP)-MALDI-TOF-MS

Esta tecnología fue desarrollada por Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA. MALDI a presión atmosférica (AP) funciona en condiciones ambientales, pero su configuración experimental es similar a la del MALDI de vacío clásico donde, previamente a la irradiación mediante un láser pulsado, las placas deben pulverizarse (o sumergirse) con una matriz orgánica (por ejemplo, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, DHB) para mejorar la desorción y la ionización de las bandas cromatográficas en la placa de HPTLC. Se suelen obtener altas resoluciones espaciales para el escaneo de muestras, pero la adición de una matriz orgánica puede disminuir la resolución y producir cierta difusión del analito.

MALDI es adecuada para el rango alto de pesos moleculares pero menos para material de bajo rango. Por lo tanto, es una herramienta útil para realizar directamente la caracterización estructural de moléculas complejas en

la placa. Se ha utilizado principalmente para la caracterización de lípidos [44, 66], como los glicoesfingolípidos ácidos a los que las especies de PC (fosfatidilcolinas) producen supresión iónica con otras técnicas [67-69]. Como se requiere una referencia visual para ubicar la banda de lípidos correspondiente en la placa, se utilizó la derivatización (por ejemplo, orcinol para glicoesfingolípidos). Sin embargo, dado su carácter destructivo, la separación debe duplicarse en otra placa antes de realizar el espectro MS.

Alternativamente, también se ha utilizado primulina, un agente revelador fluorescente no covalente. Resultados previos demostraron que la primulina no interfiere con la adquisición de espectros de masas MALDI de esfingolípidos [70]. En ese trabajo, la determinación estructural de algunos estándares de esfingolípidos (SL) se obtuvo por MS/MS en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. Sin embargo, la primulina debe agregarse a la matriz orgánica. La interpretación de los espectros de MALDI puede no ser fácil porque la primulina, el fondo de la matriz añadida, los aductos que se forman y la fragmentación hacen que los espectros de masas sean muy complejos. Se han llegado a detectar diversos fosfolípidos mediante esta técnica [71-73]. De forma similar, también se desarrollaron otros tratamientos complejos, como el uso de inmunotinción específica usando anticuerpos o la transferencia de esfingolípidos teñidos con primulina de la placa a una membrana de difluoruro de polivinilideno seguida de extracción, antes del análisis MALDI [67, 74].

MALDI requiere personal cualificado debido a la complejidad del procedimiento del tratamiento de las placas.

La reproducibilidad de HPTLC-MALDI se encuentra en el rango del 10% y la sensibilidad para los lípidos, en el rango de 100 ng. Otro problema, es que las sensibilidades de MALDI dependen de la distancia de migración de la sustancia [34].

B) HPTLC-DART-TOF-MS

El análisis directo en tiempo real, DART, es una fuente de APCI que utiliza una corriente caliente de especies excitadas de gas inerte (helio, He)

para desorber e ionizar analitos [75]. En el caso de analitos adsorbidos sobre superficies sólidas, esto se realiza ajustando el ángulo de la corriente de gas DART. Este acoplamiento HPTLC-DART es comercializado por IonSense (Saugus, MA, EE.UU).

DART sigue el mecanismo de ionización de Penning [52]: átomos de He en estado excitado, excitan grupos de moléculas de agua en la atmósfera, que a su vez transfieren protones a las moléculas de interés, creando así iones orgánicos. En el modo de ionización negativa, DART opera a través de especies de oxígeno cargadas. Aunque su mecanismo de ionización es bastante complejo, los espectros suelen ser sencillos de interpretar.

No hay mucha experiencia acumulada en HPTLC-DART y todavía es una técnica inexplorada. Se pueden encontrar algunos ejemplos en las referencias [76-78]. Presenta varias ventajas, una de las cuales es la simplicidad de su operación. La placa de HPTLC se corta en la zona de interés y las manchas separadas se dirigen a la corriente de He del estado excitado. No requiere ninguna preparación. No se requiere matriz [78]. Sin embargo, la automatización completa del acoplamiento está lejos de ser resuelta. Aunque el equipo incluye un riel motorizado, todavía no hay una solución técnica para un acoplamiento correcto de HPTLC y DART [79].

Pequeños analitos polares o no polares, con un MW no superior a 1000 Da se pueden analizar mediante DART con un LOD < 128 pg/banda. Esta sensibilidad es 1-2 órdenes de magnitud más baja que la de ESI. Un estudio validó el uso de HPTLC-DART en la identificación forense de los componentes de varias preparaciones farmacéuticas [80].

1.8 OTRO PUNTO DE VISTA: MÉTODOS SELECTIVOS ENZIMÁTICOS

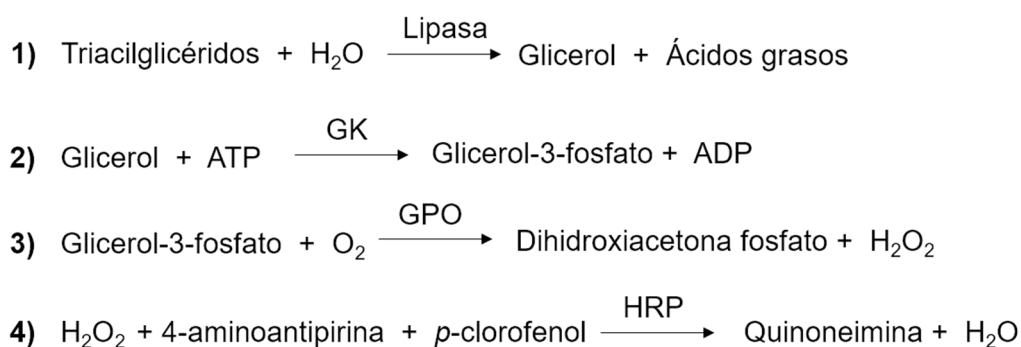
Muchas otras técnicas analíticas se han usado, además de la MS, en la investigación lipidómica. Así, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), dispositivos microfluídicos, espectroscopía de fluorescencia [81], son algunas de ellas.

Cuando las matrices son complejas y hay una gran cantidad de analitos a determinar, se recurre a las técnicas de separación con el fin de aportar la selectividad que el método de detección no puede aportar.

Sin embargo, si se quiere determinar un único analito (o familia de analitos) existe otra alternativa que es el desarrollo de métodos analíticos selectivos al analito en cuestión.

La parte fundamental de estos métodos es la selección de moléculas receptoras capaces de reaccionar con el analito de forma selectiva y generar una señal. Lo ideal es que esta interacción se produzca en una sola etapa, de forma que se puedan desarrollar métodos rápidos que minimicen el tratamiento de muestra y por tanto el tiempo de análisis. Si además el receptor se regenera después de la interacción, quedaría listo para una siguiente determinación, lo que permitiría el desarrollo de sensores.

Unas moléculas receptoras que cumplen estos requisitos son las enzimas. Así, por ejemplo, la determinación de triacilglicéridos (TG) en suero se lleva a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas que se muestran en el **Esquema 1.1** [82].



Esquema 1.1 Determinación enzimática de triacilglicéridos (TG) en suero.

Los TG son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por acción de una enzima lipasa. Posteriormente, y en presencia de adenosín trifosfato (ATP) y glicerol kinasa (GK), el glicerol es fosforilado a glicerol-3-fosfato, que a su vez es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO), para producir peróxido de hidrógeno. Éste a su vez participa en una reacción con la peroxidasa (HRP),

que en presencia de *p*-clorofenol y 4-aminoantipirina produce un complejo coloreado de color rojo. La muestra se añade sobre una mezcla de todos los reactivos, y se mide la absorbancia a 520 nm, siendo proporcional a la concentración de TG en la muestra.

Un tipo de enzimas muy interesantes son las flavoenzimas, ya que presentan propiedades ópticas que se modifican durante la reacción con el sustrato en cuestión, lo que las hace sistemas autoindicadores y simplifican el procedimiento.

1.8.1 Fluorescencia de las flavoenzimas: Metodología enzimática

Las flavoenzimas son un tipo de enzimas que contienen flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor. La estructura de la forma oxidada del FAD se observa en la **Figura 1.6** [83-85].

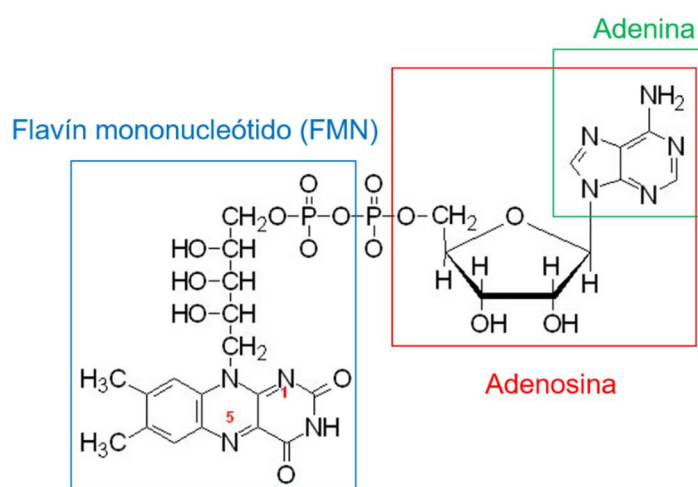
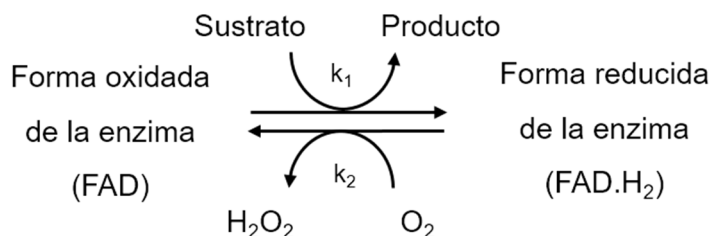


Figura 1.6 Estructura general del FAD. En FAD.H₂ se reducen los nitrógenos 1 y 5.

Como todas las enzimas, presentan fluorescencia en la región UV del espectro (dos bandas de excitación a 220 y 280 nm, y una de emisión a 340 nm) debido fundamentalmente a la presencia en su estructura del aminoácido triptófano (trp). Además, el FAD presente en dichas flavoenzimas, aporta fluorescencia en la región visible (λ_{exc} 400 nm / λ_{em} 520 nm), siendo mayor en su forma oxidada (FAD) que en su forma reducida (FAD.H₂).

Las flavoenzimas catalizan reacciones de oxidación (**Esquema 1.2**), que en la mayoría de los casos se pueden simplificar en un mecanismo como el siguiente:



Esquema 1.2 Mecanismo por el que las flavoenzimas catalizan la oxidación de los sustratos.

Como se puede observar, durante la reacción enzimática el grupo flavina de la enzima se reduce a FAD.H₂, que con el O₂ del medio se reoxida (mecanismo ping-pong), siendo k_1 y k_2 las constantes cinéticas de cada una de las etapas. Este hecho hace que se produzcan cambios en la fluorescencia de la enzima, lo que permite seguir la reacción.

Existen tres alternativas [86]:

1. Variación de fluorescencia a las longitudes de onda del FAD; ya que tanto FAD como FAD.H₂ tienen propiedades de fluorescencia, siendo la forma oxidada más fluorescente que la reducida por lo que durante la reacción se verán cambios en la fluorescencia [87].
2. Variación de fluorescencia a las longitudes de onda del triptófano (trp); ya que debido a un mecanismo de transferencia de energía con el FAD, la fluorescencia del trp también cambia durante la reacción enzimática.
3. Variación de fluorescencia a las longitudes de onda de una sonda de fluorescencia; ya que algunos fluoróforos unidos a la enzima, como fluoresceína (FS), modifican su fluorescencia durante la reacción si existe un solapamiento entre los espectros de la enzima y los del fluoróforo.

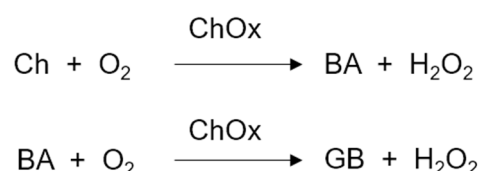
La utilización de la metodología enzimática basada en las flavoenzimas aporta dos ventajas fundamentales: la no adición de otro reactivo para la obtención de la señal analítica más que la propia enzima, actuando ésta como

indicador de la reacción que cataliza; y por otra parte, la regeneración de la enzima durante la medida, base para el desarrollo de biosensores.

Nuestro grupo de investigación lleva tiempo desarrollando métodos enzimáticos relacionados con la fluorescencia de las flavoenzimas tanto intrínseca [86, 88-90], como extrínseca (con fluoróforos que emiten en la zona del visible) [89, 91-93]. En ellos se proponen modelos matemáticos relacionando las variaciones en la emisión fluorescente con la concentración del analito estudiado. Estos modelos han sido utilizados por otros autores en la determinación de su analito particular, en este caso la glucosa [94].

Estas enzimas se regeneran durante la reacción, por lo que se pueden utilizar en varias medidas, dando lugar al desarrollo de sensores para analitos como glucosa [92], entre otros.

Una de las flavoenzimas estudiadas en el grupo es la colina oxidasa (ChOx) que reacciona con colina (Ch) en dos pasos. Primero la Ch es oxidada a aldehído betaína (BA) y después a glicina betaína (GB) (**Esquema 1.3**).



Esquema 1.3 Etapas de reacción en la oxidación de Ch.

Ambos pasos cumplen el **Esquema 1.2**.

En este caso, la reacción de reducción es más rápida que la de regeneración ($k_1 > k_2$), por lo que el perfil de reacción se corresponde al gráfico mostrado en la **Figura 1.7 (a)** si se sigue a las longitudes de onda del FAD. Al añadir el sustrato, el FAD se reduce rápidamente y la intensidad de fluorescencia disminuye alcanzando un mínimo que se mantiene mientras haya sustrato, momento en el cual el oxígeno presente en la disolución regenera a la enzima, y la fluorescencia se recupera [95].

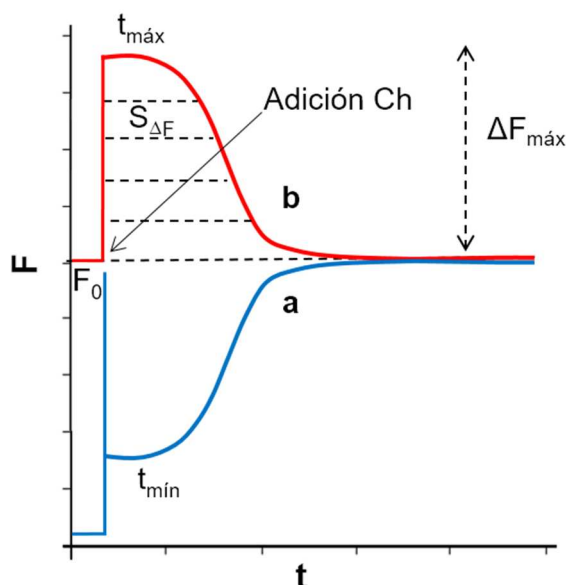


Figura 1.7 Simulación de la variación de la intensidad de fluorescencia (F) con el tiempo (t) durante la reacción enzimática de ChOx con Ch medido a las longitudes de onda del **a.** FAD, **b.** trp o fluoróforo unido a la enzima.

Si la reacción se sigue a las longitudes de onda del trp (o de un fluoróforo unido a la enzima), la señal (**Figura 1.7 b**) es una imagen especular de la figura comentada, con variaciones de fluorescencia positivas. Esto es debido a que hay un solapamiento entre el espectro de emisión del trp y el de excitación del FAD, que produce una transferencia de energía. Al añadir la Ch, la enzima se reduce y como la especie FAD.H_2 , absorbe menos, la transferencia de energía es menor, y la fluorescencia aumenta hasta alcanzar un máximo que se mantiene hasta que se acaba el sustrato [89].

Si la ChOx se modifica con un fluoróforo como fluoresceína (FS), la señal tiene la misma forma que la obtenida en el caso del trp (**Figura 1.7 b**). Para ello debe existir un solapamiento entre el espectro de excitación del FAD y el de excitación del fluoróforo, que provoca un efecto de filtro interno. Como el FAD.H_2 absorbe menos, el filtro interno es menor y la fluorescencia del marcador aumenta [89].

Como parámetros analíticos se pueden utilizar tanto la variación máxima de fluorescencia ($\Delta F_{\text{máx}}$), el área bajo la curva de señal ($S_{\Delta F}$) o el tiempo al que se alcanza una determinada variación de fluorescencia ($t_{\text{máx}}$ o $t_{\text{mín}}$).

Esta reacción es importante desde un punto de vista analítico, no sólo porque se puede determinar Ch, sino también porque se pueden determinar otros compuestos que contienen Ch en su estructura. Para ello, la reacción de la ChOx se debe acoplar a una reacción enzimática previa que libere Ch.

En el **Capítulo 6** de esta Memoria se pondrán de manifiesto las posibilidades de esta metodología para la determinación de fosfolípidos que contienen colina (Ch-PL).

1.9 JUSTIFICACIÓN, INTERÉS Y OBJETIVOS

No existe una única técnica que permita abordar completamente el análisis del lipidoma, sino que se suele emplear una combinación de diferentes aproximaciones experimentales. La elección de la técnica y método apropiado dependerá del objetivo del análisis y de conocer las hipótesis de partida y limitaciones. De cada técnica e instrumentación se pueden obtener diferentes tipos y niveles de información sobre la estructura molecular de los lípidos, con diversos grados de sensibilidad y selectividad.

En esta Tesis se pretende evaluar la viabilidad de dos técnicas y desarrollar nuevas metodologías analíticas para el análisis de diferentes clases de lípidos y sus especies moleculares individuales en muestras complejas procedentes de matrices diferentes, que serán descritas más adelante en esta sección:

- La Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC) acoplada a técnicas MS tándem, para el análisis de las especies moleculares individuales de las diferentes clases que constituyen los lípidos neutros, esfingolípidos y fosfolípidos.
- Una metodología basada en la fluorescencia de flavoenzimas que poseen flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor, como opción o alternativa cuando se quiere determinar un único analito o clase y no es necesario separar sino buscar selectividad hacia ese analito. Aplicaremos

esta metodología para el análisis de fosfolípidos que contienen un resto de fosfato de colina.

1.9.1 HPTLC-MS tándem/HRMS

La instrumentación moderna en Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC) acoplada a MS presenta un prometedor futuro para el análisis de lípidos complejos. Sin embargo, hasta el momento presente sólo se habían podido obtener de un modo sencillo y rápido espectros ESI y APCI-MS de lípidos complejos biológicos que, si bien aportaban cierta información estructural de las especies presentes en un problema, no permitían una identificación inequívoca de los iones obtenidos.

Por otro lado, la obtención de espectros explotables MS/MS (en general, MSⁿ) y/o de alta resolución (HRMS) de lípidos directamente desde la placa, que constituiría un avance importante, se ha visto hasta ahora impedida por la ubicua presencia de iones sodio durante el proceso cromatográfico (placa, tubos, etc.), que causa una pobre fragmentación de los iones aislados y su coexistencia con iones sodiados, complicando o impidiendo la interpretación estructural de los espectros.

En este trabajo, se demuestra cómo es factible obtener espectros MSⁿ y HRMS explotables, de manera rápida, fiable y sencilla, a partir de muy diversos lípidos, y en muestras reales complejas, tanto biológicas como de origen industrial.

El sistema utilizado consta de las siguientes etapas sucesivas, que se llevan a cabo sobre una misma placa cromatográfica:

- Separación en gradiente, llevado a cabo en la capa fina mediante AMD (Automated Multiple Development).
- Detección de los lípidos separados en clases mediante densitometría, bien en modo UV o por fluorescencia inducida no-covalente.

- Transferencia directa de cada pico¹ separado en la placa a un espectrómetro de masas, de tipo trampa de iones, mediante una interfaz portátil que permite su extracción automática y elución “online”. El equipo MS de trampa de iones permite la posibilidad de análisis tándem multietapa (MS/MS...MSⁿ). También se muestra ocasionalmente su acoplamiento a un equipo de tipo cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) para la obtención de espectros de alta resolución (HRMS). Toda esta etapa se realiza en segundos.

El acoplamiento de los equipos utilizados se expone en el **Capítulo 2**.

Se demuestra que los mecanismos de fragmentación ESI de los lípidos a partir de la placa cromatográfica son básicamente los mismos que los descritos en disolución.

Los resultados que se van a discutir en esta Memoria, obtenidos con el sistema previamente descrito, se basan en que ***es posible obtener condiciones de trabajo para que los aductos de sodio, formados a partir de una amplia variedad de lípidos, puedan ser fragmentados en modo ESI positivo, directamente desde la placa cromatográfica, y que el sodio permanezca como la carga de fragmentos iónicos estables, siendo así útiles para su inequívoca identificación estructural en muestras complejas a través de los espectros MSⁿ y HRMS.*** Es decir, que se formen exclusivamente aductos sodiados. Esta posibilidad ha mostrado ser bastante general para clases muy variadas de lípidos, como se ha puesto de manifiesto en la obtención (en ESI⁺) de espectros MSⁿ y HRMS de compuestos tales como: esfingolípidos (esfingomielinas, SM; Globotriaosilceramidas, Gb₃ y liso-globotriaosilceramidas, liso-Gb₃), lípidos neutros (monoacilglicéridos, MG y diacilglicéridos, DG) y fosfolípidos (fosfatidilcolinas, PC y cardiolipinas, CL).

¹En esta Memoria, se utilizará indistintamente el término pico y banda; aunque “pico” suele ser más utilizado cuando hay una separación cromatográfica a línea base, y “banda”, más genérico, no entra en la pureza de la separación, aunque a veces engloba también al término pico.

El sistema ha permitido también la compatibilización de su uso en modo negativo (ESI⁻) de algunos miembros de estas familias que no mostraban una adecuada ionización en modo positivo (ácidos grasos, FA; fosfatidiletanolaminas, PE y fosfatidilglicerol, PG).

Aprovechando esta posibilidad, se ha utilizado este sistema, en las condiciones mencionadas, para resolver tres problemas analíticos de interés en diversas matrices, y que implican la obtención de perfiles semicuantitativos (por ESI-MS) representativos de diferentes clases de lípidos y la ulterior identificación estructural de sus especies moleculares individuales. Las clases de lípidos involucradas en estas muestras, sus matrices problema y los niveles de concentraciones implicadas ilustran bien una variedad de situaciones analíticas reales y ejemplifican las funciones de los lípidos presentes en el lipidoma, no habiendo sido dichos problemas analíticos abordados previamente utilizando la técnica propuesta.

Así, se mostrarán en los capítulos sucesivos:

1. Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de esfingolípidos neutros y sus especies moleculares en plasma humano (en baja concentración), que ejemplifican la función de señalización molecular, pues son considerados biomarcadores de enfermedades de depósito lisosomal (EDL). De entre ellos, nos centraremos en las esfingomielinas (SM), relacionadas con la enfermedad de Niemann-Pick, y en las globotriaosilceramidas (Gb₃) y globotriaosilfosfingosinas (liso-Gb₃), biomarcadores de la enfermedad de Fabry (**Capítulo 3**).
2. Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de lípidos neutros individuales de diferentes clases en biodiésel, muestra industrial de origen energético y que ilustra sobre la función lipídica de depósito de energía. El tipo de biodiésel utilizado aquí es un combustible renovable con un porcentaje variable de lípidos en su composición. Están mayoritariamente compuestos de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Un contenido en FAME menor del 98% en peso indica condiciones de reacción inapropiadas para la producción del biodiésel y, de aquí, la presencia de impurezas en el

producto final que incluye MG, DG, y FA. La composición y porcentaje de estas impurezas lipídicas es importante para establecer las especificaciones de calidad de dichos combustibles de transporte. En particular, los MG provocan la colmatación de los filtros de carburante y su concentración máxima autorizada es de 0.8% en peso (**Capítulo 4**).

3. Identificación de los fosfolípidos (PL) y sus especies moleculares, como componentes de membranas celulares, unidos a proteínas de membrana en las bacterias púrpuras fotosintéticas: *Rhodobacter (Rb.) blasticus*, *Rhodospirillum (Rd.) rubrum* y *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis* y al complejo fotosintético purificado de esta última bacteria. Se pretende identificar las especies moleculares individuales de los PL de las familias: PC, PL, PE y CL, que pueden afectar la función de las proteínas de membrana (MP) de estas bacterias e, indirectamente, contribuir a mejorar la cristalización de éstas (**Capítulo 5**).

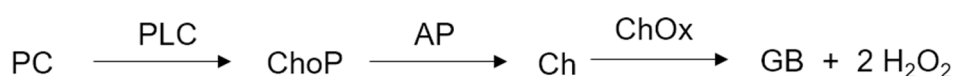
Se pone de manifiesto en estos capítulos que el sistema HPTLC-MS aporta una dimensión espacial complementaria a la dimensión temporal proporcionada por LC-MS, puesto que aporta la ventaja selectiva del acceso a las zonas deseadas de la placa. Otras ventajas, como un considerable ahorro en tiempo de análisis y disolventes, y algunas relativas a la ionización homogénea de las especies de una clase dada de lípidos, serán expuestas a lo largo de esta Memoria.

Aunque se suele considerar que esta técnica sólo sirve para un fraccionamiento grosero en clases de lípidos, se demuestra en este trabajo que la separación fina mediante AMD y su acoplamiento a MS tándem permite una determinación estructural directa de lípidos individuales y sus especies moleculares, así como una estimación semicuantitativa de las propias clases de lípidos (densitometría por fluorescencia inducida) y dentro de cada clase (ESI-MS/tándem/HRMS).

1.9.2 Metodologías enzimáticas basadas en la fluorescencia

Una alternativa interesante a los métodos cromatográficos y a los basados en MS para el análisis de metabolitos lipídicos son las metodologías enzimáticas basadas en la fluorescencia, debido fundamentalmente a la alta sensibilidad y selectividad que aportan, y a la posibilidad de ser implementadas en forma de sensores. Nuestro grupo de investigación lleva tiempo desarrollando métodos enzimáticos relacionados con la fluorescencia de las flavoenzimas, enzimas que tienen FAD como cofactor.

El objetivo fundamental de esta parte del trabajo, que se explica en el **Capítulo 6**, es poner de manifiesto las posibilidades analíticas de esta metodología en la determinación de lípidos, más concretamente fosfolípidos que tienen un resto de colina (Ch-PL) en su estructura. El más significativo de todos es la fosfatidilcolina (PC), que se puede determinar según la siguiente secuencia de reacciones (**Esquema 1.4**):



Esquema 1.4 Reacciones enzimáticas llevadas a cabo para la determinación de PC. Enzimas involucradas en el proceso: PLC, AP y ChOx.

La PC reacciona con la lipasa (PLC), dando fosfato de colina (ChoP), que a su vez reacciona con la enzima fosfatasa alcalina (AP) para dar Ch. Ésta a su vez, reacciona con la colina oxidasa (ChOx), que como ya se ha comentado es una flavoenzima, produciendo cambios en su fluorescencia que se relacionan con la concentración del analito.

Esta metodología es válida para PC o cualquiera de los metabolitos dependiendo de las enzimas utilizadas.

El estudio se centró en la determinación de ChoP y Ch, de gran interés por sí mismas, demostrando también la versatilidad de la metodología, ya que se pudo llevar a cabo la determinación conjunta o secuencial de las mismas, dependiendo de las condiciones de trabajo.

Una de las mayores dificultades de cualquier procedimiento analítico al aplicarlo a una muestra real, es el tratamiento de muestra, ya que suele ser el paso más largo y laborioso de todo el proceso analítico. Tiene por objetivo poner a los analitos en disolución, libres de interferencias. La metodología desarrollada se aplica a la determinación de ambos analitos en leche materno infantil, poniendo de manifiesto que la selectividad que aporta el método, evita un tratamiento de muestra prolongado.

Por otro lado, se muestran las posibilidades analíticas de un instrumento de fluorescencia (equipado con lector de placas) en reacciones enzimáticas, lo que ha permitido resultados satisfactorios con un menor gasto de reactivos.

Puesto que las enzimas utilizadas se regeneran durante la reacción, se ha abordado la posibilidad de desarrollar un biosensor. Para ello, se estudió el mejor modo de construcción de la lámina sensora, basado en un sistema de acrilamida/bis-acrilamida, elección del fluoróforo adecuado para unirse a la ChOx, inmovilización de las enzimas, así como de las condiciones de medida.

Si el método se quisiera ampliar a la determinación de PC, habría que acoplarle la reacción enzimática con la PLC, si bien este objetivo queda fuera de esta Memoria.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de esta Memoria, se van a presentar una serie de estudios relacionados con el desarrollo de dos tipos de sistemas:

- Combinación de cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC) - densitometría de barrido - espectrometría de masas (MS), a través de la interfaz TLC-MS.
- Espectroscopía de fluorescencia molecular.

Dentro de cada uno se va a realizar una descripción de la instrumentación que lo compone, con sus principales características, así como una enumeración de los reactivos y muestras requeridos en los diferentes estudios que componen esta Memoria.

2.2 TÉCNICA BASADA EN CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC)

2.2.1 Placas de HPTLC

Se utilizaron placas HPTLC para cromatografía en capa fina (Merck, Alemania). Están fabricadas en vidrio, con dimensiones de 20x10 cm (en algunos ensayos se utilizaron de 10x10 cm) recubiertas de sílica gel. El tamaño de partícula se encuentra entre los 3-10 μm , el tamaño de poro es de 60 Å y el recubrimiento de sílica gel con espesor de 0.2 mm.

Los ensayos en cromatografía en fase reversa, se llevaron a cabo con placas con recubrimiento de C18 (RP-18W) con la característica de poder ser utilizadas incluso con un 100% de agua como disolvente.

2.2.2 Aplicación de la muestra

Para depositar los diferentes patrones y muestras en la placa cromatográfica se utilizó el equipo *Automatic TLC Sampler 4 (ATS4)*, (Camag,

Suiza), un aplicador automático de muestras para placas TLC de 20x10 y 10x10 cm (**Figura 2.1 A**).

Permite la aplicación de bandas de densidad constante, mediante nebulización de la muestra y evaporación de forma simultánea del disolvente utilizado (**Figura 2.1 B**).

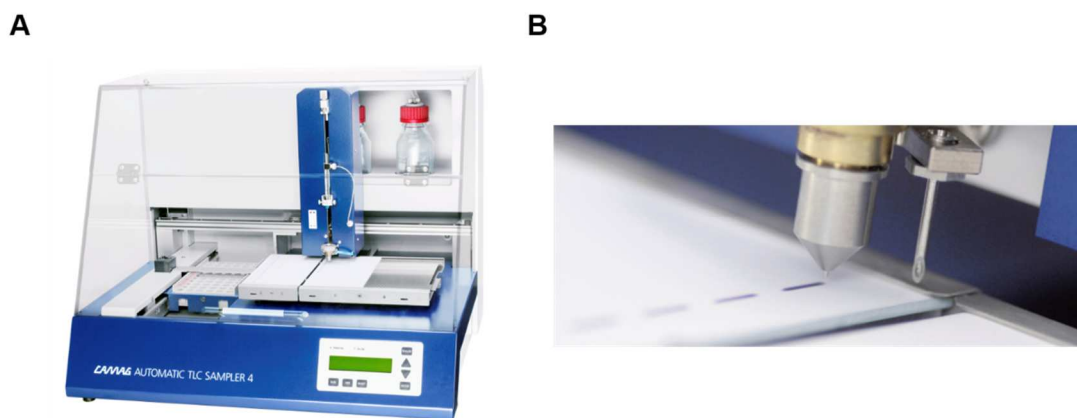


Figura 2.1 A) Sistema ATS4 y **B)** aplicación de la muestra en detalle.

Una de sus principales ventajas es la de poder aplicar la muestra en forma de bandas estrechas, mejorando de esta forma la resolución, repartiendo la muestra a lo largo de la banda por igual. De este modo, se tiene la posibilidad de cargar la placa con una cantidad elevada de muestra de forma homogénea.

El punto fuerte de este equipo viene dado por su precisión y reproducibilidad a lo largo de la aplicación de la muestra ya que está completamente automatizado.

Las etapas que intervienen en el proceso de aplicación (carga del volumen necesario de muestra en la jeringa, velocidad de llenado, limpieza de la jeringa entre aplicaciones, aplicación de la muestra nebulizando en forma de bandas del tamaño y en la posición y distancia deseadas) están controladas mediante el software WinCATS que ofrece Camag.

Cuando se ha manejado fase acuosa, se ha utilizado también el sistema *Linomat IV* (Camag, Suiza), un aplicador semiautomático de muestra en la placa cromatográfica. En este caso, la carga de la muestra y la limpieza de la

jeringa entre aplicaciones se realizan de forma manual. El desplazamiento a lo largo de la placa para la aplicación de las bandas se realiza de forma automática, como es el caso del ATS4.

2.2.3 Desarrollo cromatográfico

La separación HPTLC se realizó mediante el equipo *Automated Multiple Development 2 (AMD2)*, (Camag, Suiza), un desarrollo múltiple y automatizado del cromatograma, que se lleva a cabo en las placas cromatográficas de 20x10 cm (**Figura 2.2**).

Este desarrollo se realiza en etapas elementales sucesivas (de varios mm cada una) que se llevan a cabo mediante una fuerza de elución decreciente (de + polar a - polar) en combinación con una distancia de desarrollo creciente. La composición de la fase móvil en cada etapa es diferente. Ésta se ajusta mezclando diferentes proporciones de hasta cinco disolventes. El equipo se encarga de la mezcla de forma automática, en la proporción deseada para conseguir la composición adecuada.



Figura 2.2 Sistema de desarrollo cromatográfico AMD2.

La combinación de un desarrollo “incremental”, un gradiente por etapas y una refocalización de las bandas obtenida por repetición (si procede) de las

etapas elementales, da lugar a bandas estrechas y, de aquí, a una separación eficiente, de modo altamente repetible y reproducible (± 0.45 mm).

AMD es aconsejable para muestras que comprenden un alto rango de polaridad. Es una alternativa interesante para obtener separaciones con complejidades cada vez mayores.

Así, mediante el software WinCATS (Camag) se puede seguir en cada momento la posición del disolvente desarrollado a través de la placa, y cómo se detiene la elución de forma automática entre etapas al alcanzar la distancia en mm deseada. Para realizar la siguiente etapa del desarrollo, previamente se seca a vacío el disolvente que queda de la etapa anterior. Los parámetros de la elución que son necesarios introducir en el programa son: el número de etapas de las que consta el desarrollo, la composición de la fase móvil y la distancia en mm a recorrer en cada etapa, si se desea un borboteo entre ellas para conseguir acidificar el medio y la distancia de desarrollo final.

Cumple con los requerimientos de las normas de correcta fabricación (GMP) y buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Se trabajó también con la *cámara de desarrollo vertical* (*Twin Trough Chamber*) o *cubeta para cromatografía* (Camag, Suiza), de tamaño cuadrado o rectangular cerrada para equilibrar la placa con los vapores del disolvente antes de realizar la elución (**Figura 2.3 A**). En nuestro caso se utilizó para el lavado previo de las placas con tetrahidrofurano (THF) antes de su utilización, cumpliendo la doble función de disolver y arrastrar las impurezas presentes en la placa, así como modificar la superficie de sílica gel para lograr separaciones con distinta selectividad.

Asimismo, en algunos ensayos puntuales, se utilizó la *cámara de desarrollo horizontal* (Camag, Suiza). El modelo del que disponemos está especialmente diseñado para placas cromatográficas de 10x10 cm (**Figura 2.3 B**). En el caso de la cámara horizontal, el flujo de disolvente previamente preparado, al circular en dirección horizontal, no contempla la resistencia de la gravedad, proporcionando separaciones muy eficientes. Permite dos sentidos distintos de desarrollo, desde el comienzo hasta el final de la placa,

aumentando así la resolución, o desde ambos lados hacia el centro, maximizando el análisis, duplicando así el número de muestras en una misma placa.

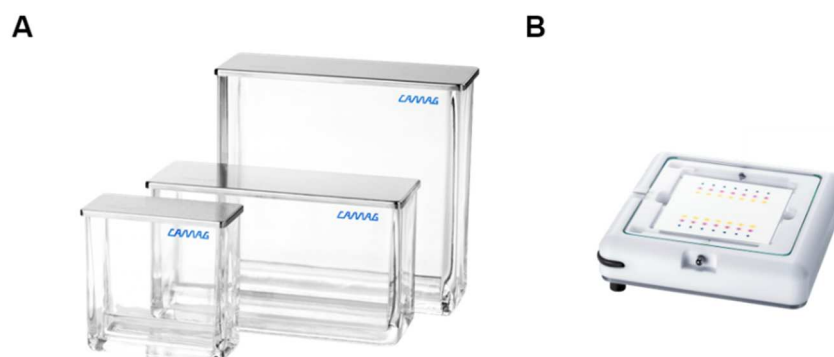


Figura 2.3 A) Cámaras de desarrollo vertical y B) cámara de desarrollo horizontal.

2.2.4 Impregnación post-cromatográfica

Se utilizó el dispositivo de *inmersión* (Camag, Suiza), en algunos casos para aplicación de agente revelador de forma reproducible de la placa cromatográfica (**Figura 2.4 A**). Esta impregnación se realiza a velocidad constante. El rango de valores se encuentra entre 25 y 45 mm·s⁻¹. De la misma forma, se puede programar el tiempo en el que la placa queda sumergida en la disolución impregnante.

2.2.5 Calentamiento y secado post-cromatográfico

Se trabajó con el *calefactor* (Camag, Suiza) de placas cromatográficas, permitiendo un calentamiento uniforme a lo largo de toda la placa (**Figura 2.4 B**). Está formado por una superficie resistente a los reactivos, en el que el rango de temperaturas a alcanzar se encuentra entre los 25 y 200 °C. Admite placas de hasta 20x20 cm.

A



B



Figura 2.4 A) Dispositivos de impregnación y **B)** secado post-cromatográfico.

2.2.6 Detección, evaluación y documentación

Como sistema de detección se trabajó con el instrumento *TLC Scanner 3* (Camag, Suiza), que consigue la evaluación videodensitométrica de la placa cromatográfica (**Figura 2.5 A**). En este caso, admite placas de 20x10 y de 10x10 cm.

Este equipo, también llamado densitómetro, mediante la utilización de un haz de luz, a una determinada longitud de onda, realiza una serie de barridos a lo largo de las calles de la placa, midiendo la luz que se refleja, ofreciéndonos como resultado un cromatograma. Permite las medidas tanto de absorbancia (UV/Vis) como de fluorescencia, ofreciendo la posibilidad de llevar a cabo espectros de absorción en cualquiera de las zonas de la placa.

Nuestro equipo se compone de tres tipos de lámparas, deuterio, wolframio y vapor de mercurio, seleccionando así la longitud de onda de medida en un rango de 190-800 nm.

Mediante el software WinCATS (Camag) se pueden configurar los parámetros que caracterizan el tipo de medida a realizar, la longitud de onda de excitación, qué filtro seleccionar para recoger la emisión en fluorescencia, tipo de lámpara, así como los parámetros que influyen en la integración de los picos.

Para conseguir las imágenes de la placa que se observarán en alguno de los ensayos de esta Memoria, se utilizó el equipo *TLC Visualizer* (Camag, Suiza), visualizador con cámara digital (**Figura 2.5 B**). Este sistema de documentación permite la adquisición de la imagen completa de un cromatograma en capa fina. Permite la iluminación de la placa de forma UV (254 y 366 nm) y luz blanca (re-emitida, transmitida y una combinación de ambas). Está formado por una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) de 12 bit de alta resolución. Permitiría la posibilidad de cuantificación a partir de la imagen con el software VideoScan.

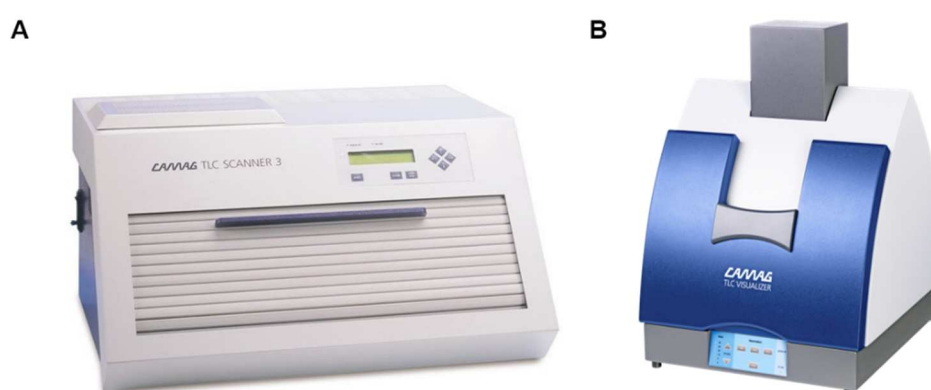


Figura 2.5 A) Sistemas de detección TLC Scanner 3 y **B)** TLC Visualizer.

2.3 TÉCNICA BASADA EN HPTLC ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPTLC-MS)

2.3.1 Acoplamiento HPTLC-MS

Se utilizó la *interfaz 2 TLC-MS* (Camag, Suiza) para llevar a cabo la extracción semi-automática de los compuestos separados en la placa y su posterior análisis mediante espectrometría de masas (MS) (**Figura 2.6 A**). La interfaz permite la conexión simple, directa y modular de HPTLC con las técnicas de MS.

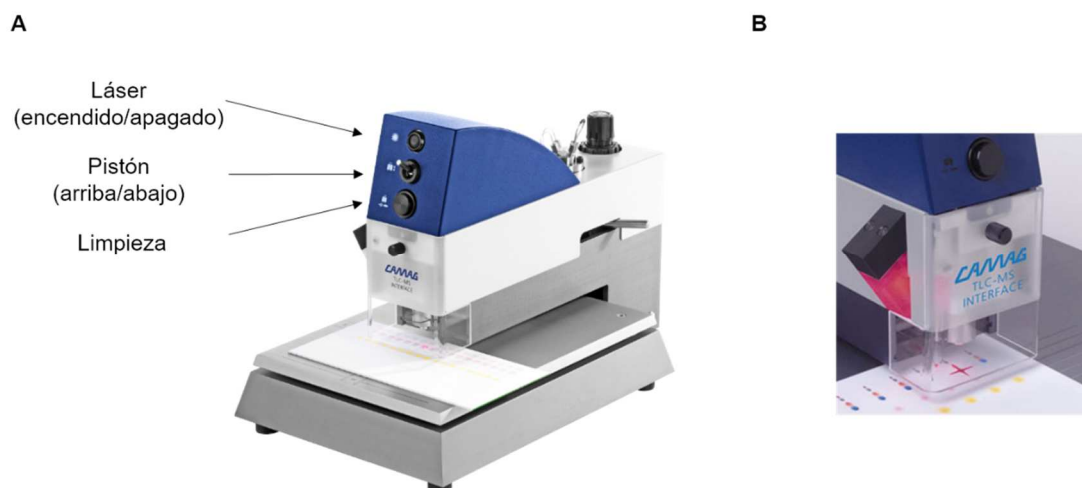


Figura 2.6 A) Sistema interfaz 2 TLC-MS y **B)** detalle del pistón.

Este proceso se consigue mediante un caudal constante de disolvente (en nuestro caso metanol $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), que viene suministrado por una *bomba HPLC* (Jasco PU-2080, Japón) acompañada de una *válvula* (Rheodyne) de 6 vías. Cabe destacar que el disolvente que se utiliza debe facilitar una correcta extracción de la muestra en la sílice de la placa y una adecuada ionización de los analitos a estudiar. Antes de comenzar la extracción, el disolvente transcurre por el sistema aproximadamente unos cinco minutos para asegurar la limpieza y el arrastre de los posibles residuos que causen distorsión en la señal.

El componente principal del sistema es un pistón que se coloca sobre la superficie de sílice de la placa que se quiera extraer (**Figura 2.6 B**). La zona de la placa cromatográfica que se extrae mediante el pistón tendrá unas dimensiones dependiendo del cabezal de extracción ($4\times 2 \text{ mm}$ si es oval y $2\times 2 \text{ mm}$ si es circular). En principio, en todos los procesos que hemos realizado se utilizó el cabezal de tamaño oval porque es la mejor representación de la forma alargada de nuestras bandas.

En la superficie de la interfaz donde se coloca la placa, hay una escala graduada, de este modo se ajusta el láser (indica la posición exacta que va a ocupar el pistón a la hora de realizar la extracción) con la zona de interés a extraer, localizada previamente por densitometría. El pistón se sitúa en el máximo del pico cromatográfico, extrayendo la parte central del mismo, donde

se encuentra la mayor concentración de nuestro compuesto. De esta forma, se selecciona el área de trabajo con enorme precisión. Así, el disolvente que se dirige al espectrómetro de masas contendrá la mayor cantidad de muestra posible (**Figura 2.7 A**).

Acto seguido, se activa el mecanismo de funcionamiento impulsado por una corriente de N₂ a una presión de 3 bares, haciendo descender el pistón hasta situarlo sobre la placa (**Figura 2.7 B**). De esta forma, el metanol que circula a través del capilar interior entra en contacto con la sílice de la placa, llegando a extraer la zona deseada. Así, la muestra pasa al disolvente, que se impulsa mediante un capilar exterior hasta el espectrómetro de masas conectado on-line a la interfaz. La sílice de la fase estacionaria arrastrada se elimina mediante un filtro de acero inoxidable de 2 µm.

En la posición de limpieza, el pistón se encuentra levantado, la bomba HPLC y el espectrómetro de masas sin conectar, por lo que se realiza una presurización del sistema con N₂ repetida en varias ocasiones para dejar el filtro completamente limpio de sílica gel (**Figura 2.7 C**). En menos de un minuto se completa el proceso de extracción con la interfaz.

La primera extracción y elución transferida al MS en cada uno de los ensayos corresponde a una zona de blanco de la placa (impregnada con la solución correspondiente).

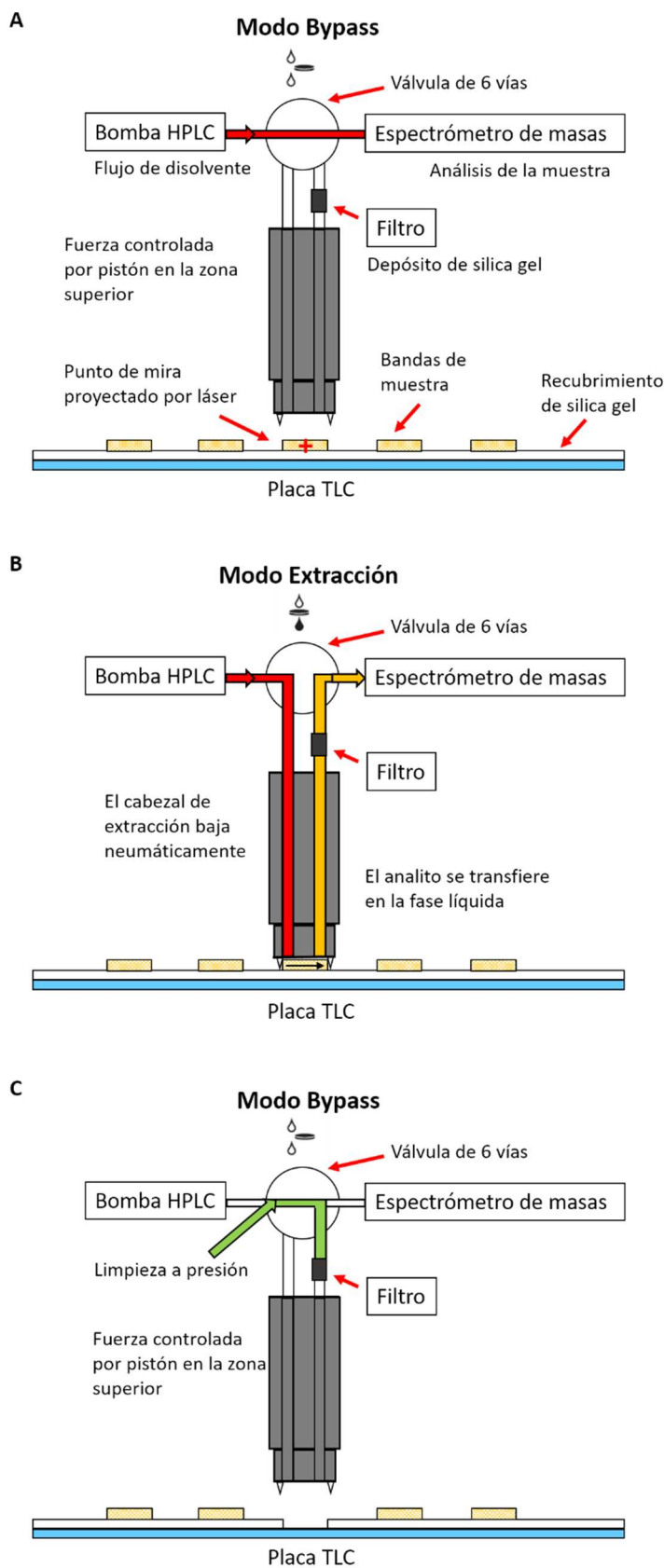


Figura 2.7 Esquema de operación de la interfaz TLC-MS. **A)** Posición de bypass, **B)** posición de elución y **C)** posición de limpieza con aire presurizado.

2.3.2 Espectrometría de masas (MS)

Las zonas de interés de la placa se eluyen on-line a un *espectrómetro de trampa de iones Esquire 3000 Plus* (Bruker Daltonics, Alemania) (**Figura 2.8 A**) mediante la interfaz TLC-MS descrita en la sección anterior.

Las condiciones del equipo para los análisis de un escaneo completo (m/z 50-2.0 $\cdot 10^3$), en modo electrospray (ESI) positivo (+) o negativo (-), fueron de $\pm 4.0 \cdot 10^3$ V (voltaje capilar) y de ± 500 V (end plate offset voltage). Se fijó en 40 psi la presión del gas de nebulización (N_2). El flujo y la temperatura del gas de secado (N_2) permanecieron constantes a 9.0 L \cdot min $^{-1}$ y 350 °C respectivamente.

Los resultados se recogen con el software de control del Esquire v. 5.3, llevando a cabo el tratamiento y procesamiento posterior de los datos con el programa informático DataAnalysis v. 4.0 SP 5 (ambos suministrados por Bruker Daltonics).

Las condiciones de operación para llevar a cabo los análisis ESI-MS n se especificarán en las secciones de resultados obtenidos dentro de cada uno de los capítulos.

A



B



Figura 2.8 Espectrómetros **A**) de trampa de iones Esquire 3000 Plus y **B**) micro cuadrupolo tiempo de vuelo.

En el caso de análisis HPTLC-HRMS, las zonas de interés se eluyeron en un *espectrómetro de masas ESI-micro cuadrupolo tiempo de vuelo* (micro-QTOF, Bruker Daltonics, Alemania) (**Figura 2.8 B**). De esta forma, se utilizó la bomba HPLC (Jasco PU-2080, Japón) impulsando un flujo de metanol a $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Como blanco, se eluye una porción de placa impregnada con la disolución de fluoróforo. Las condiciones para el análisis completo (m/z 50- $2.0 \cdot 10^3$) en modo ESI positivo corresponden a $+4.8 \cdot 10^3 \text{ V}$ (voltaje capilar) y $+500 \text{ V}$ (end plate offset voltage). Como presión del gas de nebulización (N_2) se fijaron 23 psi. El flujo y la temperatura del gas de secado (N_2) permanecieron constantes a $8.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ y $190 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente.

Con el software de control micro-QTOF v. 2.3 se almacenan los resultados, llevando a cabo el tratamiento y procesado posterior de los datos con el programa DataAnalysis v. 4.0 SP 5 (Bruker Daltonics).

A continuación se muestra un esquema global del acoplamiento on-line HPTLC-MS que se ha descrito en cada uno de los subapartados (**Figura 2.9**). En él se detallan el conjunto de las técnicas utilizadas en cada una de las etapas (aplicación, separación, detección e identificación de muestra), así como la instrumentación requerida (ATS4, AMD2, densitómetro, interfaz, espectrómetro de masas), para llevar a cabo el desarrollo de los resultados obtenidos en esta Memoria.

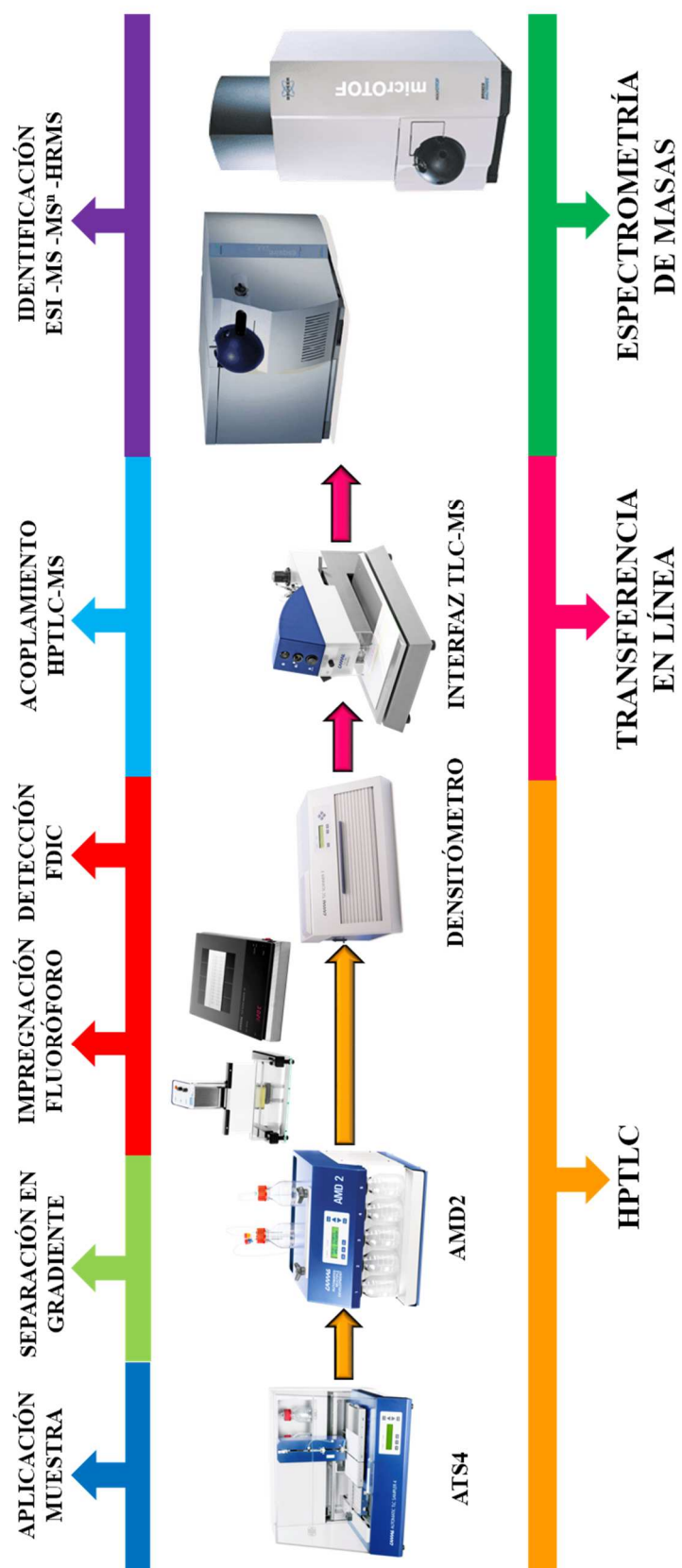


Figura 2.9 Esquema conjunto del acoplamiento on-line HPTLC-MS desarrollado en esta Memoria.

2.4 TÉCNICA BASADA EN ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Las medidas de fluorescencia llevadas a cabo en este trabajo se han desarrollado utilizando dos tipos de instrumentos:

2.4.1 Lector de placas

El “Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy™ HT”, suministrado por Biotek, es capaz de medir fluorescencia, absorbancia o luminiscencia (**Figura 2.10 A**). Para la medida de fluorescencia, este equipo cuenta con una lámpara de Wolframio (como fuente de excitación), un tubo fotomultiplicador (como detector) y dos ruedas de filtros para seleccionar la longitud de onda de excitación y de emisión deseadas (380, 420, 440, 485, 508, 530, 560 y 620 nm; con un ancho de banda espectral de 20 a 50 nm).

Otros parámetros instrumentales a seleccionar son: sensibilidad, modo de iluminación (top o bottom) y altura de la fibra óptica.

El lector de placas se ha utilizado siempre que ha sido posible para el ahorro de reactivos. Las medidas se han realizado en placas de plástico transparentes de 96 orificios (pocillos), Microtiter 92096 (TPP) y Nunc-Immuno™. El volumen total de un orificio es aproximadamente de 220 μL . Los datos se recogen utilizando el software Gen5™, exportando los resultados para ser tratados posteriormente a Microsoft Excel y OriginPro 8.

El principal inconveniente de este sistema es que las señales de fluorescencia durante los primeros segundos de la reacción se pierden, ya que desde que se inyectan los analitos en la placa, hasta que comienza la toma de datos transcurren unos segundos.

Las medidas cinéticas consisten en intensidad de fluorescencia vs. tiempo ($F=f(t)$). La colección de datos en un formato de gráfico minimiza la pérdida de información, ajustando los registros de puntos al gráfico facilitando la trayectoria de la imagen visual.

Para elegir las condiciones óptimas de medida se realizan varias pruebas. Finalmente, se selecciona una sensibilidad de 100, midiendo desde la parte superior (top), en una placa de plástico transparente, con una altura de fibra óptica de 1 mm, obteniendo así resultados que se consideran apropiados. Los filtros ópticos se eligen teniendo en cuenta la sensibilidad y la incertidumbre (ruido instrumental). Por último, los filtros de excitación/emisión utilizados para las medidas de fluorescencia de ChOx y ChOx-FS han sido 420/530 y 440/530, respectivamente. Estas condiciones de medida se han mantenido salvo en los casos indicados. En la mayoría de las ocasiones, las medidas se han llevado a cabo siguiendo la fluorescencia intrínseca de la ChOx.

En una medida convencional, las cantidades necesarias de enzimas (generalmente 50 μL de una disolución de ChOx $6.6 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 20 μL de una disolución de AP $440 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) junto con 100 μL de disolución tampon, se colocan en uno de los orificios de la placa. La placa se coloca en el interior del lector de placas, obteniéndose el valor de fluorescencia inicial (sin reacción). Después de 30 s la placa se retira, se inyecta el analito (50 μL de concentración adecuada), colocándose de nuevo en el lector con el fin de medir el cambio de fluorescencia durante la reacción. Es necesario crear un protocolo específico para cada medida que incluya las características de la medida, los intervalos de tiempo en el que se toman los valores de fluorescencia (para ambos procesos, línea base y reacción) y la secuencia de entrada y salida en la que se inyecta el analito en la placa. Durante los estudios de optimización, el orden de adición de los reactivos se ha modificado dependiendo del parámetro a estudiar.

En la mayoría de los casos, los valores brutos de intensidad de fluorescencia obtenidos durante la reacción F_t se dividen por el valor de intensidad de fluorescencia inicial antes de la reacción F_0 , para obtener la intensidad de fluorescencia corregida F_c , que es menos propensa a las variaciones de concentración de enzima entre los ensayos.

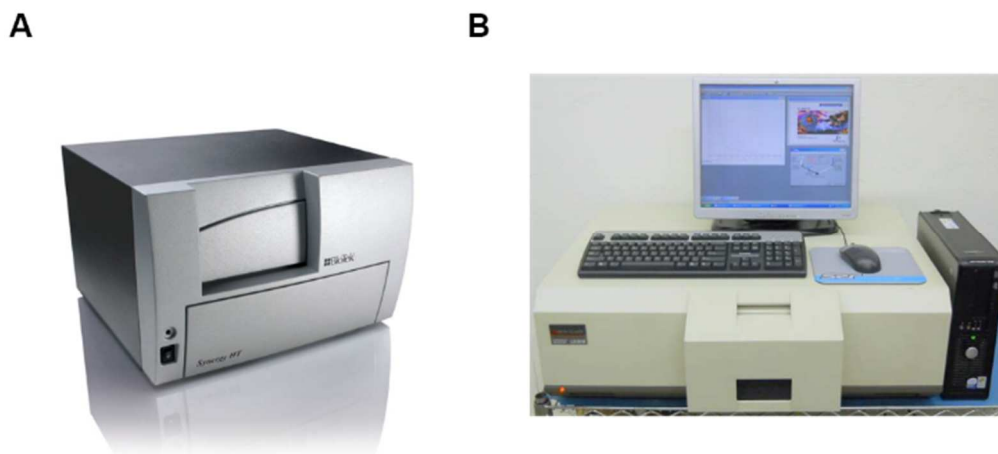


Figura 2.10 A) Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy™ HT y B) espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS-50B.

2.4.2 Fluorímetro

El espectrofluorímetro “Photon Technology International (PTI) Time Master” (modelo TM-2/2003-PTI), utiliza como fuente de excitación continua una lámpara de arco de Xe (potencia de 75 W modelo A-1010B). Como selector de longitud de onda tiene dos monocromadores (excitación y emisión), con precisión ± 1 nm, que permiten seleccionar en cada ensayo la longitud de onda de medida (λ), las anchuras de rendijas de excitación y de emisión. El detector, que permite seleccionar el voltaje de medida (V), es un fotomultiplicador analógico/digital (PTI-814). El equipo tiene un sistema magnético en el compartimento de muestra permitiendo la agitación continua de la disolución.

Las señales se recogen con el software PTI Felix 32, exportando los resultados para ser tratados posteriormente a Microsoft Excel y OriginPro 8.

Asimismo, se trabajó con el espectrofluorímetro “Perkin Elmer LS-50B” (**Figura 2.10 B**), con posibilidad de realización de los espectros 3D. Cuenta con una lámpara de Xe pulsada con una potencia equivalente a 20 kW durante 8 μ s. Como detector, dos fotomultiplicadores (de referencia y de muestra), con rangos de respuesta entre 200 y 650 nm. Para seleccionar la longitud de onda, dispone de dos monocromadores (excitación y emisión), con precisión ± 1 nm.

El ancho banda espectral está entre 2.5-15.0 nm (excitación) y 2.5-20.0 nm (emisión) (con incrementos de 0.1 nm). El compartimento de medida admite la agitación continua de la disolución. A este equipo también se le puede acoplar un lector de placas.

Las señales se recogen con el software FIWinlab de Perkin Elmer, exportando los resultados para ser tratados posteriormente a Microsoft Excel y OriginPro 8.

En ambos equipos (PTI y Perkin Elmer), las medidas de fluorescencia se llevan a cabo en cubetas de cuarzo (Hellma 109.004F-QS) en la que se mezclan los reactivos (longitud de paso óptico 1 cm). Se utilizarán las cubetas de volumen reducido (con 1.5 mL de volumen máximo de disolución). A lo largo del trabajo se indican las condiciones experimentales específicas (longitudes de onda, pH de medida, concentraciones de reactivos) utilizadas.

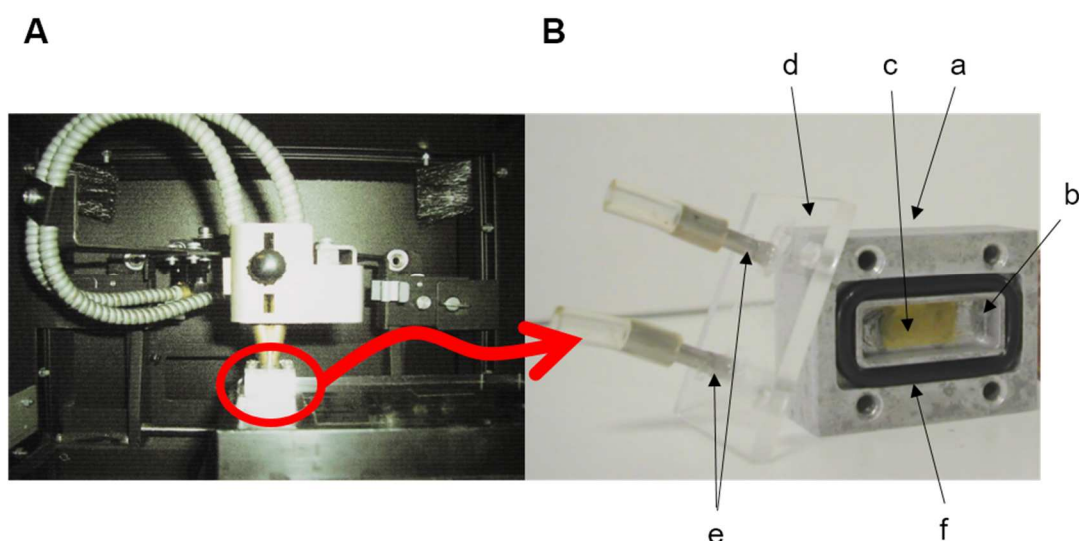


Figura 2.11 A) Sistema de acoplamiento de la celda de flujo al fluorímetro y **B)** celda de flujo utilizada para las medidas en la lámina sensora. **a.** Celda de acero inoxidable, **b.** orificio interno, **c.** lámina sensora, **d.** cubierta de metacrilato, **e.** tuberías de acero, **f.** arandela de silicona.

En cuanto a las medidas con la lámina sensora, se realizan en un sistema (**Figura 2.11 A**) ya descrito [96] acoplado al fluorímetro Perkin Elmer. Consiste (**Figura 2.11 B**) en (**a**) una celda de acero inoxidable (2.5x2.0x2.0 cm) con (**b**) un orificio en su interior (1.5x0.5x0.3 cm) en donde se coloca (**c**)

la lámina sensora. Este dispositivo se cierra mediante (d) una ventana de metacrilato, junto con (e) dos tuberías de acero de 0.5 mm de diámetro interno, por las que circulará el flujo de analito a través de la celda. Las dos piezas se fijarán por cuatro tornillos, (f) un anillo de silicona y pinzas Hoffmann, todo ello para evitar la pérdida de fluido al exterior de la celda. La celda se coloca en el instrumento sustituyendo a las placas de pocillos del lector de placas y utilizando las fibras ópticas para medir la fluorescencia. Durante la medida, se bombea tampon con un caudal de $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, suministrado por una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson) registrando la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda adecuada dependiendo de la medida. Cuando la señal es estable se inyectan 3 mL de disolución de analito, obteniendo la variación de fluorescencia correspondiente para después volver a pasar tampon hasta que la señal vuelve al origen.

2.5 OTRO MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO

- Micropipetas de volumen variable Wilson Pipetman y Socorex Acura Manual. Rangos de volumen: 10-100 μL , 50-200 μL , 100- $1.0 \cdot 10^3$ μL y 200- $1.0 \cdot 10^3$ μL .
- Baño de ultrasonidos JP Selecta Ultrasons analógico de 2.6 L de capacidad.
- Balanza analítica de precisión AND GR-202 (precisión hasta la centésima de miligramo).
- Centrífuga Beckman Coulter.
- Agitador orbital analógico Heidolph Rotamax 120.
- Potenciómetro Crison pH meter Basic 20.
- Jeringas de plástico, 1 mL, BD Plastipack™.
- Agujas metálicas, BD Microlance™ 3.
- Filtros de nylon de 25 mm de diámetro, con tamaño de poro de 0.20 μm , Whatman Puradisc.

2.6 REACTIVOS

2.6.1 Patrones y muestras

2.6.1.1 Identificación de SL en plasma humano (Capítulo 3)

- Globotetrahexosilceramida (Gb₄, ≥98%, Matreya 1068, CAS [11034-93-8]).
- Globotriaosilceramida (Gb₃, ≥98%, Matreya 1067, CAS [71965-57-6]).
- Liso-globotriaosilceramida (Liso-Gb₃, ≥98%, Matreya 1520, CAS [126550-86-5]).
- Lactosilceramida (LacCer, ≥98%, Matreya 1500, CAS [4682-48-8]).
- Glucosilceramida (GluCer, ≥98%, Matreya 1521, CAS [9884]).
- Esfingomielina (SM, ≥98%, Matreya 1051, CAS [85187-10-6]).

Cada patrón de los anteriores se disuelve en diclorometano (DCM)-metanol (MeOH) (1:1, v/v) antes de su aplicación en la placa cromatográfica. Estas disoluciones se preparan diariamente.

La muestra estudiada es plasma humano procedente de pacientes sanos y enfermos de la enfermedad de Fabry (Enfermedad de depósito lisosomal). Todas las muestras se han obtenido del Biobanco de Muestras de Aragón del Hospital Miguel Servet (Zaragoza), obteniéndose los permisos pertinentes del Comité de Bioética de Aragón para todo el desarrollo del trabajo.

2.6.1.2 Identificación de lípidos neutros y ácidos grasos (FA) en biodiésel (Capítulo 4)

- 1-Estearoil-*rac*-glicerol (C18:0, ≥99%, Sigma M2015, CAS [123-94-4]).
- 1-Oleoil-*rac*-glicerol (C18:1, ≥99%, Sigma M7765, CAS [111-03-5]).
- Gliceril 1,3-diestearato (≥99%, Sigma D8269, CAS [504-40-5]).
- Gliceril triestearato (≥99%, Sigma T5016, CAS [555-43-1]).
- Ácido oleico (C18:1, *cis*-9, ≥99%, Sigma O1008, CAS [9000-69-5]).
- Éster metílico del ácido oleico (C18:1, *cis*-9, ≥99%, Sigma 311111, CAS [112-62-9]).

Cada patrón de los anteriores se disuelve en DCM-MeOH (1:1, v/v) antes de su aplicación en la placa cromatográfica.

La muestra estudiada es un derivado de biodiésel-FAME suministrado por la compañía petrolera TOTAL (Solaize, Francia). Combustible diésel, y 10 B100 de aceite de origen vegetal (B100-1 a B100-7), de aceite de cocina de desecho (B100-8) y de aceite procedente de grasas animales (B100-9 y B100-10). Se han preparado mezclas de B100-3 junto con el diésel en diferentes proporciones (B5, B10, B20, B30, B40, B50).

2.6.1.3 Identificación de fosfolípidos (PL) unidos a proteínas de membrana en bacterias púrpuras fotosintéticas (Capítulo 5)

- Fosfatidilcolina (PC, $\geq 99\%$, Sigma P3556, CAS [8002-43-5]).
- Fosfatidiletanolamina (PE, $\geq 97\%$, Sigma P7943, CAS [39382-08-6]).
- Cardiolipina (CL, $\geq 98\%$, Sigma C0563, CAS [64043-42-1]).
- Fosfatidilglicerol (PG, $\geq 99\%$, Sigma P8318, CAS [80146-86-7]).

Cada patrón de los anteriores se disuelve en DCM-MeOH (1:1, v/v) antes de su aplicación en la placa cromatográfica.

Las muestras estudiadas son membranas púrpuras de bacterias fotosintéticas. Se trata de membranas *Rhodobacter blasticus* (*Rb. blasticus*), *Rhodobaca bogoriensis* ó LBB1 (en medios aerobios, anaerobios y el complejo fotosintético purificado) y *Rhodospirillum rubrum* (*Rd. rubrum* o *Rps. rubrum*). Todas procedentes del Laboratorio de Genética y Biofísica de Plantas, CEA-CNRS-Université de Aix Marsella (Francia).

2.6.1.4 Identificación de Ch-PL en leche materno-infantil (Capítulo 6)

- Fosfato de colina (ChoP, Sigma P0378, CAS: [72556-74-2]. Se prepara en disolución amortiguadora.
- Colina (Ch, $\geq 98\%$, Sigma C1879, CAS: [67-48-1]). Se prepara en disolución amortiguadora.
- Enzima colina oxidasa (ChOx) de *Alcaligenes* sp. ($13 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$, sólido liofilizado, Sigma C5896).

La enzima ChOx se prepara en disolución amortiguadora (NaHCO_3 y Na_2CO_3 , $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a pH 9.0 en agua Milli-Q) hasta obtener una disolución de $6.6 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$. Una unidad de ChOx se define como la cantidad de enzima que es capaz de oxidar un μmol de Ch por minuto a pH 8.0 y 37°C , generando dos μmoles de H_2O_2 y un μmol de glicina betaína (GB).

- Enzima fosfatasa alcalina (AP) de intestino de ternera ($1.0\cdot 10^4 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ en Tris-HCl $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.2, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 y $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnCl_2 , en 50% (p/v) glicerol, Sigma P4978).

La enzima AP se prepara en disolución amortiguadora (NaHCO_3 y Na_2CO_3 , $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a pH 9.0 en agua Milli-Q) hasta obtener una disolución de $440 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$. Una unidad de AP se define como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar un μmol de p-nitrofenil fosfato por minuto a 37°C .

Las disoluciones enzimáticas se fraccionan y se almacenan en viales en el congelador, para evitar así la desnaturalización. Diariamente se coge la fracción a utilizar.

La muestra estudiada es leche en polvo infantil (Milupa Aptamil 2).

2.6.2 Disolventes generales

- Diclorometano (DCM, estabilizado con ~ 20 ppm de amileno, UV, IR, HPLC, GPC, ACS, Panreac 361254.1612).
- Metanol (MeOH, HPLC-gradient grade, PAI-ACS, Panreac 221091.1612).
- Cloroformo (CHCl_3 , estabilizado con etanol, UV, IR, HPLC, HPLC preparativa, PAI, Panreac 361252.1611).
- Hidróxido de sodio (NaOH, pellets, ACS, ISO, Panreac 131687.1210).
- Ácido acético (HAc, glacial, HPLC PAI, Panreac 361008.1611).
- Acetato de etilo (AcOEt , $\geq 99.5\%$, Panreac 161318.1211).
- Tetrahidrofurano (THF, UV, IR, HPLC, GPC, Panreac 361736.1612).
- Nitrógeno ($\text{ALPHAGAZ}^{\text{TM}}$, $\geq 99.999\%$, Air Liquide).

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 95-98%, máx. 0.0000005% Hg, ACS, ISO, Panreac 471058.1611).
- n-heptano (UV, IR, HPLC, HPLC preparativa, PAI, Panreac 362062.1612).
- *tert*-butil metil éter (TBME, UV, IR, HPLC, Panreac, 363312.1612).
- NaHCO_3 y Na_2CO_3 (Sigma S5761y 222321). Preparación de disoluciones amortiguadoras $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 9.0 y 10.0 en agua Milli-Q.
- Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (Panreac 123018.1210 y Sigma S9763). Preparación de disoluciones amortiguadoras $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 7.0 y 8.0 en agua Milli-Q.
- Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma 329940). Preparación de disolución amortiguadora Tris-HCl, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 9.0, acidificada con HCl.
- Etanol (EtOH, gradiente HPLC, Panreac 221086.1612).
- Dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Panreac 131954.1611).
- Sephadex® G-50 (Sigma G-50150). Relleno de la columna cromatográfica.
- Las láminas de poliacrilamida (PAA) se sintetizan a partir de: Acrilamida (Sigma A3553); N,N'-metilenbisacrilamida (bis-acrilamida, Sigma M7279); persulfato de amonio (Sigma A3678) y N,N,N,N-tetrametilendiamina (TEMED, Sigma T9281).

2.6.3 Sondas fluorescentes

- Primulina (50% de contenido en fluoróforo, Sigma 206865, CAS [8064-60-6]).

El procedimiento operativo se realiza de la siguiente forma: se prepara una disolución de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de primulina en MeOH. Una vez que la cubeta de cristal del dispositivo se rellena con la disolución (**Figura 2.4 A**), se coloca la placa en el soporte correspondiente y se activa el sistema. La placa cromatográfica desciende en la cubeta sumergiéndose en el fluoróforo a una velocidad constante de $35 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. En el interior, la placa permanece $\sim 2 \text{ s}$, y acto seguido asciende terminando este proceso. Por la cara de cristal de la placa se retira la disolución sobrante con la ayuda de papel absorbente. Para eliminar el exceso de metanol, se coloca la placa en el calefactor (**Figura 2.4 B**), calentando durante 10 min a 30°C .

Una vez seca la placa, la colocamos en el densitómetro (**Figura 2.5 A**) para realizar las medidas de fluorescencia (lámpara de mercurio) excitando a 406 nm y recogiendo la emisión de fluorescencia con el filtro correspondiente a partir de 540 nm. Para conseguir la imagen que indique visualmente las bandas de muestra ya separadas en la placa, se utilizó el dispositivo que se muestra en la **Figura 2.5 B** excitando con una radiación UV de 366 nm.

Abajo se presenta el espectro obtenido por ionización APCI-MS obtenido al realizar una extracción con la interfaz TLC-MS sobre una zona de la placa impregnada con la disolución de 200 mg·L⁻¹ de primulina en MeOH, mostrando la composición real de la primulina utilizada en esta Memoria (**Figura 2.12**).

De esta forma, las fragmentaciones que se observan (a $2.0 \cdot 10^3$ V y $6.0 \cdot 10^3$ nA), demuestran que el fluoróforo es una mezcla de oligómeros cuya estructura básica aparece encuadrada a la derecha del espectro, siendo “n” el número de unidades de benzotiazol. La relación m/z 453.9 corresponde a los iones [M+H]⁺ (isómeros correspondientes a n=1), y m/z 321 (isómeros correspondientes a n=0).

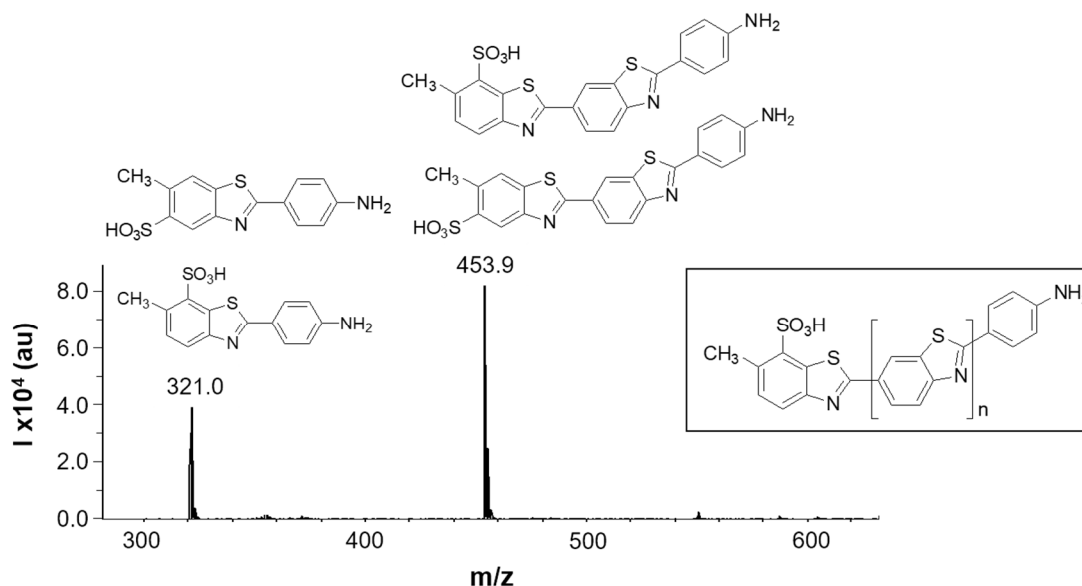


Figura 2.12 Espectro APCI-MS de la primulina (n: número de unidades de benzotiazol).

- Derivado de fluoresceína (FS, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 6-[fluorescein-5(6)-carboxamido] hexanoico, Sigma 46940, CAS: [114616-31-8]) (**Figura 2.13**).

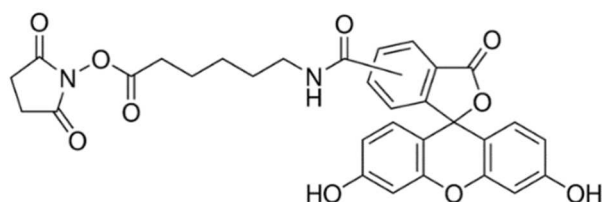


Figura 2.13 Estructura molecular del derivado de fluoresceína (FS).

- CFTM 405S succinimidil éster (SE, Sigma SCJ4600013) (**Figura 2.14**).

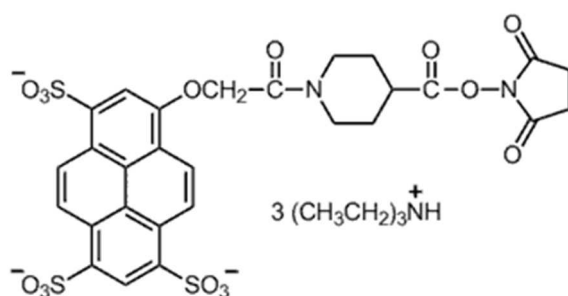


Figura 2.14 Estructura molecular del CFTM 405S succinimidil éster (SE).

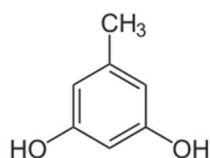
Estos dos últimos, FS y SE, son fluoróforos utilizados para el marcaje enzimático.

En el caso de la FS, se prepara una disolución de 1.0 mg de marcador, en 0.1 mL de dimetil sulfóxido anhidro (DMSO) (**Sección 6.3.2 y 6.4.1**), y en el caso de SE, se prepara una disolución de $1 \cdot 10^{-6}$ moles de marcador, en 150 μ L de DMSO (**Sección 6.4.1**).

2.6.4 Agentes derivatizantes selectivos de azúcares

- Orcinol ($\geq 97\%$, Sigma 447420) (**Figura 2.15 A**).
- β -naftol ($\geq 99\%$, Sigma 185507) (**Figura 2.15 B**).

A



B

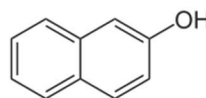
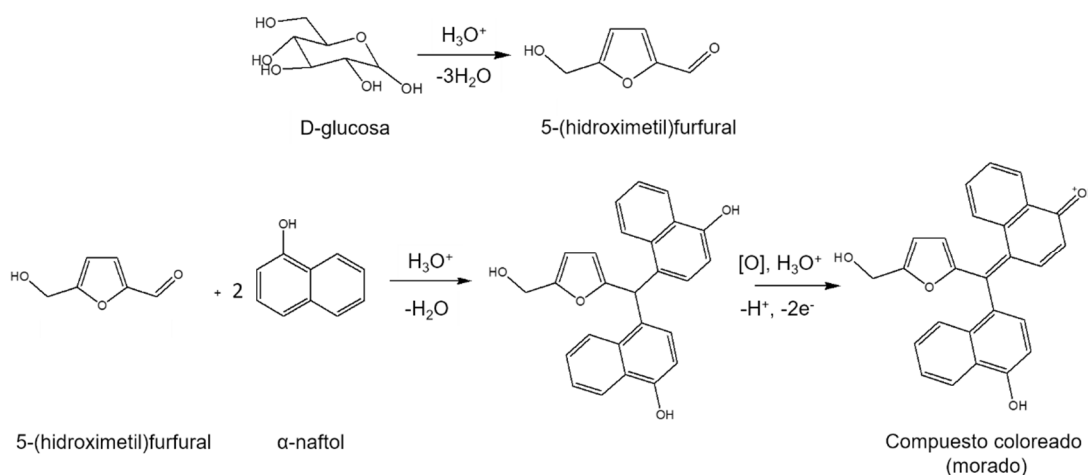


Figura 2.15 Estructura molecular del **A)** orcinol y **B)** β -naftol (según Sigma).

Para llevar a cabo la identificación de glúcidos en la molécula, se hará reaccionar la solución de prueba con H_2SO_4 concentrado en presencia de orcinol o β -naftol. Se prepara una disolución de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 al 10% (v/v). Los glúcidos al reaccionar con ácidos fuertes como el sulfúrico concentrado, se deshidratan formando furfural si son pentosas o hidroximetilfurfural si son hexosas, que por condensación con orcinol o β -naftol producen complejos de color púrpura-violeta. Se conoce como reacción de Molisch (**Figura 2.16**). La reacción entre el ácido sulfúrico y el orcinol o β -naftol forma un anillo de color verde claramente visible cuando no hay glúcidos. Cuando la concentración de glúcidos es alta, se forma un precipitado rojo que al disolverse, colorea la solución.

**Figura 2.16** Reacción de Molisch, que detecta la presencia de glúcidos en una muestra.

Para la impregnación de la placa vuelve a utilizarse el dispositivo empleado en el apartado anterior (**Figura 2.4 A**). El procedimiento operativo es similar al desarrollado con primulina pero sumergiendo la placa en la disolución de orcinol o β -naftol. Antes de introducir la placa en el densitómetro (**Figura 2.5 A**), para eliminar el exceso de H_2SO_4 se coloca ésta en el calefactor (**Figura 2.4 B**), y permanece allí 5 minutos a 120°C . Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar la placa a temperatura ambiente algunos minutos, tras los que se escaneará con el densitómetro midiendo la absorción (lámpara deuterio y wolframio) a 550 nm .

Para adquirir la imagen de la placa, como en el caso anterior utilizamos el mismo dispositivo (**Figura 2.5 B**), realizando la medida esta vez con radiación de luz blanca transmitida.

CAPÍTULO 3

SEPARACIÓN, OBTENCIÓN DE PERFILES
E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES
MOLECULARES DE ESFINGOLÍPIDOS
NEUTROS EN PLASMA HUMANO

3.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un grupo de aproximadamente 50 desórdenes metabólicos raros y de origen genético, causados por disfunciones del lisosoma celular, normalmente a consecuencia de la deficiencia en una única enzima que causa una acumulación de diferentes esfingolípidos (SL) en la célula [97]. Entre ellos, algunos SL neutros como las glucosilceramidas (GluCer), globotriaosilceramidas (Gb₃) y esfingomielinas (SM), se han considerado biomarcadores de las enfermedades de Gaucher, Fabry y Niemann-Pick, respectivamente, si bien no se han desarrollado todavía métodos eficaces para el diagnóstico de estas enfermedades. El incremento relativo de estos SL en fluidos (plasma, orina) y en ciertos tejidos humanos se ha asociado con la progresión de la enfermedad o con la respuesta (o falta de respuesta) a la Terapia de Sustitución Enzimática (ERT), una técnica que pretende aportar al paciente la enzima cuya deficiencia produce la enfermedad [97-101].

Los SL no son compuestos puros. Cada SL es una mezcla de varias especies moleculares, que se suelen denominar isoformas (diferentes cadenas de ácidos grasos acopladas por un enlace amida a la cadena esfingoide de la ceramida), y análogos (con bases esfingoides diferentes a la esfingosina d18:1). Asimismo, los liso-esfingolípidos (liso-SL) son aquellos que tienen el mismo grupo polar que el SL relacionado pero solamente conservan la cadena esfingoide en lugar de la ceramida completa. En humanos, la cadena esfingoide predominante es la esfingosina.

Varios trabajos sugieren que ciertas especies moleculares de los SL [100], además de sus liso-derivados [101, 102] pueden ser también biomarcadores efectivos de algunas EDL.

Recientemente, Schiffmann *et al.* [103] encontraron que las concentraciones de Gb₃ se elevan no solo en pacientes con enfermedad de Fabry, sino también en una población general de pacientes que habían sufrido enfermedades de corazón no relacionadas con Fabry. De acuerdo con este

estudio, los niveles elevados de Gb₃ podrían constituir un marcador de riesgo con valor pronóstico para evaluar un riesgo de muerte a corto plazo.

La separación e identificación de isoformas y análogos de SL, se realiza fundamentalmente mediante Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (UPLC-MS) tándem [101, 102, 104]. Las ventajas e inconvenientes de esta técnica han sido discutidos en el **Capítulo 1**. Aunque tiene una gran eficacia en la separación, puede no ser, en ocasiones, la mejor opción en función de la información que se pretenda obtener y la rapidez requerida para el análisis.

3.1.1 HPTLC de SL

En este capítulo, pretendemos evaluar la posibilidad de utilizar HPTLC acoplada a MS tándem y HRMS para el análisis de SL en plasma humano a partir de una única placa cromatográfica y, por tanto, evaluar su potencial aplicación en el análisis lipidómico.

En la bibliografía se encuentran algunos métodos HPTLC que fueron desarrollados para la separación de SL neutros [43, 44, 47, 67]. Sin embargo, llevar a cabo un análisis completo sobre una única placa plantea varios problemas relativos a la separación, detección/cuantificación y, finalmente, transferencia a MS.

La tecnología AMD se ha utilizado en alguna ocasión para separar SL. En esos casos, la detección densitométrica fue llevada a cabo previa derivatización [47,105-115] con CuSO₄/H₃PO₄ [105-113], orcinol [68, 116-118] o resorcinol [115] ya que los SL presentan una pobre absorción en UV. La desventaja de los derivatizantes antes mencionados es la destrucción de la muestra y el hecho de que no se conozca la estequiometría de las reacciones implicadas, lo que hace que no se pueda controlar la señal obtenida. Actualmente, los densitómetros modernos permiten llevar a cabo la detección a 190 nm, longitud de onda a la que los SL absorben, si bien los SL con cadenas saturadas de ácidos grasos no presentan respuesta.

Fluoróforos como la berberina o la primulina han sido utilizados para la detección, por los aumentos que experimenta su fluorescencia al interaccionar con SL, y en general, lípidos con largas cadenas hidrocarbonadas. Los lípidos incrementan la fluorescencia de base de estos fluoróforos mediante interacciones dipolares inducidas, no específicas [44, 67, 68, 114, 116-120] en medio sílica gel.

Fluoróforos catiónicos como la berberina o la coralina, son buenos ejemplos de este comportamiento en presencia de hidrocarburos saturados [121, 122] y también de SL [47]. Cuanto más larga es la cadena hidrocarbonada, mayor será la respuesta fluorescente. Se propuso un modelo para explicar ese incremento en la emisión [121, 123]. Este modo de detección, adaptado a la densitometría tras separación HPTLC, se conoce como FDIC, siglas que corresponden a detección fluorescente por cambios de intensidad [47, 124]. La magnitud de la emisión puede variar al modificar los parámetros cromatográficos, así como la concentración de fluoróforo. De este modo, FDIC puede usarse para fines cuantitativos [125] mediante una simple pre- o post-impregnación de la placa.

En un trabajo anterior en el que separamos SM del resto de SL en plasma mediante AMD en dos etapas (gradiente MeOH-DCM desde 80:20 a 50:50, v/v, para una distancia de migración total de 50 mm), FDIC fue utilizado para semicuantificar la clase de SM, con un RSD <6%. La cuantificación incluyó adición de patrón (una esfingomielina patrón, de cadena d:18) y calibración no-lineal. Sólo una placa fue necesaria para realizar el análisis [59].

Respecto a la transferencia de las bandas SL al equipo MS, se suele realizar todavía en la mayoría de los trabajos en modo off-line. Así, el aislamiento de las bandas SL se realiza mediante el rascado de la placa, extracción de la sílica gel, eliminación del disolvente en rotavapor e introducción de la muestra en el equipo MS. La interfaz HPTLC-MS se ha utilizado en contadas ocasiones. Así, existe un precedente en la extracción automatizada de bandas SL de Stratum Corneum, tras separación y detección. En este caso, las bandas fueron detectadas mediante

derivatización con $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, por lo cual se necesitó realizar una segunda placa gemela (sin derivatizante) para así obtener las coordenadas de las bandas y poderlas transferir.

Otro ejemplo de utilización de la interfaz ha sido el trabajo de Park *et al.* [60] para separar e identificar glicosfingolípidos ácidos (gangliósidos y sulfátidos) por ESI-MS (en modo negativo). Así, los glico-SL ácidos de cerebro bovino fueron desarrollados mediante HPTLC en modo isocrático con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Cl}_2\text{Ca}$ en H_2O (55:45:10, v/v/v), en dos placas gemelas, y detectados mediante post-impregnaciones con orcinol y primulina. Posteriormente, la banda correspondiente a los glico-SL así revelados (primulina) fue transferida mediante la interfaz para su identificación MS.

Dreisewerd *et al.* [117] ya habían mostrado que la primulina era compatible con la ionización MALDI (asistida por matriz) tras raspado manual de la placa [118].

En un trabajo previo al detallado en esta Memoria y realizado por nuestro grupo [59], se separaron los SL neutros del plasma y la placa de sílica gel fue posteriormente impregnada con primulina. Las bandas fueron extraídas con la interfaz sin eliminación del fluoróforo, que mostró ser compatible con las ionizaciones ESI y APCI. En efecto, la primulina no interaccionó permanentemente con los SL, y además, el rango de peso molecular de la primulina (MW: 475) tampoco interfirió con el de los SL estudiados. En dicho estudio, diversos aductos de sodio de especies moleculares de SM fueron identificados mediante comparación de los espectros ESI-MS y APCI-MS de las bandas de SM con los espectros de los correspondientes patrones de SM. Aunque este método no proporciona una identificación inequívoca de los iones de los espectros, sí que da una idea aproximada de las especies de SM en la muestra. Lógicamente, lo deseable es obtener espectros MS/MS, que es uno de los objetivos de esta Tesis. Para ello, se optó por la ionización ESI, que ha sido utilizada fundamentalmente para caracterizar compuestos con alta polaridad [34], aunque no sea tan eficaz con compuestos menos polares, que son más difícilmente ionizados. De todos modos, ESI es la ionización de elección en el caso de los lípidos. No obstante, en el trabajo citado [59] se

mostró que la ionización APCI puede ser de utilidad, aportando información complementaria, en el caso de lípidos de baja polaridad.

3.2 OBJETIVOS

En la potencial utilización de HPTLC-MS tándem y HRMS en lipidómica pretendemos aprovechar varias ventajas, tanto las inherentes a la HPTLC (su facilidad de uso, razonable rapidez en la ejecución y alto número de muestras por placa), como las derivadas del acoplamiento propuesto con técnicas MS, como el acceso selectivo a la zona de la placa (esto es, la clase de SL) deseada para el análisis. Esta separación HPTLC y el acoplamiento online permitirían un pre-fraccionamiento en clases (en este caso, de SL) que daría como resultado un análisis intermedio entre el de infusión shotgun (con introducción de la muestra completa) y el de UPLC (separación cuasi-molecular de las especies individuales). Además, la eliminación post-cromatográfica de la fase móvil y la utilización de un único disolvente (MeOH) para la extracción automatizada con la interfaz, evitarían diferentes respuestas en la ionización al evitar la introducción de gradientes de disolventes en ESI. Esto posibilitaría la obtención de perfiles semicuantitativos con las especies moleculares de lípidos de cada clase. Además la supresión iónica no tiene por qué ser diferente de las descritas para los métodos shotgun o LC-MS.

Así pues, se pretende desarrollar métodos para evaluar la viabilidad de utilización en lipidómica de HPTLC-MS en muestras reales de plasma humano que contienen SL en rangos de concentración bajos (caso de las SM) o muy bajos (Gb₃), del orden en este caso de menos de 2 µg·mL⁻¹, y evaluar si HPTLC-MS puede ser una herramienta complementaria a LC-MS para el análisis de muestras biológicas complejas, como se verá también en el **Capítulo 5**.

Como se ha expuesto en la **Sección 1.9.1** la utilización de las técnicas MS tándem y HRMS se basan en la hipótesis de que existen condiciones adecuadas para formar aductos sodiados estables (en modo ESI⁺).

La obtención de espectros explotables MS/MS (en general, MS^n) y/o de alta resolución (HRMS) de lípidos directamente desde la placa, que constituiría un avance importante, se ha visto hasta ahora impedida por la ubicua presencia de iones sodio durante el proceso cromatográfico (placa, tubos, etc.), que causa una pobre fragmentación de los iones aislados y su coexistencia con iones sodiados, complicando o impidiendo la interpretación estructural de los espectros.

Se obtendrán condiciones de trabajo para que los aductos de sodio, formados a partir de una amplia variedad de lípidos, puedan ser fragmentados en modo ESI positivo, directamente desde la placa cromatográfica, y que el sodio permanezca como la carga de fragmentos iónicos estables, siendo así útiles para su inequívoca identificación estructural en muestras complejas a través de los espectros MS^n y HRMS. Es decir, que se formen exclusivamente aductos sodiados.

De este modo, y tras un procedimiento de preparación del plasma que incluye extracción, centrifugación e hidrólisis alcalina, se estudiarán las condiciones de separación SM y Gb_3 de plasmas de individuos sanos y enfermos de Fabry y la obtención online a partir de la placa de los espectros ESI-MS para obtener los perfiles y los espectros MS^n para la identificación de las especies moleculares de ambas clases de SL.

También se abordará el problema de la detección de liso- Gb_3 .

El trabajo también demostrará que el uso de primulina no va a ser necesario sino que podremos obtener las coordenadas de las bandas mediante detección UV a 190 nm. Aunque los SL saturados no absorban a esta longitud de onda, su coelución en la misma clase que los respectivos SL con cadenas no saturadas garantiza que la banda va a ser correctamente detectada para su transferencia a MS, donde las isoformas saturadas serán identificadas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Preparación de muestra

Antes de comenzar con la determinación de SL en plasma humano, se lleva a cabo la preparación de la muestra, basado en una variante del procedimiento estandarizado descrito en la bibliografía [59, 126].

Alícuotas de 250 μL de plasma se extrajeron con 2 mL de cloroformo (CHCl_3)-MeOH (1:1, v/v) en un agitador de varilla (Heidolph® RZR 2021), a 140 revoluciones por minuto (rpm) con agitación constante durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron 10 min a $4.5 \cdot 10^3$ rpm en una centrífuga (Beckman Allegra X-22R) a 19 °C para lograr la separación de fases y la precipitación de proteínas. Este precipitado se descartó.

El líquido superior se sometió a una hidrólisis básica añadiendo 150 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, incubándose mediante el agitador de varilla mencionado a 140 rpm (agitación constante) en un baño termostatzado a 40 °C, durante 2 h.

A continuación, se produjo una nueva separación de fases; para ello, se añadieron 10 μL de ácido acético (HAc) (ajuste de pH), y acto seguido 1 mL de MeOH y 1 mL de agua (para favorecer dicha separación). Se centrifugó el vial durante 10 min a $4.5 \cdot 10^3$ rpm y 23 °C en la centrífuga mencionada. Se formaron dos fases separadas por una capa intermedia de proteínas. Dependiendo de nuestro objetivo retiramos una u otra fase para su posterior etapa de secado. Si nuestro interés era el estudio de los grupos de SM, Gb₃ y Gb₄ en el plasma, se transfería la fase orgánica (inferior) a un nuevo vial; al contrario que si nuestro estudio se centraba en los grupos de liso-Gb₃ donde la fase transferida sería la acuosa (superior), siempre ayudados por una pipeta Pasteur y jeringa para atravesar la capa sólida intermedia de proteínas. La fase de interés se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 , reconstituyendo las muestras en 250 μL de DCM-MeOH (1:1, v/v), volviendo al volumen inicial.

3.3.2 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC

Una vez llevado a cabo el tratamiento de la muestra, se utilizó el equipo Automatic TLC Sampler IV (ATS4) para la aplicación de ésta sobre la placa cromatográfica. Pasos en su manejo:

1. Establecer las condiciones relacionadas con la aplicación en WinCATS (número de calles, forma, dimensión y distancia entre bandas. Velocidad y volumen de aplicación de cada disolución (patrón o muestra) en cada banda. Etapas de limpieza de la jeringa de aplicación.
2. Colocar en el orden correspondiente los patrones y la muestra en los compartimentos adaptados para ello. Así como el disolvente de limpieza en el que deben ser solubles los analitos aplicados.

Para conseguir aplicar una determinada masa del patrón sobre la placa, se pueden utilizar disoluciones diluidas inyectando un volumen muy alto de las mismas, o por el contrario, preparar disoluciones concentradas e inyectar así volúmenes pequeños. Cuando se trabaja con patrones, es más correcto hablar de masa aplicada y no de volumen inyectado.

En lo referente a las muestras, la baja concentración que se preveía de algunos SL, nos obligó a inyectar volúmenes altos.

Todos los patrones y muestras se aplicaron en forma de bandas, garantizando una distribución más homogénea de cada disolución.

Previamente a la aplicación, patrones y muestras se disolvieron en una disolución mezcla de DCM-MeOH (1:1, v/v). Los patrones correspondientes de SL se aplicaron en la misma placa en forma de bandas de 4 mm, con una masa depositada de 0.01-1.0 $\mu\text{g}/\text{banda}$ (volúmenes: 0.1-10.0 $\mu\text{L}/\text{banda}$, concentración: 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), distancia entre calles de 2.5 mm, distancia desde el lateral y desde el extremo inferior de la placa de 10 mm.

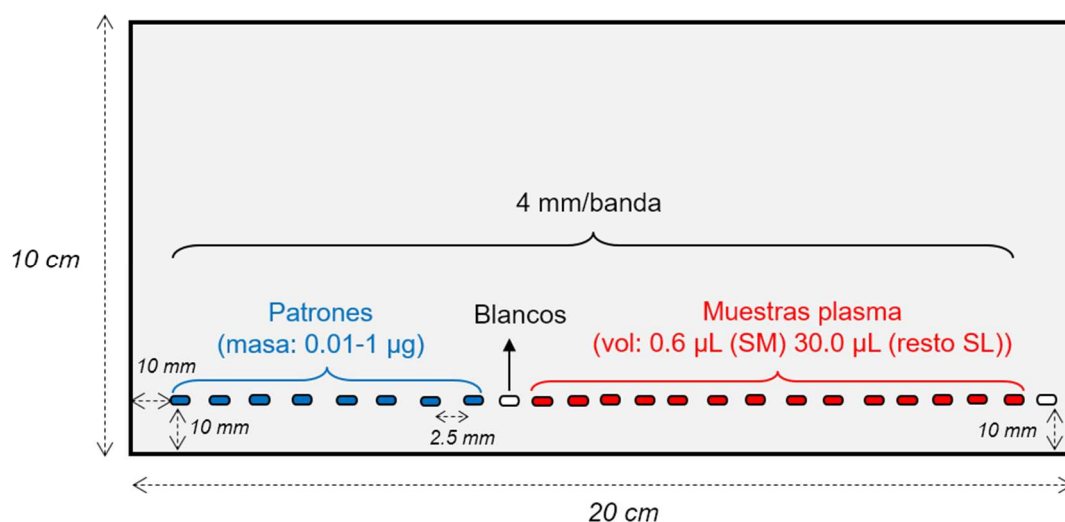


Figura 3.1 Aplicación de patrones y muestras (plasma) en la placa de sílica gel.

Se dejó una calle vacía sin realizar aplicación como análisis en blanco. A continuación, se aplicó en la misma placa la muestra de plasma, 0.6 µL/banda para la determinación de SM y 30 µL/banda para la identificación del resto de SL de nuestro interés presentes en el plasma. Finalmente, se dejó otra calle vacía como experimento en blanco (**Figura 3.1**).

Los patrones de esfingolípidos estudiados corresponden a esfingomielina (SM), glucosilceramida (GluCer), lactosilceramida (LacCer), globotriaosilceramida (Gb₃), liso-globotriaosilceramida (liso-Gb₃) y globotetraosilceramida (Gb₄) (**Figura 3.2**).

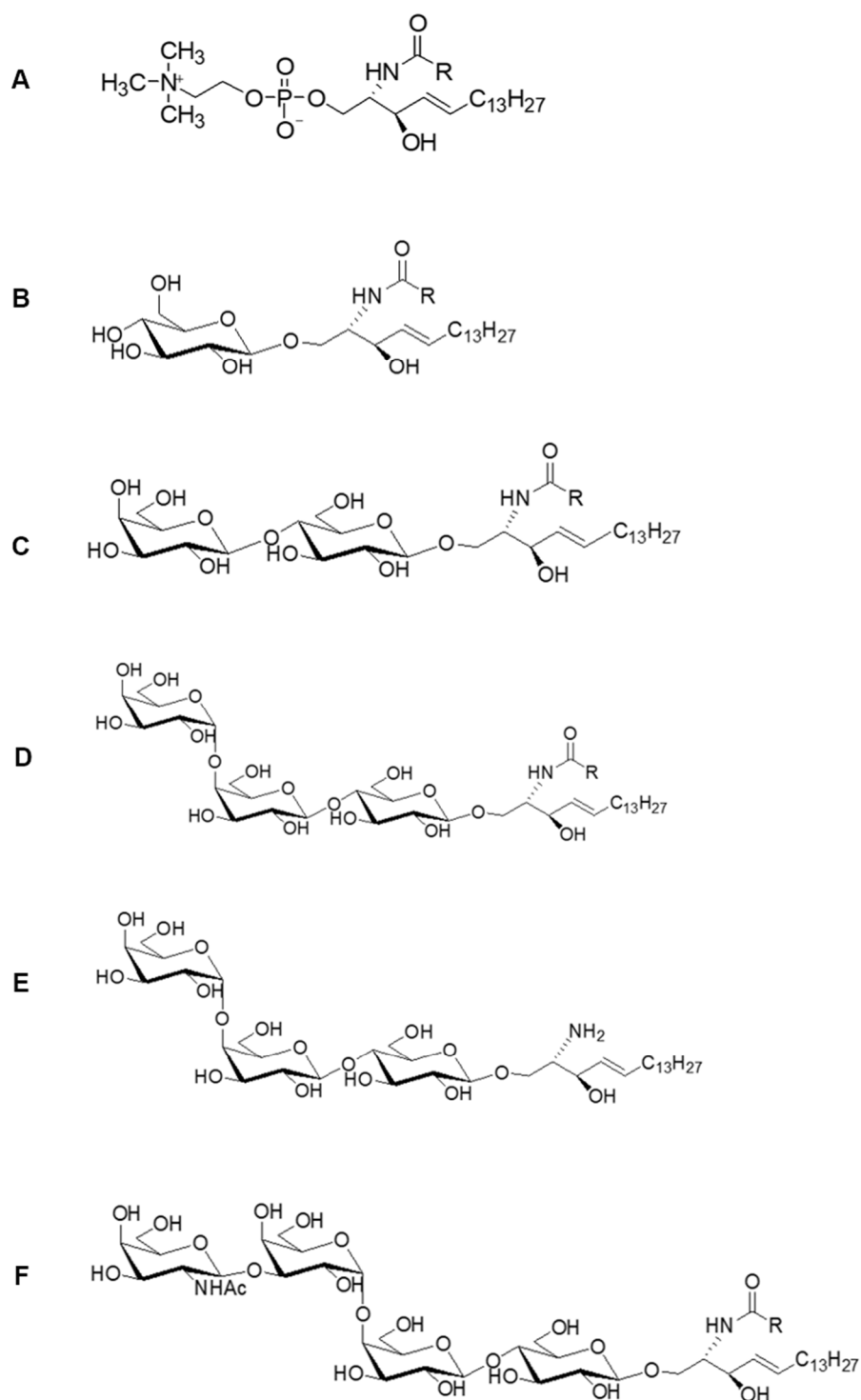


Figura 3.2 Estructuras químicas de los esfingolípidos estudiados. **A)** esfingomielina (SM), **B)** glucosilceramida (GluCer), **C)** lactosilceramida (LacCer), **D)** globotriaosilceramida (Gb₃), **E)** liso-globotriaosilceramida (liso-Gb₃) y **F)** globotetraosilceramida (Gb₄).

3.3.3 Desarrollo cromatográfico AMD

El siguiente paso en nuestro estudio fue la obtención de una secuencia de elución aplicable a la resolución de SL neutros patrón.

El desarrollo cromatográfico se llevó a cabo utilizando el sistema AMD2. Se tomó como punto de partida una secuencia que constaba de nueve etapas, con 1h 15 min de duración. Se recoge la composición de cada una de las etapas y de la distancia que recorre el disolvente por la placa (**Figura 3.3**).

En la primera etapa, con la que se desplaza la SM, la fase móvil se compone de una mezcla de metanol MeOH-DCM (80:20; v/v), recorriendo la placa hasta llegar a md 20 mm desde el punto de aplicación. Este compuesto seguirá eluyendo en las siguientes cinco etapas, aunque ya no se ve afectada su resolución llegando a quedar retrasado en la placa con respecto al resto de analitos.

Las siguientes cinco etapas semejantes en las que la fase móvil se compone de MeOH-DCM (50:50; v/v), hasta llegar a 30 mm, tienen como objetivo focalizar el Gb₃, ya que es el pico más ancho de los SL a estudiar.

A continuación, para separar la LacCer del resto de SL se contó con la etapa 7, formada por una mezcla de MeOH-DCM (70:30; v/v), hasta 40 mm; así como la GluCer desplazándola con la etapa 8, formada por una mezcla de MeOH-DCM (80:20; v/v), hasta 50 mm.

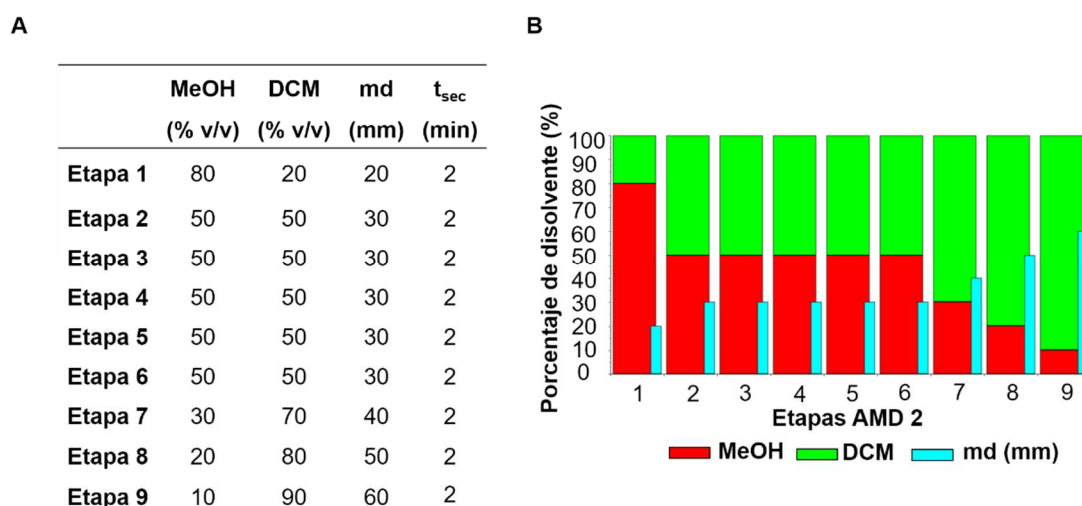


Figura 3.3 A) Valores del gradiente de elución en nueve etapas, basado en mezclas binarias de MeOH-DCM, para separación de esfingolípidos neutros en extractos orgánicos de plasma humano. **B)** Representación de las condiciones de gradiente de elución: MeOH ■, DCM ■, md ■.

Como alguno de estos compuestos no eluía con el frente de fase móvil, se decidió dejar una separación de 10 mm entre las md, para asegurarnos una separación de picos correcta. La última etapa que componía este gradiente consistía en una limpieza final hasta md 60 mm.

Nuestro objetivo era comprobar si esta secuencia podía resolver la identificación de los SL neutros procedentes del plasma correspondiente a este estudio. Por lo tanto, en nuestro trabajo se optimizaron las condiciones centrándonos y ampliando la zona de desarrollo de Gb₃, con el objetivo de su identificación en la muestra de plasma.

Se mantuvo la fase móvil de MeOH-DCM (50:50; v/v), hasta md 30 mm en gradiente y se eliminaron las etapas 1 y 8, aumentando las md en las etapas 7 y 9 (**Figura 3.4**). La duración global del desarrollo era de 1h 10 min.

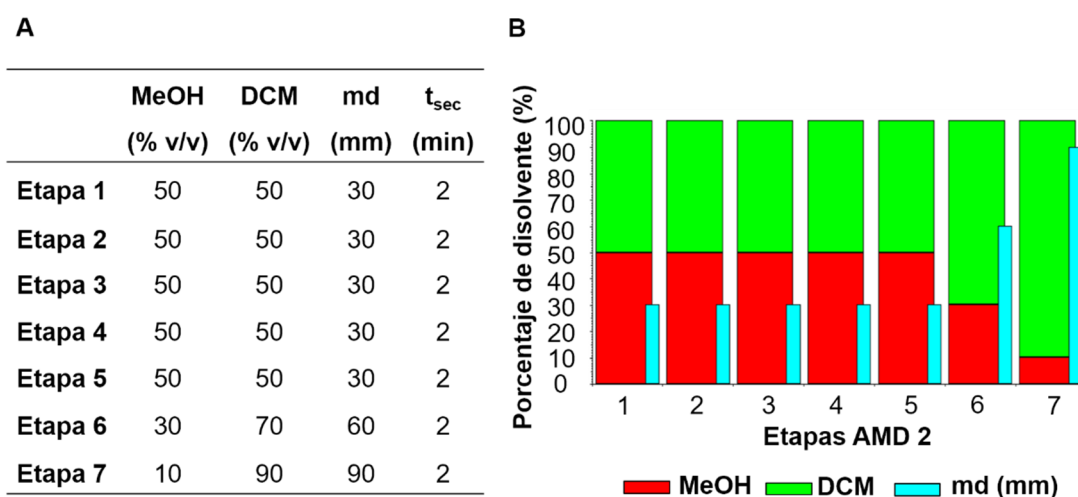


Figura 3.4 A) Tabla del gradiente de elución en siete etapas, basado en mezclas binarias de MeOH-DCM, para separación de esfingolípidos neutros en extractos orgánicos de plasma humano. **B)** Representación de las condiciones de gradiente de elución: mismos colores que en **Figura 3.3 B**.

Finalmente se decidió trabajar con esta secuencia centrándonos en la zona de desarrollo de Gb₃.

3.3.4 Detección por densitometría de barrido

En este apartado, se utilizó el densitómetro TLC Scanner 3 ajustando las condiciones de medida del haz a las dimensiones correspondientes de cada banda. Como en la muestra de plasma las bandas aplicadas eran de 4 mm de anchura, se fijó un tamaño de haz de medida de 4x0.2 mm. Los barridos que se realizaron fueron lineales.

Tras la elución cromatográfica, la placa no se sometió a ningún tratamiento o derivatización, ya que la detección posterior se realizó inicialmente mediante absorción de la radiación a 190 nm. No fue necesaria la impregnación con primulina ni con otros agentes (orcinol, resorcinol o β -naftol) ya que lo que se pretende es localizar las bandas para enviarlas al MS mediante la interfaz.

Se midió la absorción de los compuestos a la longitud de onda mencionada obteniendo el cromatograma AMD correspondiente a: liso-Gb₃ a md 10.0 mm (pico 1), SM a md 16.9 mm (pico 2), Gb₃ y Gb₄ a md 29.6 mm (picos 3 y 4), LacCer a md 47.6 mm (pico 5) y GluCer a md 55.9 mm (pico 6) patrón (**Figura 3.5**).

Hay que destacar que los patrones han sido aplicados en este caso individualmente, y que el uso de mezclas llevó exactamente a la misma separación.

Aplicando este gradiente, bajo las condiciones AMD descritas se obtienen los perfiles cromatográficos del material lipídico correspondiente a la muestra de plasma. La separación de SL neutros en la placa de sílica gel tiene lugar de acuerdo a la polaridad de dichos lípidos. Los glicoesfingolípidos se separan en función del número de unidades de azúcar presentes en la molécula. Cuanto mayor sea el número de azúcares en la molécula, mayor polaridad y menor distancia de migración en la placa cromatográfica.

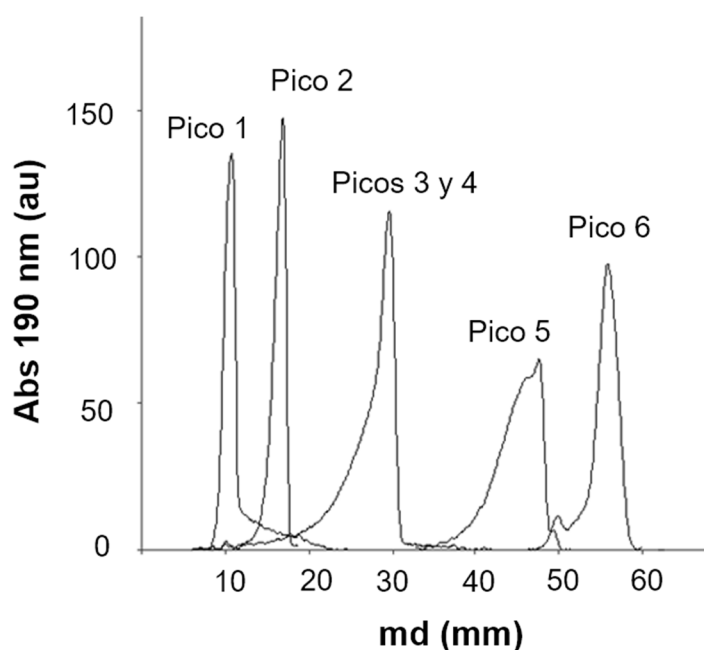


Figura 3.5 Cromatograma HPTLC-UV de los patrones siguientes: liso-Gb₃ a md 10.0 mm (pico 1), SM a md 16.9 mm (pico 2), Gb₃ y Gb₄ a md 29.6 mm (picos 3 y 4), LacCer a md 47.6 mm (pico 5) y GluCer a md 55.9 mm (pico 6). Condiciones de AMD en **Figura 3.4**. Absorción UV a 190 nm.

Como la distancia de migración no es un criterio suficiente para atribuir la identidad de las bandas separadas en la muestra (**Figura 3.6**), se identificaron (16.7 y 28.4 mm) mediante la técnica MS “on line” con ayuda de la interfaz (**Sección 3.3.5 y 3.3.6**).

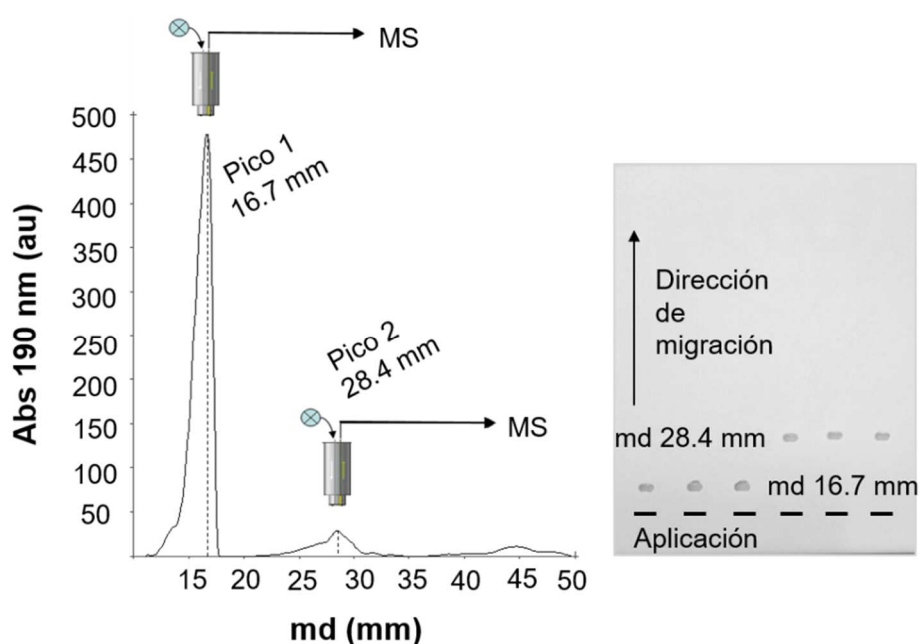


Figura 3.6 Cromatograma HPTLC-UV a 190 nm obtenido en el extracto de plasma humano (30 μ L). Se observan las especies moleculares de SM (pico 1: md 16.7 mm), y Gb₃ (pico 2: md 28.4 mm) extraídos mediante la interfaz y llevados directamente al espectrómetro de masas. A la derecha del cromatograma aparece un detalle de la placa final perforada en forma de bandas que corresponden a las distancias de migración de cada pico.

Hay que destacar la complejidad de los perfiles de los SL del plasma humano pues su obtención depende de la técnica analítica utilizada, la variabilidad del plasma de cada individuo y el método de preparación que ha seguido la muestra [18]. Como muestra la literatura, no existe ningún protocolo que extraiga todas las subespecies presentes en el plasma con un rendimiento alto [18, 37]. Ni siquiera el trabajo más exhaustivo sobre la caracterización del plasma, realizado por Quehenberger *et al.* [18], ha logrado que ciertas clases de SL sean extraídas en el conjunto. Por ejemplo, es notoria la no-presencia de Gb₃ y ciertas ceramidas en los extractos obtenidos por estos autores.

Dado que el objetivo no puede ser el obtener un perfil exhaustivo que incluya todas las subespecies moleculares incluidas en el plasma, nuestro trabajo se va a centrar en obtener perfiles semicuantitativos de cada clase separada por AMD, así como el potenciar el uso de nuestra técnica para la búsqueda rápida de los analitos/familias de interés mediante un escaneo selectivo de la placa.

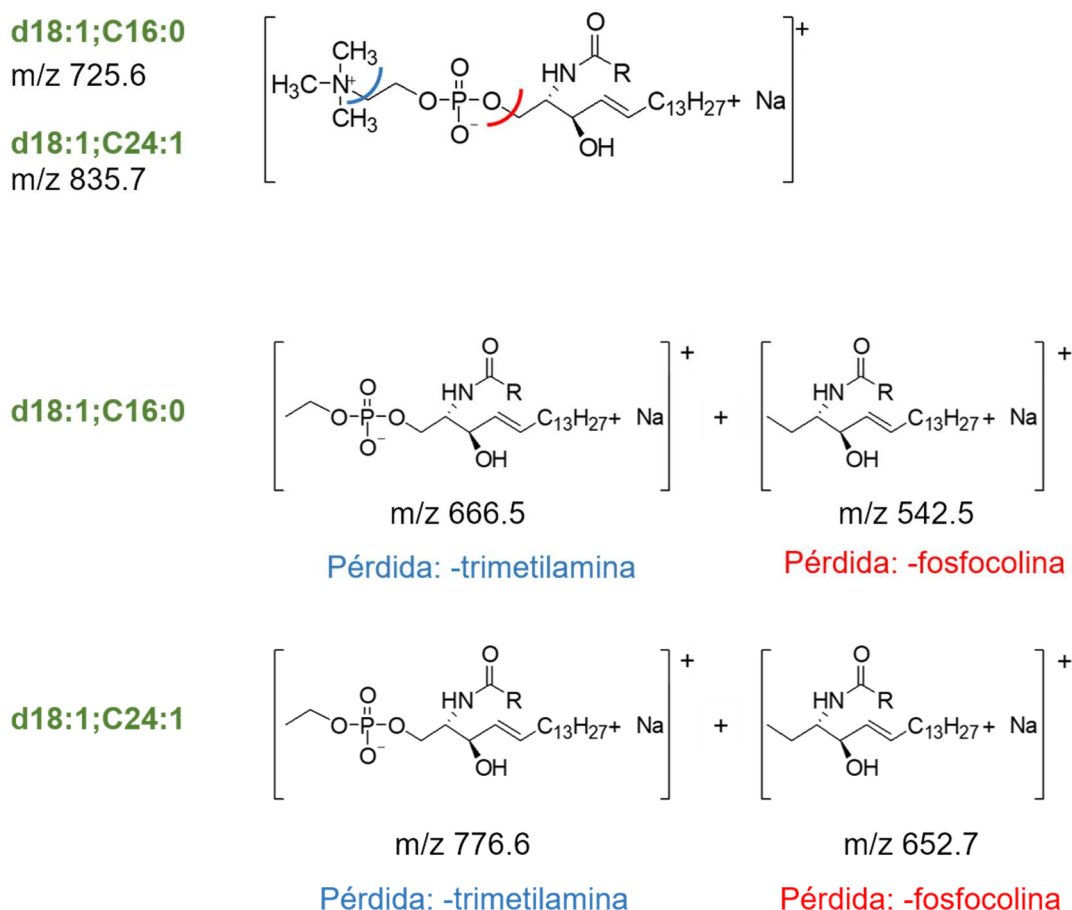
3.3.5 Obtención de perfiles e identificación de SM en extractos de plasma humano

En el espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) del pico 1 a md 16.7 mm (**Figura 3.6**) directamente recogido de la placa a partir del extracto de plasma humano, se detectan las siguientes especies moleculares, todas ellas correspondientes a $[M+Na]^+$: d18:1;C16:0 (m/z 725) y d18:1;C24:1 (m/z 835) como iones con mayor abundancia relativa, así como d18:1;C18:0 (m/z 753), d18:1;C20:0 (m/z 781) y d18:1;C22:0 (m/z 809) (**Figura 3.7 A**). Estas especies corresponden a iones moleculares sodiados de SM. Cuando se comparan los ESI-MS del plasma y los de un patrón SM de origen animal, se observan

especies moleculares similares, aunque lógicamente con diferentes distribuciones relativas.

La identidad de las especies moleculares se comprueba mediante ESI-MS/MS de cada ion (**Figura 3.7 B-C**). Los aductos de sodio de las especies de SM son tan estables que se producen fragmentaciones de forma consecutiva en el analizador trampa de iones del espectrómetro de masas (IT-MS), obteniendo nuevas especies sodiadas.

Por lo tanto, un aumento en la energía interna es suficiente para excitar vibracionalmente al ion precursor, dando lugar a la ruptura de las uniones más lábiles cuando se alcanza el umbral de energía. Este proceso explica la pérdida de grupos trimetilamina y fosfocolina tanto en el caso de d18:1;C16:0, como en el de d18:1;C24:1 (**Esquema 3.1**).



Esquema 3.1 Fragmentación IT-MS de los grupos trimetilamina y fosfocolina presentes en la molécula de SM.

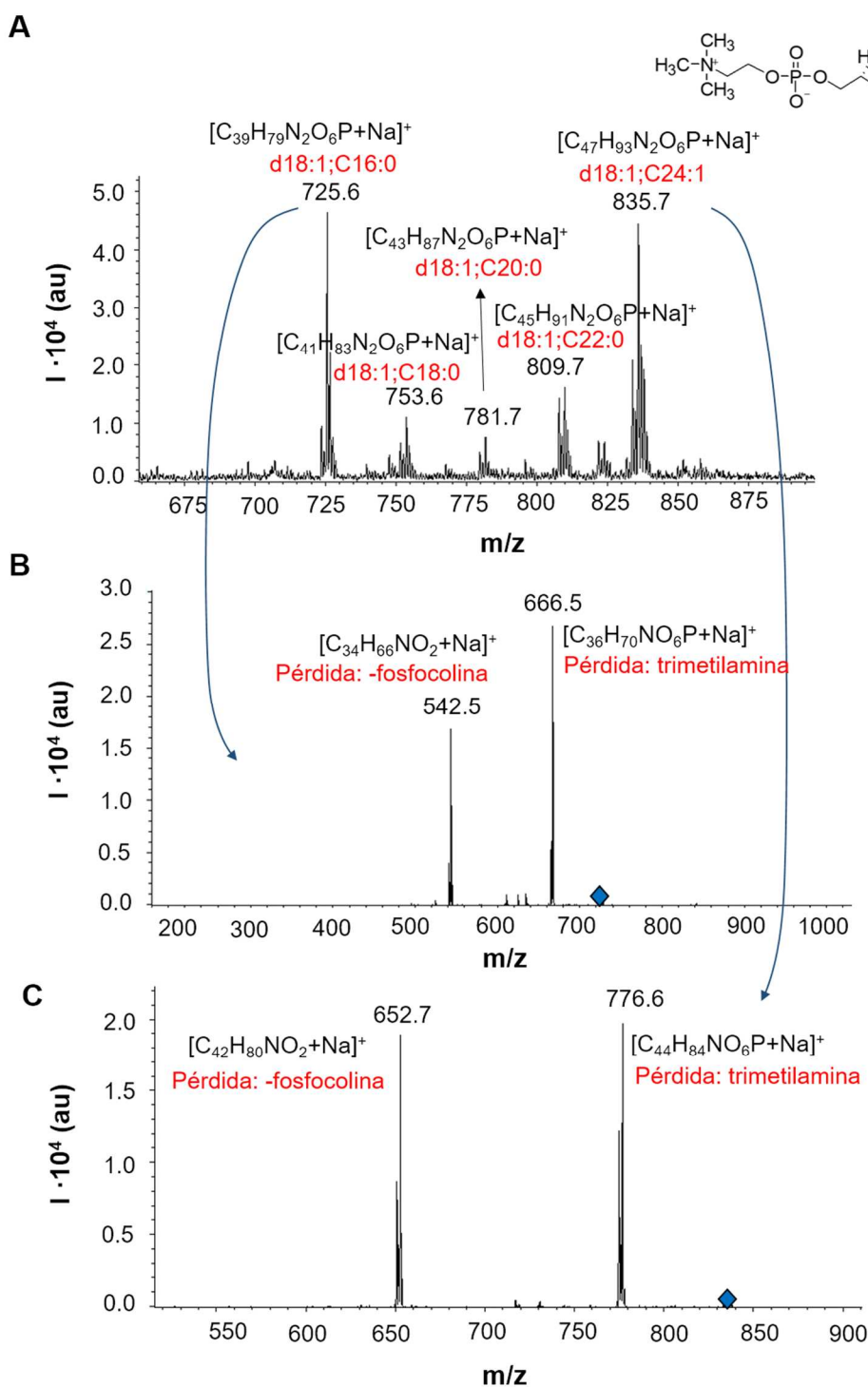


Figura 3.7 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) del pico 1 a md 16.7 mm (**Figura 3.6**) en el extracto de plasma humano extraído mediante la interfaz TLC-MS. Se fragmentan los iones más abundantes obteniendo el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (ionización positiva) de los precursores a **B)** m/z 725 y **C)** m/z 835, confirmando que son especies moleculares de SM. Estructura molecular de SM (extremo superior).

De este modo, el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS del ion precursor a m/z 725 [C₃₉H₇₉N₂O₆P+Na]⁺ muestra los iones productos a m/z 666 (pérdida de trimetilamina) y m/z 542 (pérdida de fosfocolina) (**Figura 3.7 B**); aislado con una anchura de ventana (tolerancia de masa) de m/z 4±1, y fragmentado con una amplitud de voltaje de 0.4 V.

En el caso del espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS del ion precursor a m/z 835 [C₄₇H₉₃N₂O₆P+Na]⁺, los iones productos obtenidos aparecen a m/z 776 (pérdida de trimetilamina) y m/z 652 (pérdida de fosfocolina) (**Figura 3.7 C**); aislado con una anchura de ventana (tolerancia de masa) de m/z 4±1 y fragmentado a 0.4 V.

Al comparar el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS del aducto de sodio más abundante a m/z 835 de la muestra (**Figura 3.7 C**), con el mismo espectro esta vez de un patrón de SM realizado en condiciones semejantes (**Figura 3.8 B**), se obtuvieron las mismas relaciones m/z. En ambos, se observaron iones hijo de relaciones m/z 652 y m/z 776. De este modo, se confirma una vez más la asignación estructural de especies moleculares de SM en el extracto orgánico de plasma humano.

Como ya se ha comentado y era de esperar, la distribución relativa de m/z es diferente si se comparan patrones (de origen porcino) y muestras (de plasma humano), por tener orígenes distintos.

Se recoge el espectro correspondiente al pico de SM ampliando la ventana de medida en un rango más amplio de m/z, incluyendo la zona de m/z >1000, observando que no se encuentran familias de globósidos y atribuyendo de este modo el pico de 16.7 mm únicamente a SM (**Figura 3.9**).

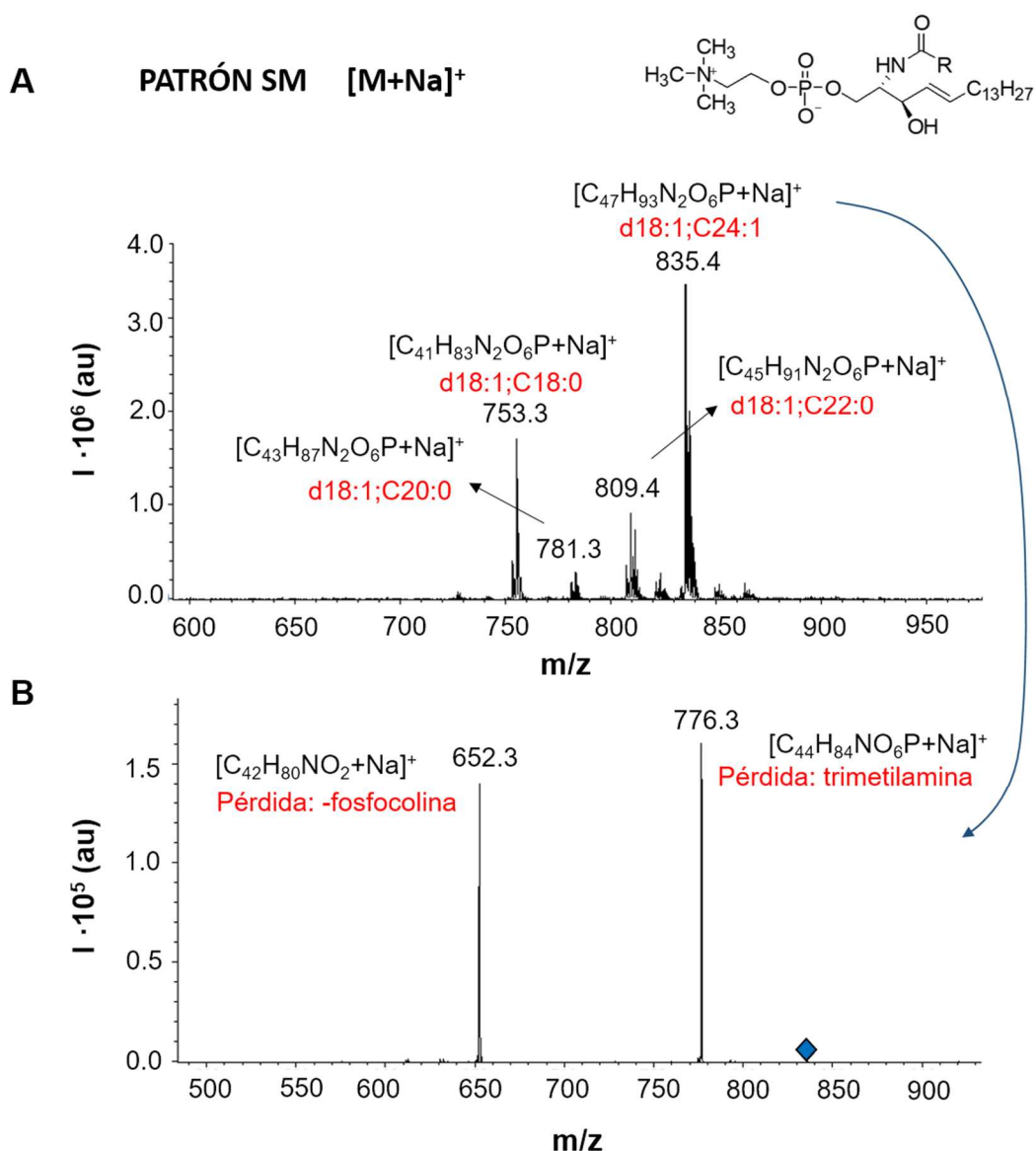


Figura 3.8 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) de SM patrón, extraído mediante la interfaz TLC-MS. **B)** Fragmentación del ion más abundante a m/z 835 obteniendo el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (ionización positiva) de este ion precursor. Estructura molecular de SM (extremo superior).

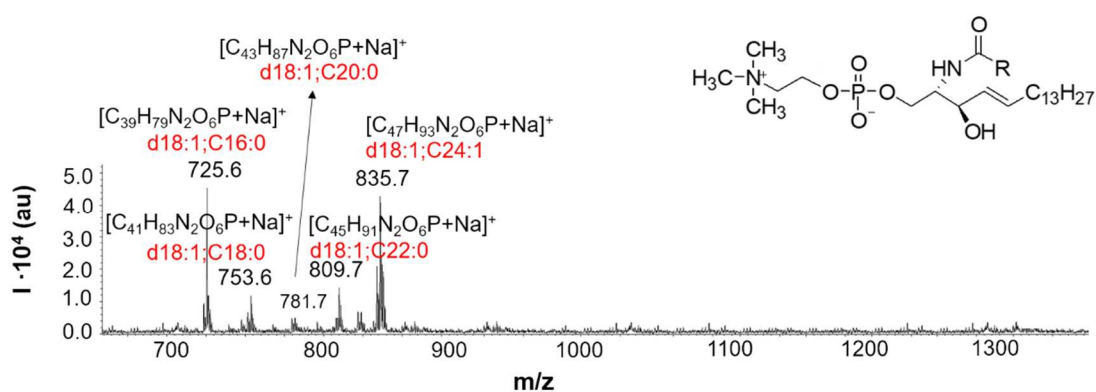


Figura 3.9 Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) del pico 1 a md 16.7 mm (**Figura 3.6**) en el extracto de plasma humano, extraído mediante la interfaz TLC-MS y ampliando la ventana de medida (rango $m/z > 1000$). Estructura molecular de SM (extremo superior).

3.3.6 Obtención de perfiles e identificación de Gb₃ en extractos de plasma humano

Aunque la banda 2 a md 28.4 mm (**Figura 3.6**) no es probablemente pura, sin embargo fue posible llevar a cabo la identificación de las diferentes especies moleculares de Gb₃ presentes en el plasma de un enfermo Fabry mediante el espectro HPTLC-ESI⁺-MS [60].

Por comparación con el espectro de Gb₃ patrón, las señales obtenidas por ESI⁺-MS, corresponden a aductos sodiados, de entre los cuales destaca d18:1;C16:0 (m/z 1046), siendo así la isorforma predominante de Gb₃ en el plasma de pacientes Fabry. Se observan las especies moleculares d18:1;C18:0 (m/z 1074), d18:1;C20:1 (m/z 1100), d18:1;C22:0 (m/z 1130) y d18:1;C24:0 (m/z 1158) (**Figura 3.10 A**).

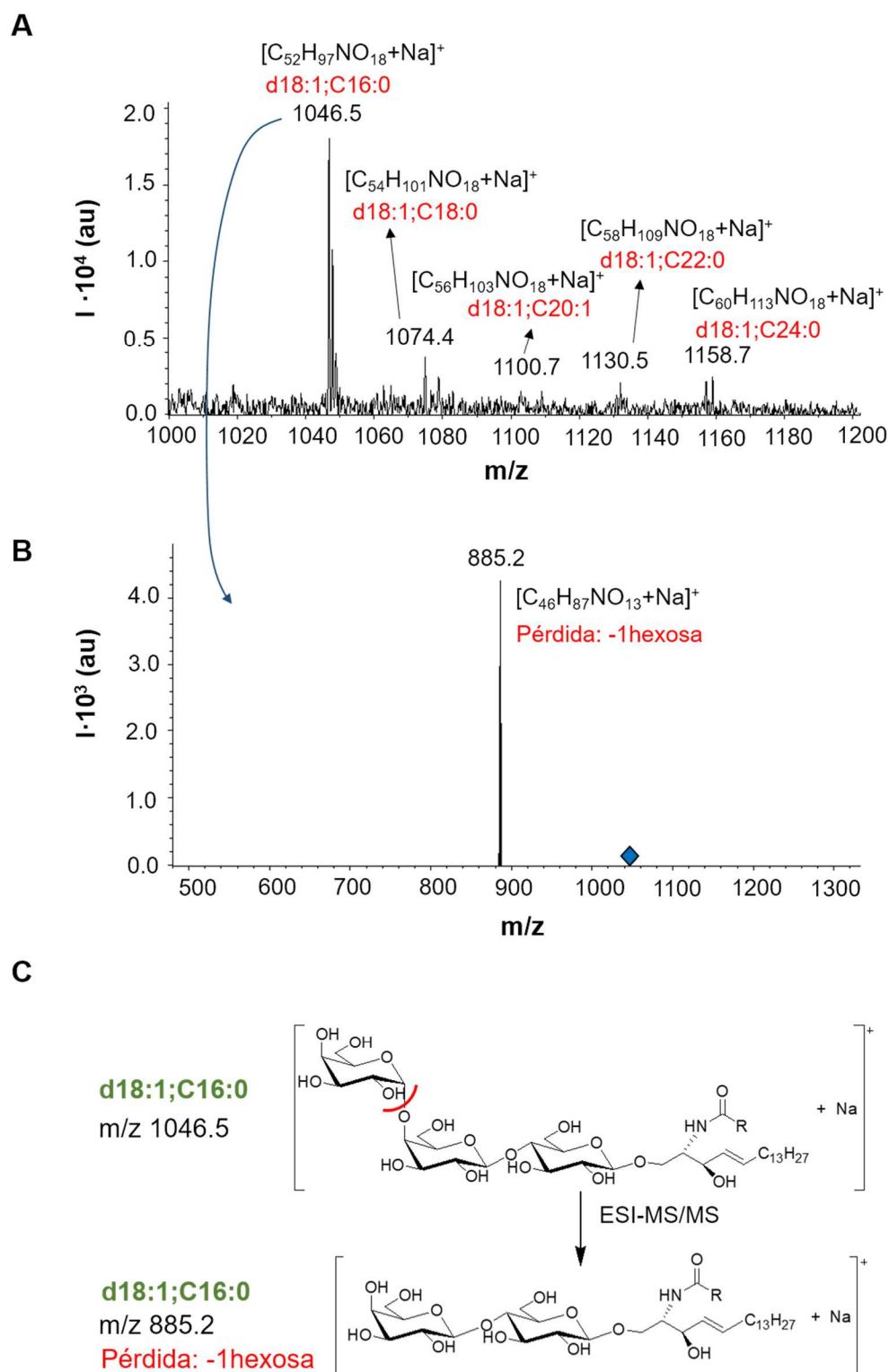


Figura 3.10 **A)** Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) del pico 2 a md 28.4 mm de extracto de plasma humano (**Figura 3.6**), extraído mediante la interfaz TLC-MS. **B)** Fragmentación del ion más abundante a m/z 1046 obteniendo el espectro HPTLC-ESI-MS/MS de este ion precursor, mostrando la pérdida de un grupo hexosa. **C)** Esquema de fragmentación de un grupo hexosa presente en la molécula de Gb₃.

El espectro HPTLC-ESI⁺-MS del patrón de Gb₃ (**Figura 3.11**) confirma la asignación de la molécula de Gb₃ en el extracto de plasma de un paciente Fabry (**Figura 3.10 A**), aunque con diferente abundancia relativa de los iones entre ambos espectros, debido a tener muestra y patrón orígenes diferentes.

El espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS del ion más abundante a m/z 1046 [C₅₂H₉₇NO₁₈+Na]⁺ en el extracto de plasma produce un ion a m/z 885 que corresponde a la pérdida de un grupo hexosa (**Figura 3.10 B-C**). Las intensidades relativas correspondientes a estas isoformas de Gb₃ son bajas, debido a la baja concentración en la que se encuentra esta molécula en el plasma de Fabry. A pesar de su baja sensibilidad, esta es la primera detección on-line de Gb₃ en plasma humano, a partir de una placa HPTLC, conocida por los autores.

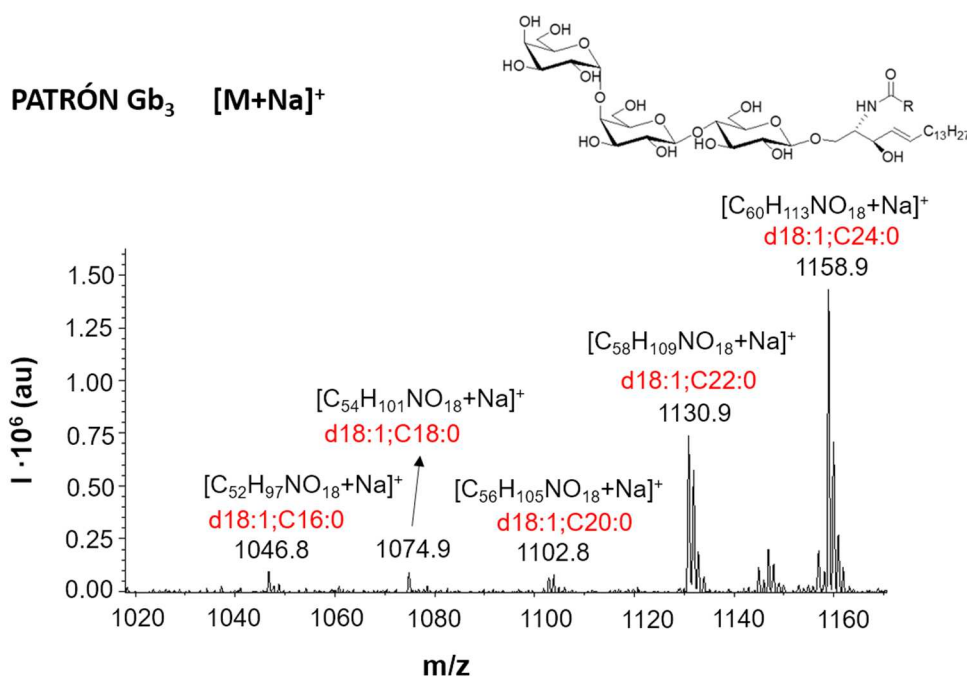


Figura 3.11 Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) de patrón Gb₃ extraído mediante la interfaz TLC-MS. Estructura molecular de Gb₃ (extremo superior).

Por otra parte, se analizaron muestras de individuos sanos, encontrando el Gb₃ siempre por debajo de los límites de detección (LOD) de los ESI-MS, bajo las condiciones utilizadas. De acuerdo con la bibliografía, el Gb₃ en plasma de pacientes Fabry determinado mediante HPLC-MS, se encuentra en concentraciones más altas que en controles sanos [100]. En otro trabajo

utilizando una técnica similar, Quehenberg *et al.* [18] no encontraron Gb₃ en muestras de plasma de individuos sanos.

La tecnología IT-MS presenta como ventaja permitir fragmentaciones consecutivas en varias etapas que son útiles para determinar rutas de fragmentaciones metabólicas por llevarse a cabo colisiones a baja energía [127]. Así, los iones producto de glicosfingolípidos se generan por rotura del enlace glicosídico. Este hecho se puede observar en los espectros HPTLC-ESI-MS/MS, -MS³ y -MS⁴ del patrón de Gb₃ (**Figura 3.12 A-C**).

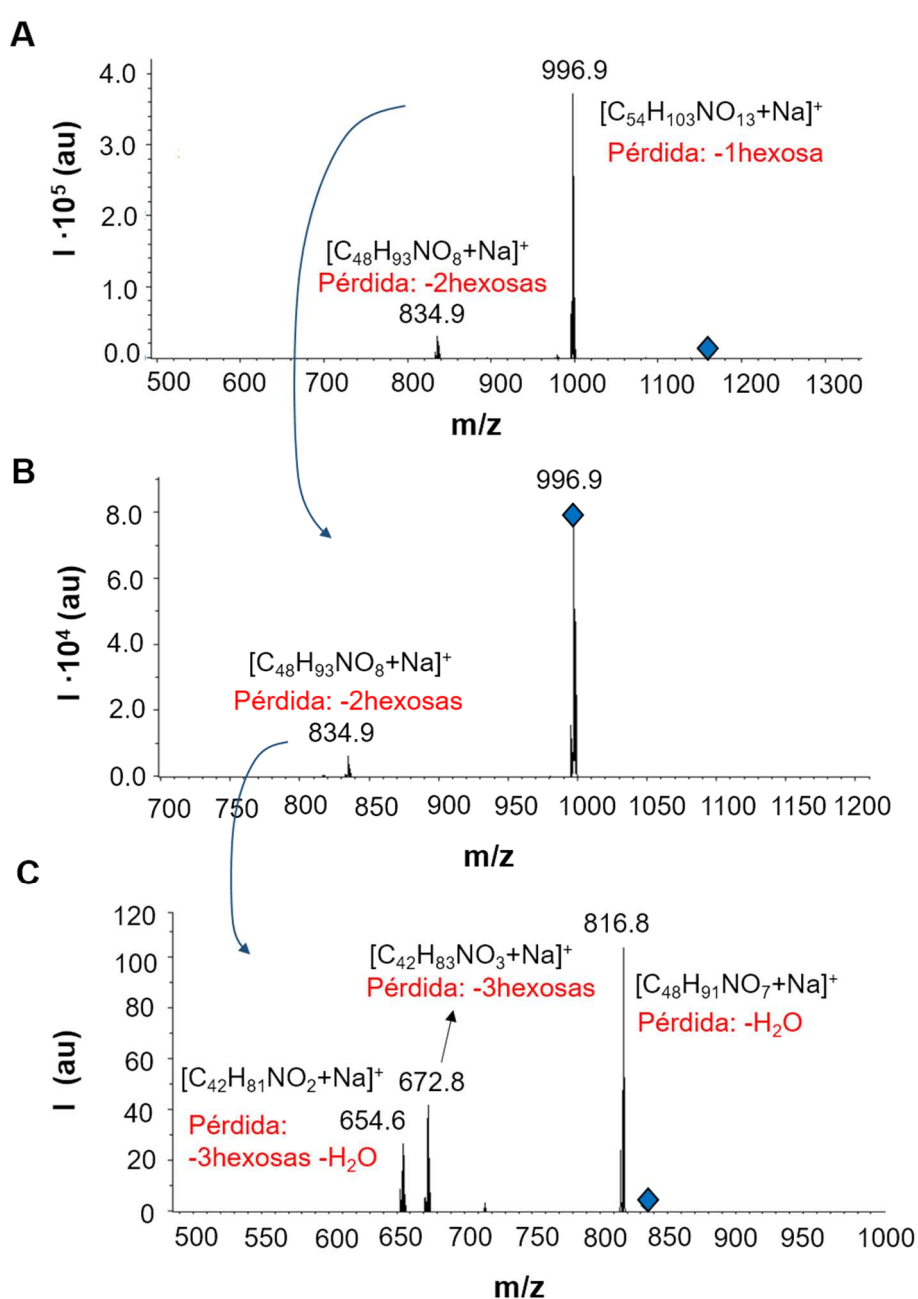
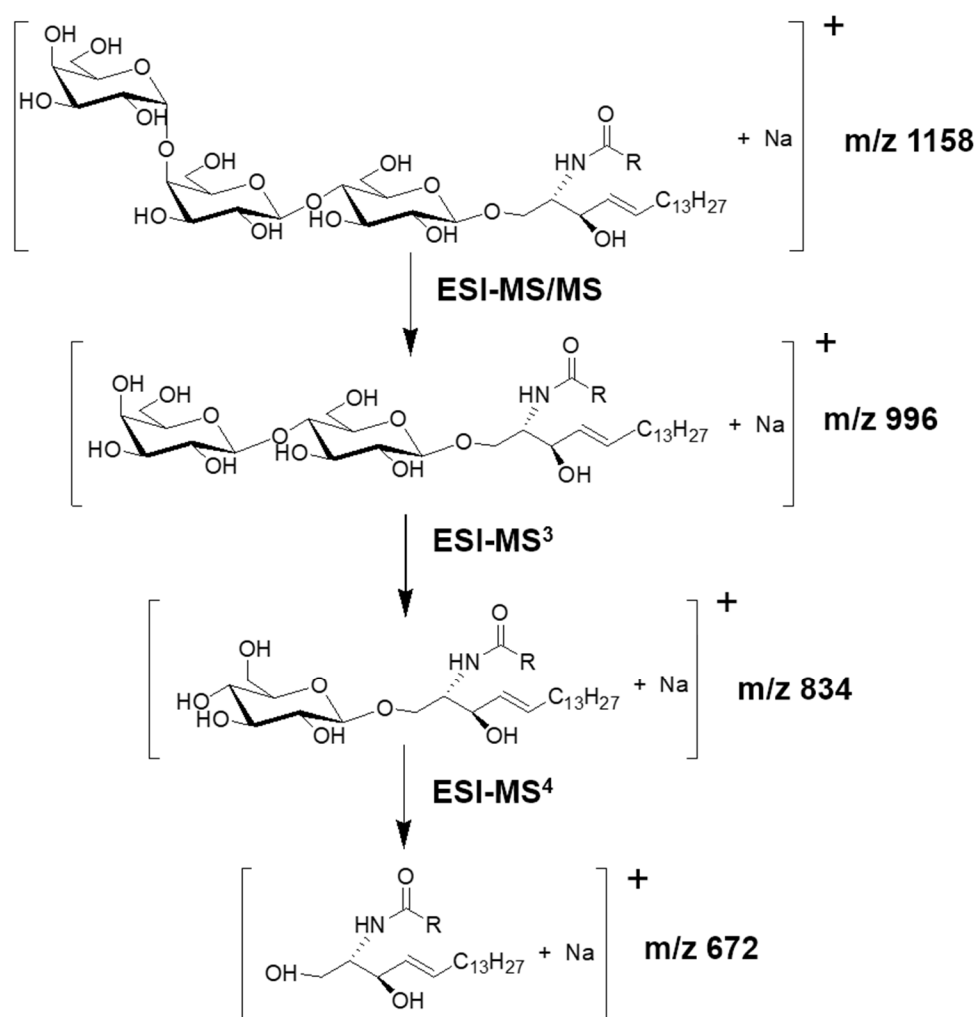


Figura 3.12 Fragmentación del ion más abundante m/z 1158 en patrón de Gb_3 (**Figura 3.11**) extraído mediante la interfaz TLC-MS, obteniendo **A)** el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (ionización positiva) que muestra como ion producto m/z 996. Se lleva a cabo una nueva fragmentación de este ion obteniendo **B)** el espectro HPTLC-ESI-MS³ (ionización positiva) mostrando como ion producto m/z 834, fragmentándolo finalmente para obtener **C)** el espectro HPTLC-ESI-MS⁴ (ionización positiva).

El aducto sodiado más abundante en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS de patrón de Gb_3 (**Figura 3.11**) es m/z 1158 [$C_{60}H_{113}NO_{18}+Na$]⁺. Éste se aísla y se fragmenta (anchura de ventana o tolerancia de masa de m/z 4 ± 1 y amplitud de voltaje de 1.15 V) obteniendo los iones producto a m/z 996 (pérdida de un grupo hexosa) y m/z 834 (pérdida de dos grupos hexosa) en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS (**Figura 3.12 A**). El siguiente ion precursor a m/z 996 (aislado con anchura de ventana de m/z 4 ± 1 y amplitud de voltaje de 1.0 V) muestra en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS³ su ion producto a m/z 834 (**Figura 3.12 B**). Éste último a m/z 834 (aislado con anchura de ventana de m/z 4 ± 1 y amplitud de voltaje de 1.25 V) muestra los iones producto a m/z 654 (pérdida de tres grupos hexosa y una molécula de H_2O), m/z 672 (pérdida de tres grupos hexosa) y m/z 816 (pérdida de una molécula de H_2O) en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS⁴ (**Figura 3.12 C**). El patrón de fragmentación del ion más abundante a m/z 1158 de Gb_3 se resume en el **Esquema 3.2**.



Esquema 3.2 Patrón de fragmentación del ion m/z 1158 procedente de Gb₃ patrón, que corresponde a las especies moleculares d18:1;C24:0.

3.3.7 Obtención de perfiles e identificación de Gb₄ patrón

Para completar lo ilustrado en la sección anterior, el patrón de Gb₄ (con una unidad de glucosa más que el Gb₃) fue fragmentado consecutivamente en IT-MS. La especie Gb₄ no ha sido encontrada en humanos aunque sí en el riñón de ratones, mediante TLC-MALDI (off-line) [128]. Se obtienen los espectros HPTLC-ESI⁺-MS (**Figura 3.13**) y HPTLC-ESI⁺-MSⁿ (**Figura 3.14**), así como sus correspondientes esquemas de fragmentación (**Esquema 3.3**) ofreciendo un resultado similar al del caso anterior (Gb₃) acorde con lo esperado. Hay que destacar el alto rango de peso molecular (m/z 1361.9) obtenido con el equipo IT-MS directamente desde la placa cromatográfica.

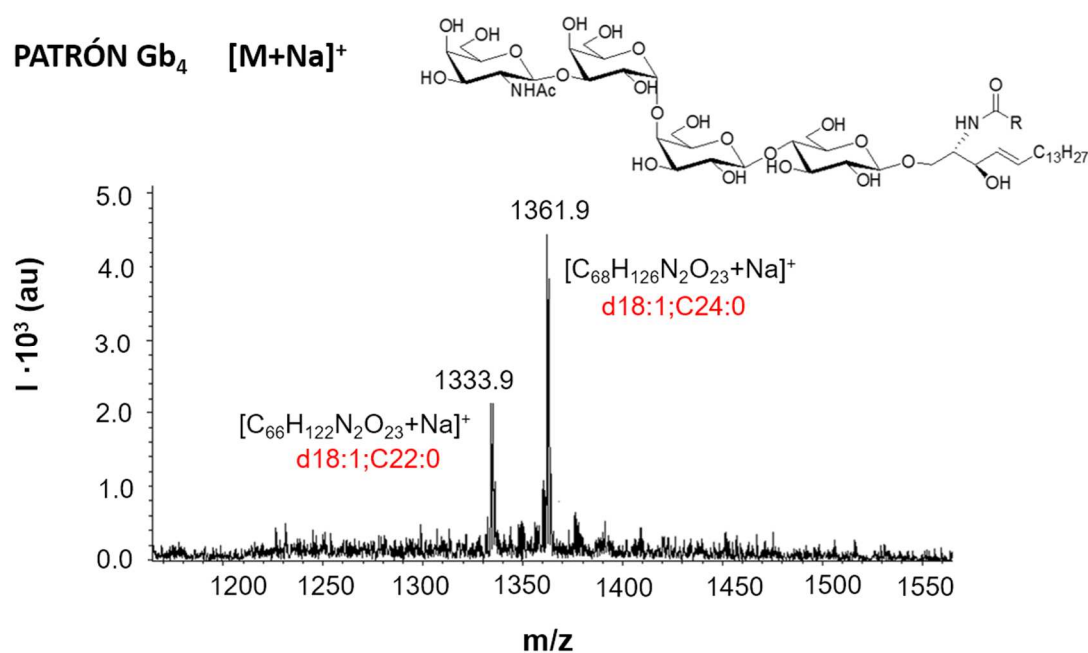


Figura 3.13 Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) de patrón Gb₄, extraído mediante la interfaz TLC-MS. Estructura molecular de Gb₄ (extremo superior).

El espectro HPTLC-ESI⁺-MS del patrón de Gb₄ muestra como ion más abundante m/z 1361 $[C_{68}H_{126}N_2O_{23}+Na]^+$, además de m/z 1333 $[C_{66}H_{122}N_2O_{23}+Na]^+$ (**Figura 3.13**). El ion precursor m/z 1361 se aísla y se fragmenta (anchura de ventana o tolerancia de masa de m/z 4±1 y amplitud de voltaje 1.0 V) obteniendo el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS generando el ion m/z 1158 (pérdida de un grupo hexosa). Éste se aísla con anchura de ventana de m/z 4±1 y amplitud de voltaje 1.5 V, observándose el ion producto a m/z 997 (pérdida de dos grupos hexosa) en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS³. El espectro HPTLC-ESI-MS⁴ (ionización positiva) del ion precursor a m/z 997 (aislado con anchura de ventana de m/z 4±1 y amplitud de voltaje 1.0 V) produce el ion a m/z 834 (pérdida de tres grupos hexosa). Finalmente, el espectro HPTLC-ESI⁺-MS⁵ del ion precursor a m/z 834 (aislado con anchura de ventana de m/z 4±1 y amplitud de voltaje 1.25 V) ofrece el ion producto a m/z 654 (pérdida de cuatro grupos hexosa y una molécula de H₂O) (**Figura 3.14 A-D**).

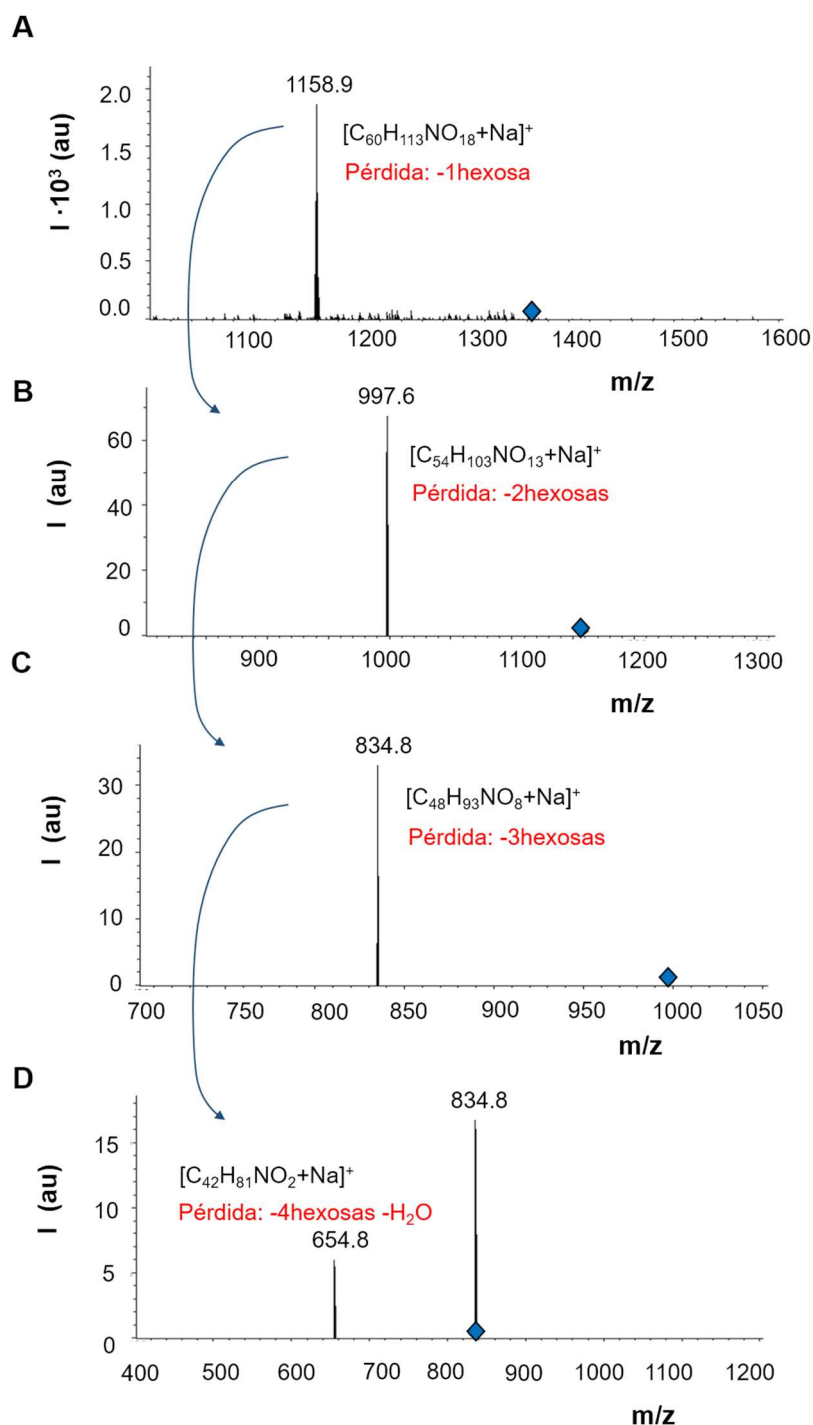
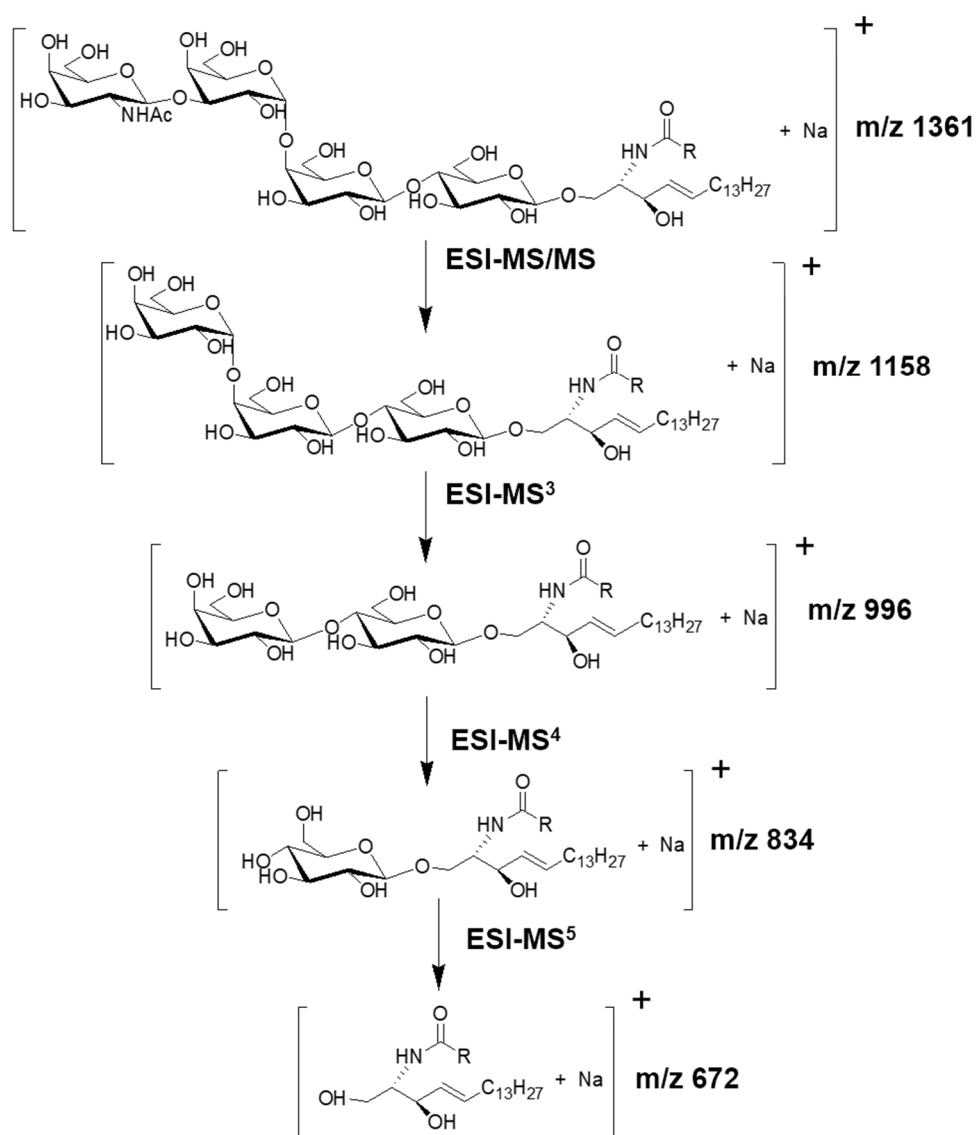


Figura 3.14 Fragmentación del ion más abundante m/z 1361 en patrón de Gb₄ (**Figura 3.13**) extraído directamente de la interfaz TLC-MS, obteniendo **A)** el espectro de HPTLC-ESI-MS/MS (ionización positiva) que muestra como ion producto m/z 1158. Se lleva a cabo una nueva fragmentación de este ion obteniendo así **B)** el espectro HPTLC-ESI-MS³ (ionización positiva) con un ion producto a m/z 997. Éste se fragmenta obteniendo **C)** el espectro HPTLC-ESI-MS⁴ (ionización positiva) con un ion producto de m/z 834 que se termina fragmentando obteniendo finalmente **D)** el espectro HPTLC-ESI-MS⁵ (ionización positiva) con el ion producto de m/z 654.



Esquema 3.3 Patrón de fragmentación del ion m/z 1361 procedente de Gb₄ patrón, que corresponde a las especies moleculares d18:1;C24:0.

3.3.8 El problema de la liso-Gb₃

Como se ha detallado en el apartado de preparación de muestra (**Sección 3.3.1**), si nuestro interés consistía en el estudio de los grupos de SM, Gb₃ y Gb₄ en el plasma, se transfería la fase orgánica final (inferior) a un nuevo vial; al contrario que si nuestro estudio se centraba en los grupos de liso-Gb₃ donde la fase transferida sería la acuosa (superior). En esta fase acuosa se sospechaba que podía existir el SL neutro, liso-Gb₃ (considerado biomarcador de Fabry en plasma junto con Gb₃), que por sus propiedades

especiales de polaridad, se repartiría entre la fase orgánica y la acuosa. Sin embargo, liso-Gb₃ no fue detectado en los ensayos de placa llevados a cabo con la fase orgánica.

Por lo tanto se implementó una variante del método de Folch [59, 126] para la extracción de liso-Gb₃ junto con el resto de SL que componen la muestra (SM o Gb₃) para ver si se podía detectar liso-Gb₃ en fase acuosa.

3.3.8.1 Separación HPTLC en fase reversa con desarrollo cromatográfico AMD de liso-Gb₃ en el extracto acuoso de plasma

A partir del extracto acuoso anterior, se llevó a cabo la separación en AMD. Para ello, se utilizaron placas de sílica gel en fase reversa (RP-18W), estudiando las condiciones óptimas para ese tipo de separación. Ésta, es técnicamente posible pero presenta ciertos problemas técnicos por el uso de disolventes acuosos en el sistema de presión-vacío del equipo AMD.

Se han estudiado diversas variables: volúmenes de aplicación de muestra y de patrones de los SL implicados, disolventes, tiempo, número de etapas y distancias de migración adecuadas en la elución, para obtener una buena separación tanto de los SL neutros como polares, también el número y las dimensiones de la banda a inyectar. Finalmente se logró una buena separación tanto de liso-Gb₃, SM y Gb₃ en la placa cromatográfica.

Las secuencias estudiadas se recogen en las **Tablas A1.1 (Anexo A1)**.

Así pues, se seleccionó un gradiente general en siete etapas basado en el uso de MeOH-AcOEt-H₂O con preacondicionamiento ácido (HAc 1N) previo de la placa (**Figura 3.15**).

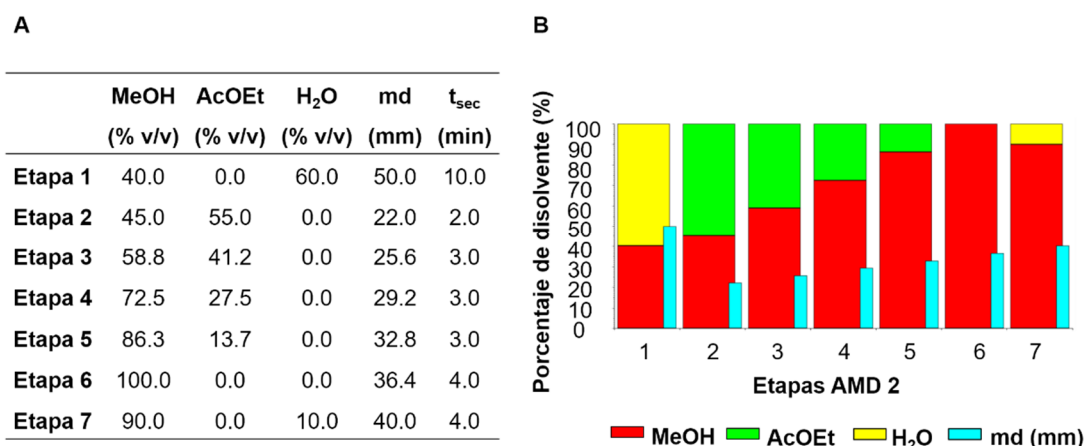


Figura 3.15 A) Tabla del gradiente de elución en siete etapas, basado en mezclas ternarias de MeOH-AcOEt-H₂O, para separación de SL neutros en extractos acuosos de plasma humano. **B)** Representación de las condiciones de gradiente de elución: MeOH ■, AcOEt ■, H₂O ■, md ■.

3.3.8.2 Detección mediante videodensitometría

La videodensitometría permite obtener una imagen de la placa, con sus bandas separadas. Se lleva a cabo la iluminación de la placa de forma UV (254 y 366 nm) y con luz blanca (re-emitida, transmitida y una combinación de ambas).

Mediante la inmersión en primulina y la derivatización con β -naftol (agente selectivo de azúcares) se consiguieron ver las bandas utilizando el equipo de TLC-visualizer (Camag), adquiriendo los datos mediante el programa visionCATS y trabajando con las distintas longitudes de onda posibles para obtener una adecuada visualización. Se optimizaron las concentraciones de reactivos utilizadas, aplicando tanto patrones y muestras sobre la misma placa cromatográfica en bandas de 10 mm (**Figura 3.16**).

Cabe destacar, que en la fase orgánica del plasma Fabry, separado mediante HPTLC en fase reversa y revelado con β -naftol, se intuye una banda sombreada que podríamos asociar a Gb₃ (calle 1), si la comparamos con la del patrón (calle 3).

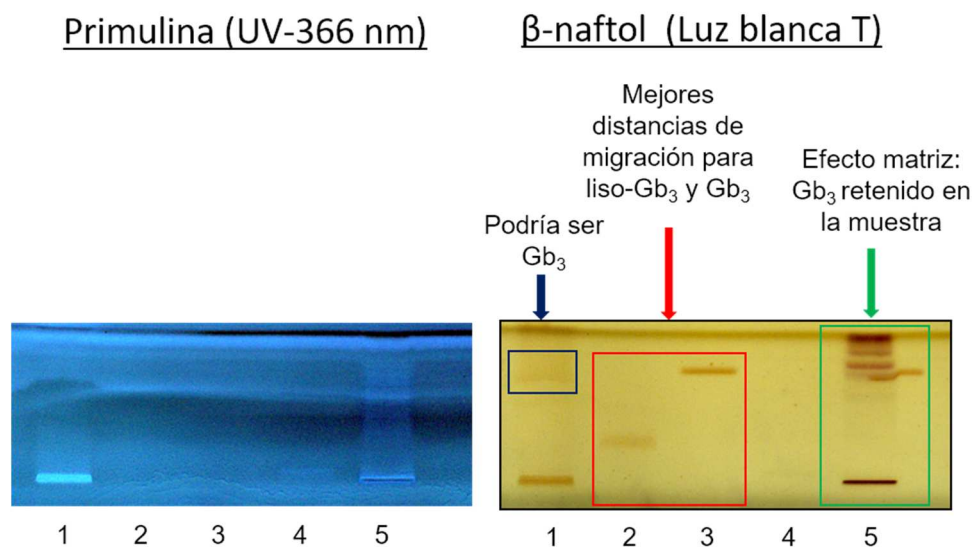


Figura 3.16 Imagen UV de videodensitometría a **A)** 366 nm y **B)** luz blanca transmitida en la placa HPTLC RP-18W de: plasma Fabry 30 μ L (fase orgánica) (calle 1); liso-Gb₃ patrón 0.2 μ g (calle 2); Gb₃ patrón 0.2 μ g (calle 3); SM 3.0 μ g (calle 4); plasma Fabry 30 μ L (fase acuosa) + Gb₃ patrón dopado 0.2 μ g (calle 5).

Se ha conseguido mover la banda correspondiente a la liso-Gb₃ patrón en fase reversa (calle 2), lo que en sílica gel permanecía en el punto de aplicación.

Referente al patrón de SM (calle 4), es lógico no ver ninguna banda revelada por el β -naftol, ya que es exclusivo para azúcares, y esta molécula no contiene éstos en su estructura.

Los ensayos realizados mostraron que no se detecta liso-Gb₃ en la fase acuosa, aunque no se puede concluir que no exista. Una razón puede ser que se encuentre en muy baja concentración en el plasma (menor aún que Gb₃) o que se pierda durante el proceso de preparación de muestra. Este problema queda abierto para futuras investigaciones.

3.3.8.3 *Obtención de perfiles e identificación de liso-Gb₃ patrón*

Se estudia el patrón de fragmentación de especies de liso-Gb₃ en placa HPTLC, en concentraciones similares a las de los otros patrones estudiados. Se obtienen sus espectros HPTLC-ESI⁺-MS (**Figura 3.17**) y HPTLC-ESI⁺-MSⁿ

(Figura 3.18); así como sus correspondientes esquemas de fragmentación (Esquema 3.4) acordes a lo esperado.

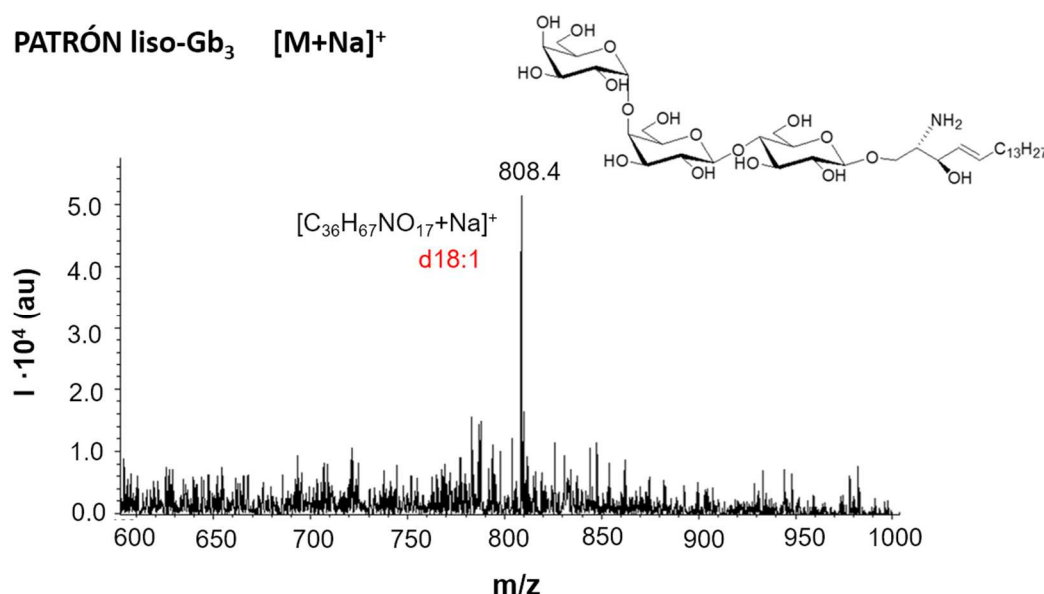


Figura 3.17 Espectro HPTLC-ESI-MS (ionización positiva) de patrón liso-Gb₃, extraído mediante la interfaz TLC-MS.

El espectro HPTLC-ESI⁺-MS de patrón de liso-Gb₃ muestra como ion más abundante m/z 808 $[C_{36}H_{67}NO_{17}+Na]^+$ (**Figura 3.17**). Éste se aísla y se fragmenta (anchura de ventana o tolerancia de masa de m/z 4 ± 1 y amplitud de voltaje de 0.5 V) obteniendo el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS del ion precursor, formando el ion a m/z 646 (pérdida de un grupo hexosa). A continuación, este ion se fragmenta mostrando el ion producto a m/z 484 (pérdida de dos grupos hexosa) en el espectro HPTLC-ESI⁺-MS³ (anchura de ventana de m/z 4 ± 1 y amplitud de voltaje de 1.15 V). En el siguiente espectro HPTLC-ESI⁺-MS⁴ del ion precursor a m/z 484 (anchura de ventana de m/z 4 y amplitud de voltaje de 1.0 V) se observa el ion producto a m/z 322 (pérdida de tres grupos hexosa) (**Figura 3.18 A-C**).

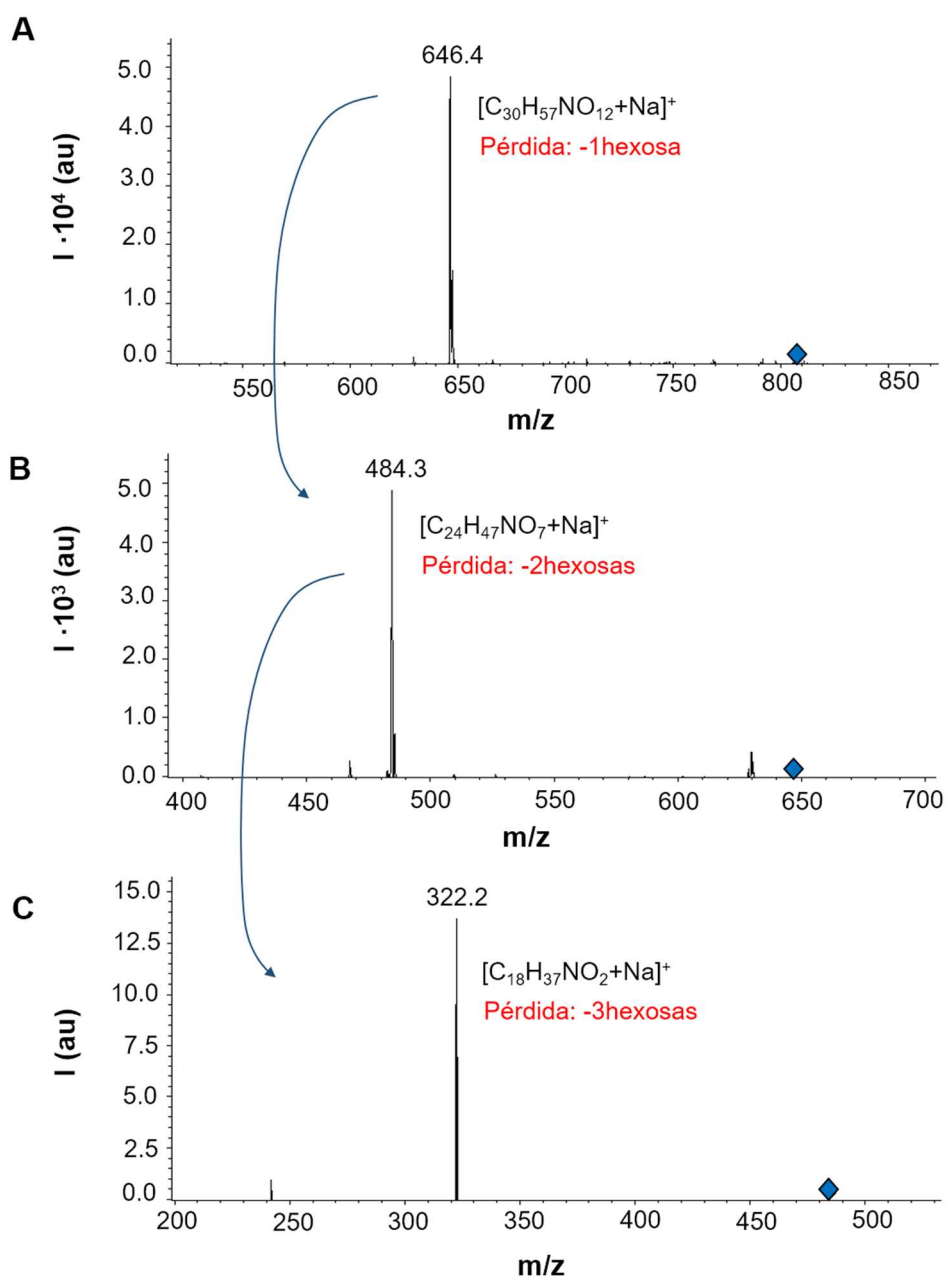
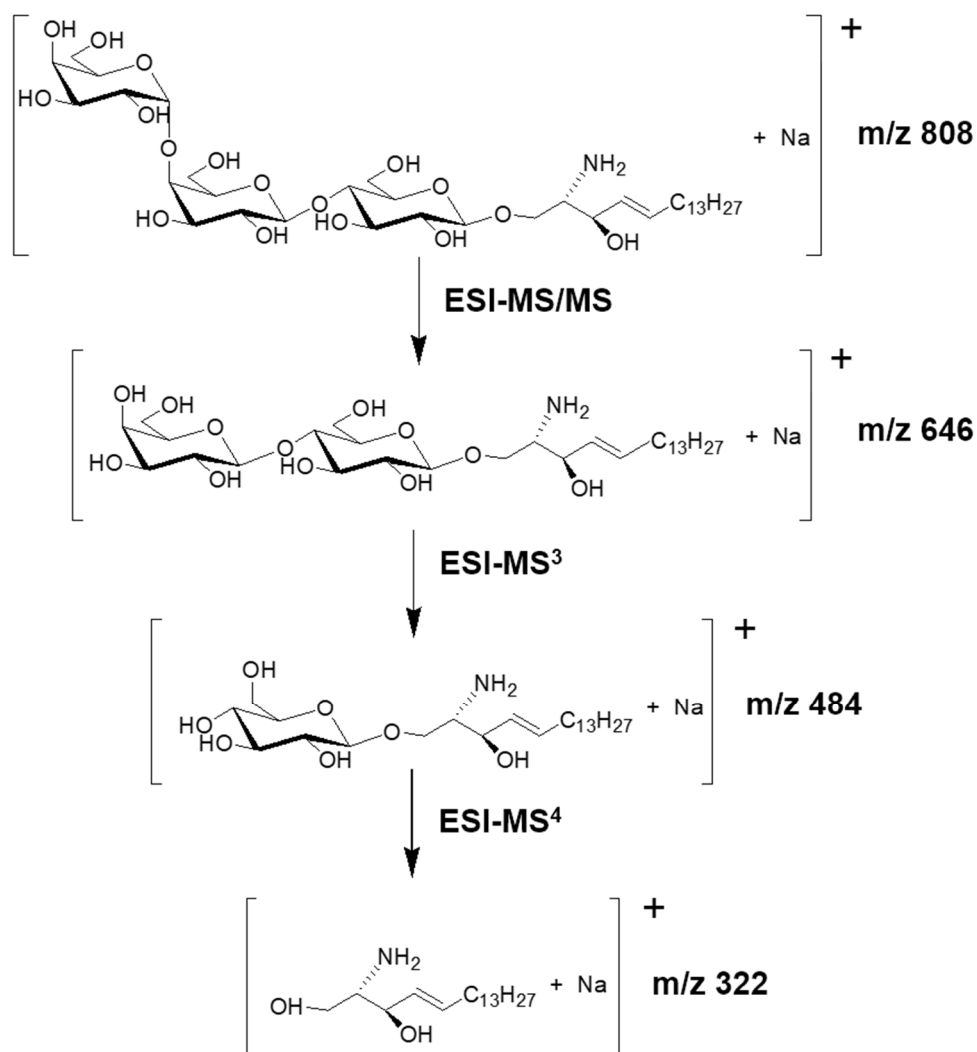


Figura 3.18 Fragmentación del ion más abundante m/z 808 en patrón de liso-Gb₃ (**Figura 3.17**) extraído mediante la interfaz TLC-MS, obteniendo así **A**) el espectro de HPTLC-ESI-MS/MS (ionización positiva) que muestra el ion producto m/z 646. Se lleva a cabo una nueva fragmentación de este ion obteniendo **B**) el espectro HPTLC-ESI-MS³ (ionización positiva) mostrando el ion producto m/z 484, fragmentándolo finalmente para obtener **C**) el espectro HPTLC-ESI-MS⁴ (ionización positiva) con el ion más abundante a m/z 322.

El patrón de fragmentación del ion más abundante a m/z 808 de liso- Gb₃ se resume en el **Esquema 3.4**.



Esquema 3.4 Patrón de fragmentación del ion m/z 808 procedente de patrón de liso-Gb₃, que corresponde a la cadena d18:1.

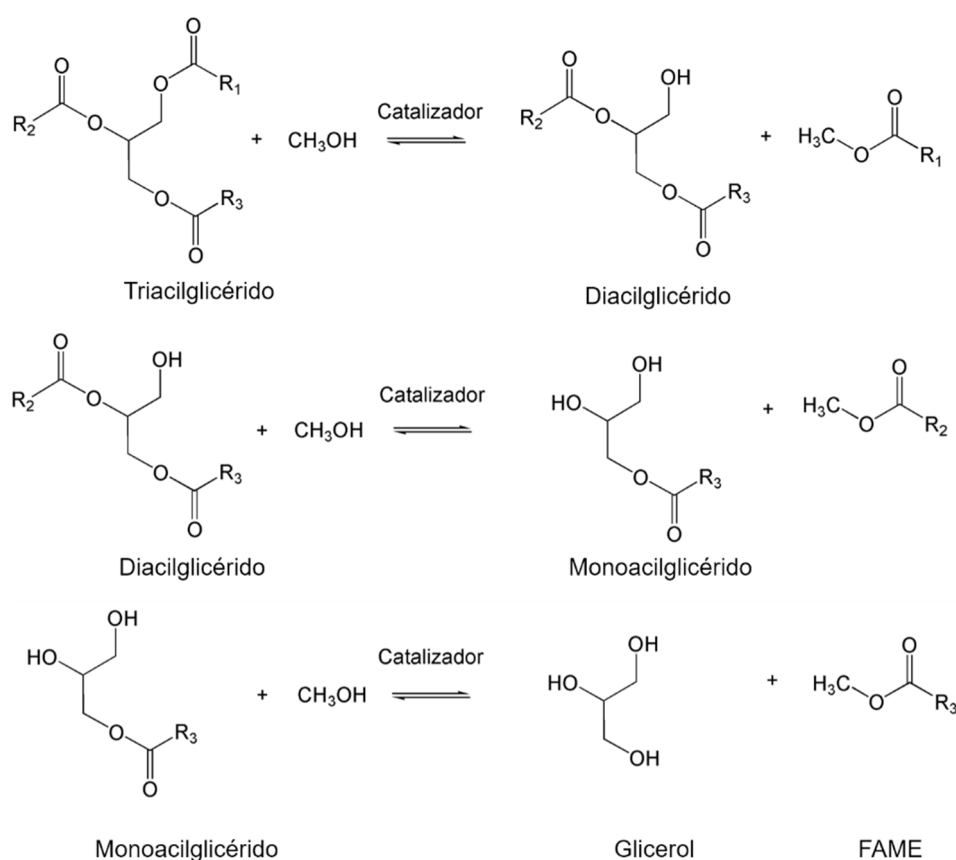
CAPÍTULO 4

SEPARACIÓN, OBTENCIÓN DE PERFILES
E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES
MOLECULARES DE LÍPIDOS NEUTROS Y
ÁCIDOS GRASOS EN BIODIÉSEL

4.1 INTRODUCCIÓN

El término biodiésel hace referencia a combustibles renovables basados en lípidos, mayoritariamente ésteres metílicos de ácidos grasos, FAME (proviene del inglés Fatty Acid Methyl Esters). Se utilizan como sustituto total o parcial de combustible diésel derivado de petróleo, tanto en su forma pura, denominada B100 (o FAME), o mezclado con diésel en proporciones diferentes BX (siendo X el porcentaje en volumen de FAME en la mezcla), sin necesidad de hacer ninguna modificación esencial en los motores [129].

El biodiésel (B100) se obtiene a partir de aceites animales o vegetales a través de un proceso de transesterificación con un alcohol, normalmente metanol, en presencia de un catalizador (**Esquema 4.1**). Las materias primas más utilizadas para la producción de biodiésel son los aceites vegetales, como el aceite de colza, de girasol, soja y aceite de palma; residuos de aceites de cocina y las grasas animales [130-132].



Esquema 4.1 Etapas del proceso de transesterificación, donde la R representa las cadenas de ácidos grasos que no se modifican en el proceso y son las que definen las propiedades del biodiésel.

La calidad del B100 depende del proceso de producción y de la naturaleza de los lípidos utilizados como materia prima. Un contenido de FAME en B100 inferior al 98% en peso indica que las condiciones de reacción han sido inadecuadas para la producción del biodiésel y de aquí, que aparezcan diversas impurezas en el producto final incluyendo lípidos neutros tales como mono (MG)-, di (DG)-, tri (TG)- acilglicéridos sin convertir, ácidos grasos (FA) libres e incluso glicerol [133, 134].

Denominamos lípidos neutros a las moléculas complejas que resultan de la reacción de esterificación entre el glicerol con uno, dos o tres ácidos grasos, para dar MG, DG o TG, respectivamente. Entre sus propiedades, cabe destacar que no tienen carga eléctrica, ni una polaridad apreciable.

La presencia de estas impurezas puede conducir a problemas graves en el motor, como corrosión, formación de depósitos sobre las boquillas de inyección, etc. Por ejemplo, a partir de una cierta concentración, los MG pueden producir obstrucción en los filtros de combustible debido a su alto punto de fusión y baja solubilidad a bajas temperaturas [135]. La norma europea UNE-EN 14214 descrita por el *Comité Europeo de Normalización* (CEN) establece una serie de requerimientos para B100 [136], es decir, describe sus propiedades y composición. En este caso, la máxima concentración tolerada de MG en BX debe ser del 0.8% en peso; así como en el caso de DG y TG del 0.2%.

4.1.1 HPTLC de biodiésel

Aunque las plataformas más utilizadas para el análisis de impurezas en biodiésel sean en su mayoría la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en columna (HPLC) [134], la instrumentación moderna en Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC) acoplada a Espectrometría de Masas (MS) presenta un prometedor

futuro para el análisis de lípidos complejos [34]. Es conveniente especialmente cuando es necesario determinar clases de lípidos en lugar de especies individuales, como es el caso del análisis de biodiésel [134]. Una de las ventajas del HPTLC frente a las técnicas cromatográficas en columna es que todos los compuestos de la muestra están físicamente “almacenados” en la placa tras el desarrollo cromatográfico, haciendo posible un análisis cuantitativo real. En el caso de la columna, algunos compuestos de peso molecular alto y/o muy polares que provienen del diésel quedan adsorbidos irreversiblemente en la fase estacionaria sin ser eluidos cromatográficamente.

HPTLC ha sido una técnica muy poco utilizada para el análisis de biodiésel. Se ha descrito un método para evaluar su conversión [137] ; para una caracterización semicuantitativa de mezclas biodiésel y diésel de petróleo [138]; para obtener el porcentaje de conversión de triacilglicéridos [139]; y para detectar glicerol en biodiésel [140].

En estos trabajos, el desarrollo cromatográfico ha sido llevado a cabo en cubetas verticales convencionales o en las cámaras automatizadas ADC2 que incorporan sensores para detectar el frente de desarrollo. Para la detección, se ha utilizado densitometría UV tras derivatización por oxidación destructiva (p. ej. con $\text{KMnO}_4/\text{NaOH}$ y otros reactivos [137, 138, 140]) dadas las pobres propiedades de absorción de los lípidos. También se ha utilizado la fluorescencia inducida, mediante impregnación post-cromatográfica con primulina [139]. Este procedimiento de detección no destructivo fue explicado mediante fluorescencia inducida por cambios de intensidad, FDIC. Permite no sólo detectar, sino también cuantificar lípidos mediante las variaciones que éstos producen en la fluorescencia de la primulina, a través de interacciones dipolares no-covalentes [121, 123, 124].

En cuanto al acoplamiento a MS, Eberlin *et al.* [138] utilizaron una ionización directa sobre las bandas (Easy Ambient Sonic-Spray Ionization, EASI-MS) que permitió la diferenciación de los componentes “bio” de los componentes “petro” de la mezcla diésel. Sin embargo, no realizaron ninguna identificación estructural molecular de las muestras.

4.2 OBJETIVOS

Nuestra aproximación para abordar el acoplamiento HPTLC-MS ha sido la interfaz basada en la extracción on-line automatizada de las bandas seguida de elución. El acoplamiento no es viable cuando se utilizan, en la fase de densitometría, derivatizantes que destruyen la muestra. Sin embargo, nuestro grupo demostró que es posible obtener espectros de masas de los lípidos (tanto en ESI como en APCI) a partir de placas impregnadas en primulina, puesto que ésta sólo interacciona con los lípidos a través de interacciones débiles y no interfiere en cuanto al rango de peso molecular [59].

En un trabajo anterior, separamos por AMD y cuantificamos la clase de MG en diversos biodiésel [141, 142] mediante la fluorescencia inducida por la primulina, utilizando un patrón comercial de monoacilglicérido (C18:0). Se realiza sobre una única placa cromatográfica de sílica gel. El esquema utilizado (**Capítulo 2**) es el siguiente e incluye: i) aplicación de la muestra mediante el sistema ATS4 que permite depositarla como bandas de densidad constante y forma y tamaño seleccionable; ii) separación en gradiente realizada con AMD; iii) impregnación de la placa con primulina y densitometría por fluorescencia; iv) fijación de las coordenadas de la banda (mediante la densitometría y guía láser) y extracción-elución automática mediante la interfaz hacia el correspondiente equipo de MS.

Se pretende en este trabajo mostrar la viabilidad de la técnica HPTLC-MS/MS y HRMS para la caracterización de biodiésel de origen vegetal y animal:

1. Optimizando la separación de biodiésel en MG, FA y DG. La técnica AMD permite realizar gradientes, combinando un desarrollo múltiple incremental (en etapas cortas, de 1-2 mm) con distintas composiciones en la fase móvil. La repetición adicional de una o más etapas permite focalizar las bandas, mejorando la eficacia de la separación.
2. Obteniendo un perfil semicuantitativo de los lípidos individuales y especies moleculares de cada una de estas clases, directamente a partir de

las bandas separadas sobre la placa cromatográfica y transferidas directamente a ESI-MS. Como se ha descrito anteriormente en el **Capítulo 2**, tras la separación cromatográfica y la impregnación del fluoróforo, la fase móvil es evaporada de la placa (**Figura 2.4 B**). Posteriormente, el uso de un disolvente con composición constante para la extracción-elución de la banda mediante la interfaz, permite que la ionización ESI se realice en las mismas condiciones para los lípidos pertenecientes a una misma clase. Esto hace que, para una clase dada, los factores de respuesta en ESI-MS sean prácticamente constantes [5, capítulo 14].

3. Identificando cada estructura presente en la mezcla utilizando los espectros MS/MS (MS^n) obtenidos con un equipo de trampa de iones y los espectros (masa exacta) obtenidos con un equipo tipo Q-TOF (cuadrupolo - tiempo de vuelo), de alta resolución.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC

Se analiza la muestra, es decir, combustible diésel y diez FAME B100 procedentes de aceites vegetales (B100-1 a B100-7), aceites de cocina de residuos (B100-8) y grasas animales (B100-9 y B100-10), suministrados por TOTAL (Solaize, Francia). Las mezclas se prepararon a partir de B100-3 y el diésel en proporciones diferentes (B5, B10, B20, B30, B40, B50).

Utilizando el equipo Automatic TLC sampler (ATS4) (Camag), se aplicaron patrones y muestra de biodiésel en placas cromatográficas de 20x10 cm; previamente al análisis fueron acondicionadas con tetrahidrofurano (THF) (mediante desarrollo md: 90 mm).

Previamente a su aplicación en las placas mencionadas, patrones y muestras se disolvieron en una mezcla de DCM-MeOH (1:1 v/v). Los patrones correspondientes de lípidos se aplicaron en la misma placa en forma de bandas de 4 mm, con una masa depositada de 0.1-2.5 μg /banda (volúmenes: 0.1-2.5 μL /banda, concentración: 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), distancia entre calles de 2 mm,

distancia desde el lateral y desde el extremo inferior de la placa de 10 mm. Se dejó una calle vacía sin realizar aplicación, como análisis en blanco. A continuación, se aplicaron tres bandas de 12 mm de la muestra BX, con una distancia entre calles de 16 mm. La cantidad de BX y diésel aplicada fue $2.5 \cdot 10^3$ y $5.0 \cdot 10^3$ μg /banda respectivamente (volumen: 25 y 50 μL , concentración 100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Finalmente, se dejó otra calle vacía como experimento en blanco (**Figura 4.1**).

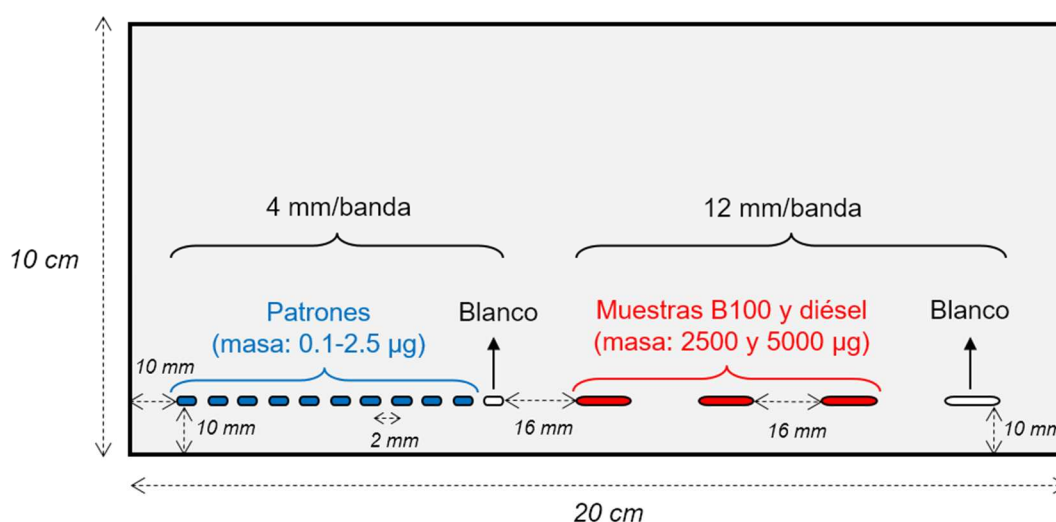


Figura 4.1 Aplicación de patrones y muestras (BX y diésel) en la placa de sílica gel.

Los patrones estudiados pertenecen a las cuatro familias de lípidos neutros investigadas MG (1-oleoil-*rac*-glicerol y 1-estearoil-*rac*-glicerol), DG (gliceril 1,3-diesterato), TG (gliceril triesterato) y FA (ácido oleico y éster metílico del ácido oleico) (**Figura 4.2**).

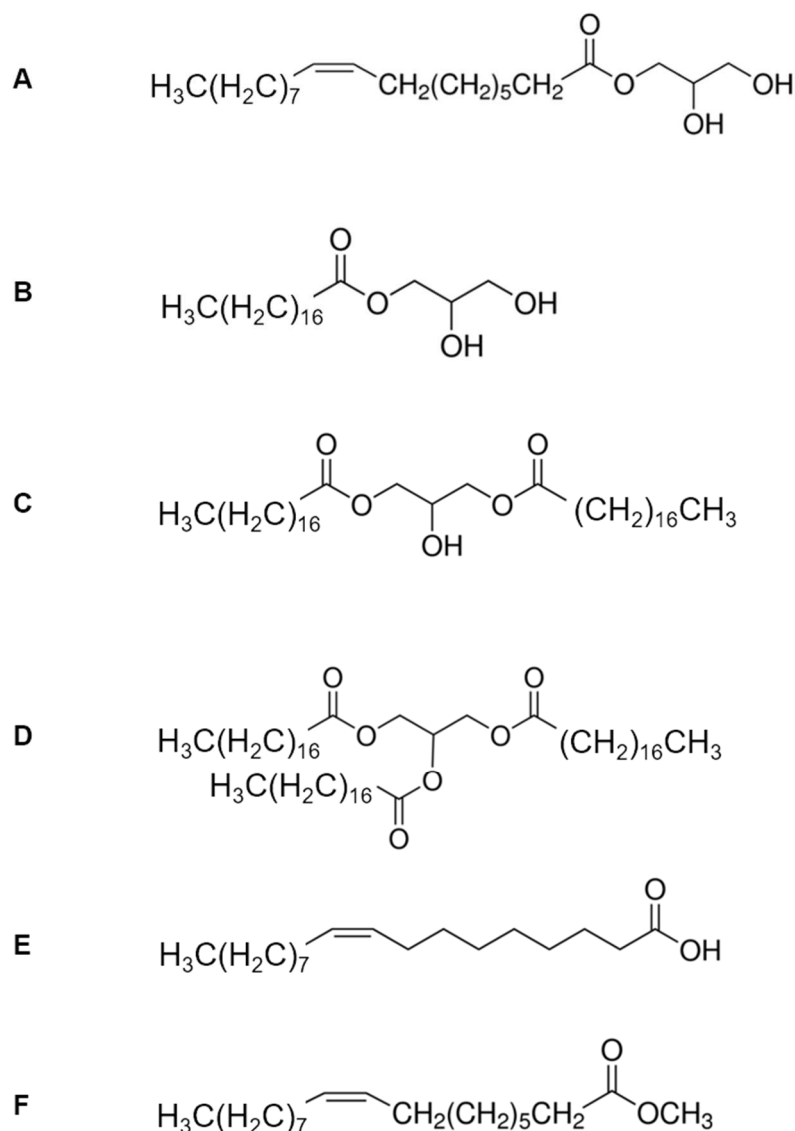


Figura 4.2 Estructura de **A**) 1-oleoil-*rac*-glicerol (MG), **B**) 1-estearoil-*rac*-glicerol (MG), **C**) gliceril 1,3-diestearato (DG) y **D**) gliceril triestearato (TG), **E**) ácido oleico (FA) y **F**) éster metílico del ácido oleico (FA).

4.3.2 Desarrollo cromatográfico AMD

En lo referente a la separación cromatográfica, el sistema de desarrollo múltiple automatizado (AMD) (Camag) trabaja con una elución en etapas sucesivas (de varios mm cada una), que se llevan a cabo combinando el poder de elución del disolvente, con el aumento en la distancia de migración (md). La composición de la fase móvil en cada etapa puede ser diferente, y generalmente de menor poder de elución que en la etapa anterior, ajustando

cada mezcla en distintas proporciones, y pudiendo utilizar hasta cinco disolventes. El gradiente creado permite picos estrechos y separaciones eficientes altamente repetibles en cuanto a md (± 0.45 mm en nuestro caso). Si es necesario, se puede repetir el desarrollo de cada etapa individual para conseguir la focalización de cada banda.

El sistema AMD es adecuado para muestras que abarcan un rango de polaridad muy alto. En un trabajo anterior, se realizó la separación AMD de lípidos neutros y esteril glucósidos por familias utilizando un gradiente de elución en cinco etapas basado en mezclas ternarias de *terc*-butil metil éter (TBME)-MeOH-*n*-heptano [47]. Este gradiente universal, que abarca el rango completo de polaridad de los eluyentes fue capaz de separar en familias a distintas clases de lípidos: colesteril éster y FAME, colesterol, MG, DG, TG, FA, esteril glucósidos esterificados, y esteril glucósidos, en orden de polaridad creciente, es decir, disminuyendo la md.

Como nuestra muestra se compone de algunas de estas familias, se adaptó el gradiente a la separación de los patrones relacionados con el B100 (MG, DG, TG, FA y FAME). Como gradiente de elución 1 se trabajó con un desarrollo en tres etapas basado en TBME/DCM/*n*-heptano y distancia de migración (md) 90 mm, con duración total de 53 min 14 s, bajo las condiciones descritas (**Figura 4.3**).

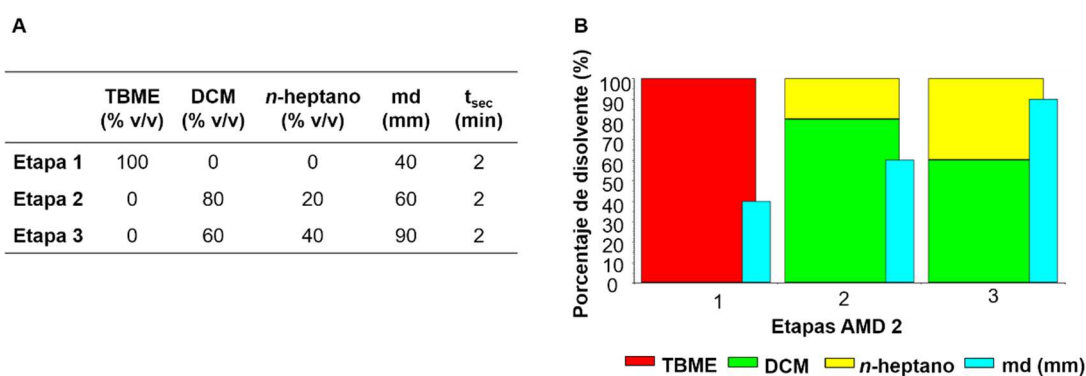


Figura 4.3 A) Condiciones del gradiente de elución 1 en tres etapas, basado en mezclas ternarias de TBME-DCM-*n*-heptano, para separación de MG, DG y FA en FAME procedente de muestras de biodiésel. **B)** Representación de las condiciones del gradiente de elución 1: TBME ■, DCM ■, *n*-heptano ■, md ■.

Como los lípidos saturados y el diésel (compuesto por hidrocarburos saturados) no pueden ser detectados por UV, se pueden utilizar los fluoróforos berberina [47] y primulina [59] que permiten la detección de cadenas alifáticas.

Se llevó a cabo la impregnación post-cromatográfica por inmersión de la placa en una disolución de primulina en MeOH ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando el dispositivo de inmersión cromatográfica III (Camag) diseñado para esta función. La detección fluorescente por cambios de intensidad (FDIC) de primulina en presencia de los lípidos separados se realizó mediante el dispositivo TLC Scanner 3 (Camag). La longitud de onda de excitación: 365 nm, recogiendo la emisión a longitudes de onda $>400 \text{ nm}$. Se trabajó con anchuras de rendija similares al tamaño de banda en cada ocasión (4 mm en patrones y 12 mm en muestra diésel y biodiésel).

En estas condiciones, se obtiene el cromatograma AMD (aplicando los patrones en distintas calles) correspondiente a: 1-estearoil-*rac*-glicerol a md 21.2 mm (pico 1), ácido oleico a md 34.5 mm (pico 2), 1,3-di-estearoil-*rac*-glicerol a md 42.9 mm (pico 3), gliceril triestearato a md 58.3 mm (pico 4) y éster metílico del ácido oleico a md 74.3 mm (pico 5) (**Figura 4.4**).

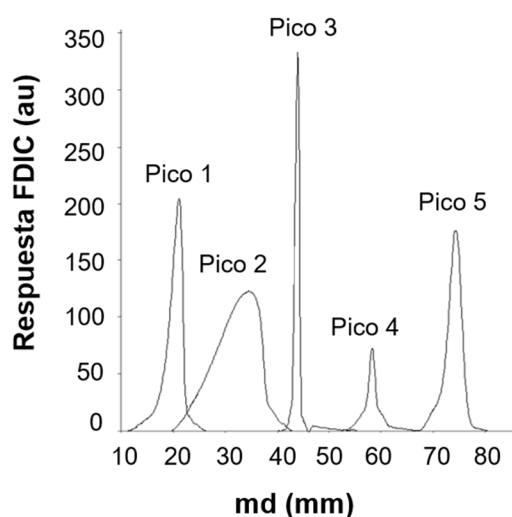


Figura 4.4 Cromatograma HPTLC-FDIC de los patrones siguientes: 1-estearoil-*rac*-glicerol (pico 1: md 21.2 mm), ácido oleico (pico 2: md 34.5 mm), gliceril 1,3-di-estearato (pico 3: md 42.9 mm), gliceril triestearato (pico 4: md 58.3) y éster metílico del ácido oleico (pico 5: md 74.3 mm). Condiciones de AMD en **Figura 4.3**. Primulina (FDIC) $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a λ_{exc} 365 nm / $\lambda_{\text{em}} >400 \text{ nm}$.

Aplicando este gradiente a distintas muestras de biodiésel, bajo las condiciones AMD descritas (**Figura 4.3**) se obtienen los perfiles cromatográficos del material lipídico correspondiente a la muestra B100-3, B50 y combustible diésel puro (**Figura 4.5 A-C**).

El pico que corresponde al componente diésel migra como un pico único gaussiano cerca del final de la placa (md 86.1 mm) (**Figura 4.5 C**).

El cromatograma correspondiente a B50 (**Figura 4.5 B**) muestra una clara combinación entre FAME y diésel, destacando las siguientes zonas: material lipídico incluyendo todas las impurezas lipídicas entre md 10-60 mm; FAME en una zona muy intensa a md 60-80 mm; y el pico correspondiente a diésel a md 86.1 mm. Se puede afirmar que el componente diésel en B50 migra del mismo modo que en el caso del diésel puro (**Figura 4.5 B-C**). Partiendo de la comparación de los cromatogramas y bajo las condiciones descritas, se puede concluir que el contenido en diésel no es una interferencia para la determinación de lípidos en biocombustibles. Cabe destacar que el pico de diésel puro es detectado por FDIC en primulina debido a su composición mayoritaria en alcanos.

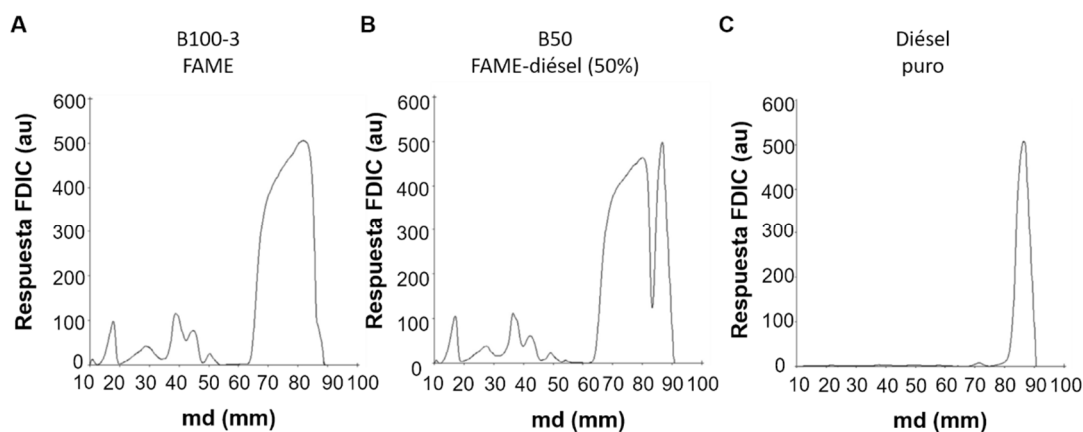


Figura 4.5 Cromatogramas HPTLC-FDIC de: **A)** B100-3 (masa depositada $2.5 \cdot 10^3 \mu\text{g}$), **B)** B50 (masa depositada $5.0 \cdot 10^3 \mu\text{g}$) y **C)** Combustible diésel (masa depositada $2.5 \cdot 10^3 \mu\text{g}$). Condiciones de AMD en **Figura 4.3**. Primulina (FDIC) $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $\lambda_{\text{exc}} 365 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} > 400 \text{ nm}$.

En el caso de muestras en matrices reales, la identificación de los compuestos no puede hacerse solamente mediante las distancias de

migración [141], debido a fenómenos de coelución y efectos de matriz. En nuestro caso, pretendemos hacer la identificación estructural mediante MS.

Como uno de nuestros propósitos en esta Memoria es determinar las impurezas lipídicas de biodiésel a bajas concentraciones, las muestras de biodiésel se sobrecargaron en cada aplicación sobre la placa ($2.5 \cdot 10^3$ y $5.0 \cdot 10^3$ $\mu\text{g}/\text{banda}$ en B100 y B50 respectivamente). Como la concentración de B50 estaba diluida a la mitad con respecto a la de B100, aplicando el doble de volumen se obtuvo la misma área (au) para el pico, bien separado, (a \sim md 16.9 mm) tanto para la muestra de B50 como para la de B100. Como se expondrá en la **Sección 4.3.4**, partimos de la base que el pico a \sim md 16.9 mm corresponde a MG, tras identificación por MS.

Siguiendo con el estudio de MG en la muestra, se comparan los cromatogramas obtenidos mediante el gradiente de elución 1 para un FAME B100 procedente de distintos orígenes; origen vegetal (B100-1), residuos de cocina (B100-8) y origen animal (B100-9) (**Figura 4.6 A-C**).

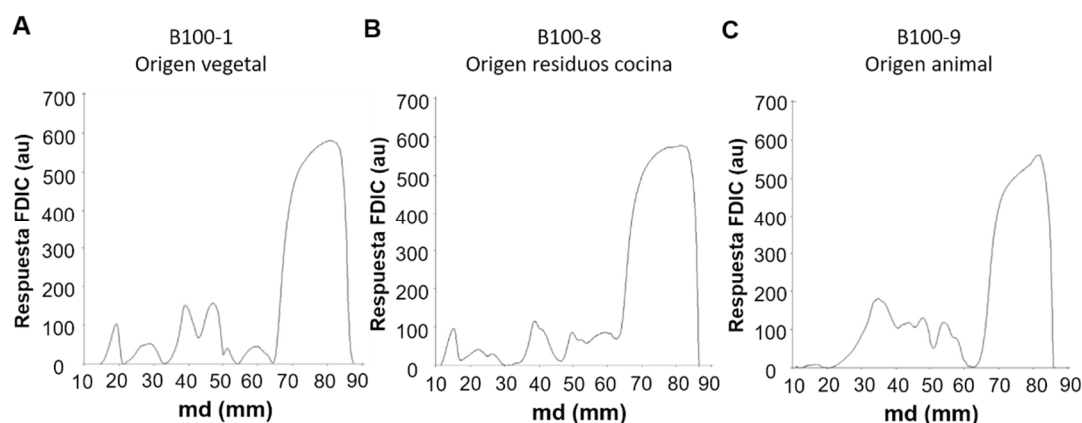


Figura 4.6 Cromatogramas HPTLC-FDIC de: **A)** B100-1 origen vegetal, **B)** B100-8 origen residuos de cocina y **C)** B100-9 origen animal. Masa depositada: $2.5 \cdot 10^3$ μg . Condiciones de AMD en **Figura 4.3**. Primulina (FDIC) $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $\lambda_{\text{exc}} 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} > 400 \text{ nm}$.

En este caso, se observa una buena separación de picos, con buena resolución, fijándonos en md 15-20 mm (\sim md 16.9 mm) que corresponde al pico de MG identificado por ESI-MS (**Sección 4.3.4**). En el caso del aceite de origen animal (B100-9) se produce una ausencia de ese pico de MG en el cromatograma (**Figura 4.6 C**).

A continuación, se estudió en detalle la zona de material lipídico a md 10-60 mm utilizando distintas mezclas a partir de FAME B100-3, como fue el caso de B5, B20 y B50 (**Figura 4.7 A-C**). Como era de esperar, el área correspondiente al pico de MG (~md 16.9 mm) aumenta con el incremento de FAME en BX, al mismo tiempo que el área del pico de diésel disminuye (md 80-90 mm).

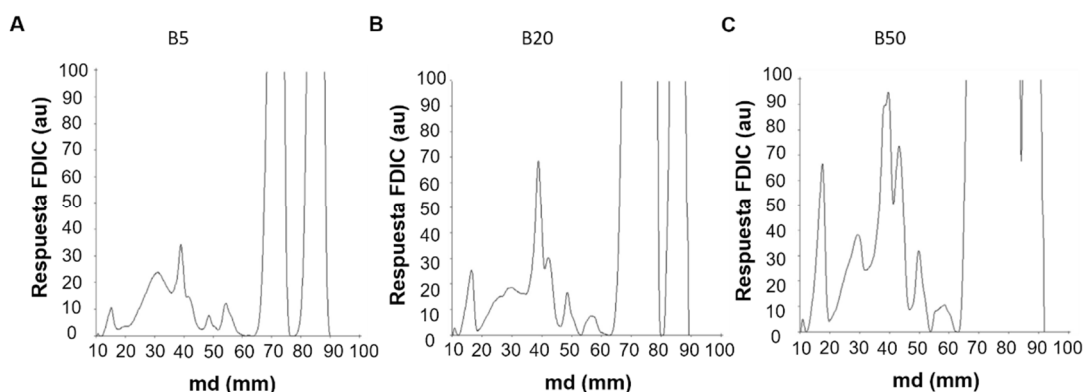


Figura 4.7 Cromatogramas HPTLC-FDIC detallando la zona a md 10-60 mm: **A)** B5, **B)** B20 y **C)** B50. Masa depositada $5.0 \cdot 10^3 \mu\text{g}$. Condiciones de AMD en **Figura 4.3**. Primulina (FDIC) $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $\lambda_{\text{exc}} 365 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} > 400 \text{ nm}$.

El gradiente de elución 1 (**Figura 4.3**) fue desarrollado para separar los MG como un pico único a md 16.9 mm. Como se ha comentado, la AMD permite un ajuste fino de la separación. Así, este gradiente fue modificado a gradiente de elución 2 para separar entre sí otras familias de lípidos en BX (DG, FA). Corresponde a zonas que quedan sin resolver siguiendo las condiciones del gradiente 1. Por lo tanto, es posible hacer cambios en la composición de la fase móvil y/o en el número de etapas para obtener una ampliación en la resolución de determinadas zonas no bien separadas en el cromatograma.

Como se observa, la adición de una cuarta etapa en el gradiente de elución 2 (DCM-*n*-heptano, 90-10 v/v) y la modificación en la distancia de migración (md, en mm), permitió la separación de ya no sólo familias de MG, sino también DG y FA en la muestra FAME B100 procedente de biodiésel (**Figura 4.8**).

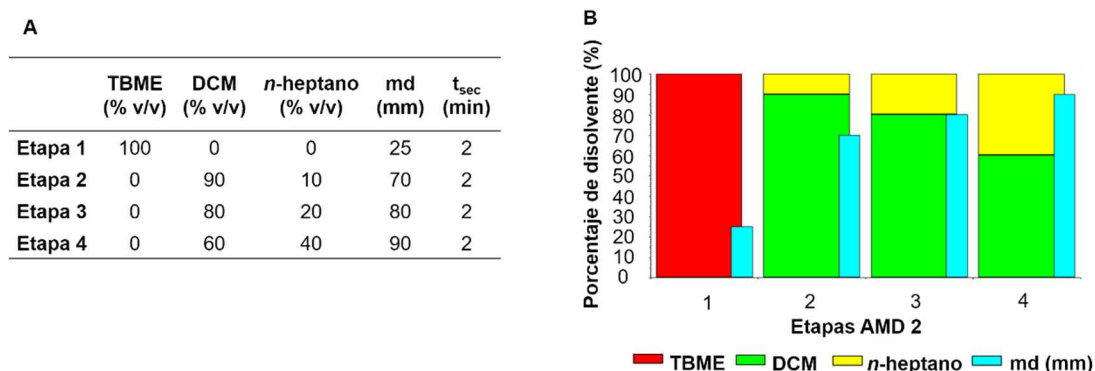


Figura 4.8 A) Tabla del gradiente de elución 2 en cuatro etapas, basado en mezclas ternarias de TBME-DCM-*n*-heptano, para separación de MG, DG y FA en FAME B100 procedente de biodiésel. **B)** Representación de las condiciones de gradiente de elución 2: mismos colores que en **Figura 4.3 B**.

Bajo estas condiciones se representa un detalle del cromatograma HPTLC-FDIC obtenido. Se observan los picos correspondientes a md de 15.4, 24.2 y 41.4 mm que, como se expondrá en las **Secciones 4.3.4 - 4.3.6** han sido identificados por MS, respectivamente, como las clases MG, FA y DG (**Figura 4.9**). Mediante este gradiente por etapas, se ha conseguido una buena focalización de bandas, perfiles estrechos y repetibles (± 0.5 mm desviación estándar en md obtenidas). La zona de migración (10-80 mm) corresponde únicamente al contenido de impurezas de lípidos presentes en FAME (<2% p/p en la muestra de biodiésel) [141].

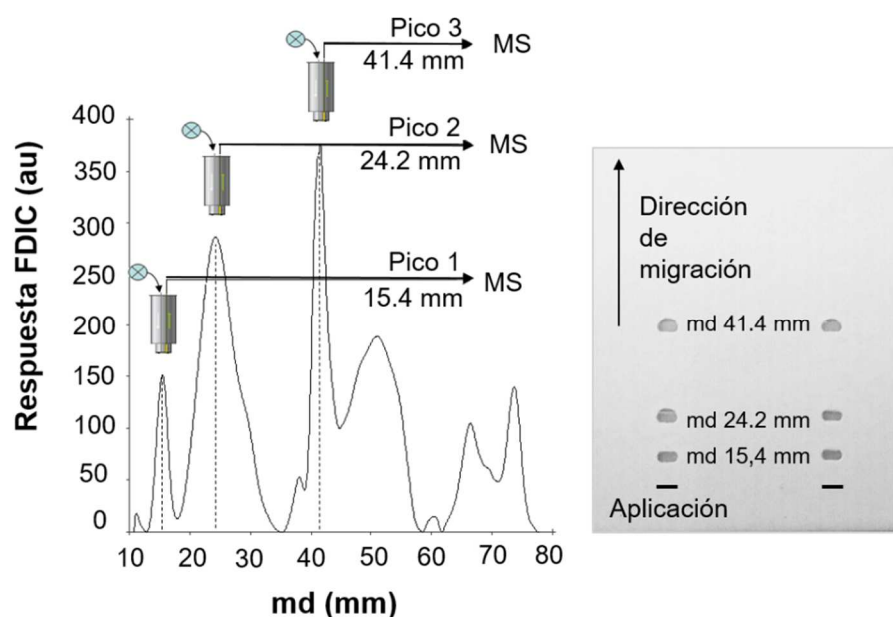


Figura 4.9 Detalle del cromatograma HPTLC-FDIC obtenido de la parte lipídica de la muestra B100 de biodiésel. Se observan los MG (pico 1: md 15.4 mm), FA (pico 2: md 24.2 mm) y DG (pico 3: md 41.4 mm), extraídos mediante la interfaz, y llevados al espectrómetro de masas. Condiciones de AMD en **Figura 4.8**. Primulina (FDIC) 200 mg·L⁻¹ a λ_{exc} 365 nm / λ_{em} >400 nm. A la derecha, detalle de la placa final perforada en forma de bandas que corresponden a las md de cada pico.

Observando el cromatograma completo, bajo las condiciones AMD descritas en cuatro etapas (**Figura 4.8**), el 98% p/p restante corresponde a FAME, migrando su pico a >80 mm (**Figura 4.10**).

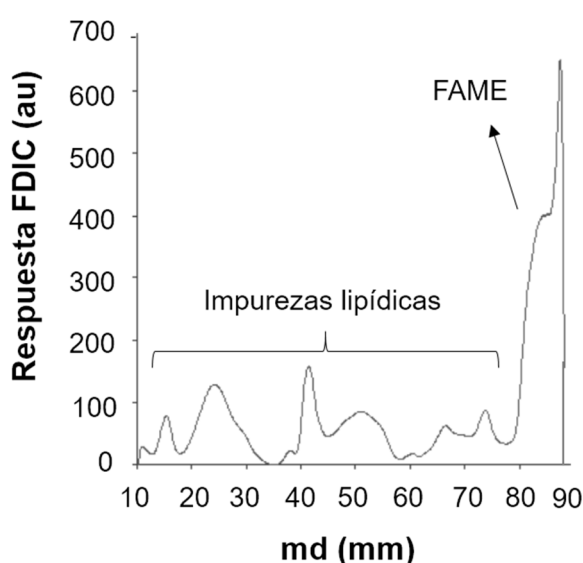


Figura 4.10 Cromatograma completo HPTLC-FDIC a λ_{exc} 365 nm / λ_{em} >400 nm obtenido para la muestra de biodiésel escaneado hasta md 90 mm. Impurezas de lípidos separadas por familias y pico mayoritario en FAME a md >80 mm. Condiciones de AMD en **Figura 4.8**.

4.3.3 Detección por densitometría de barrido. Evaluación densitométrica

Tras el desarrollo cromatográfico AMD, los cromatogramas HPTLC-FDIC (**Sección 4.3.2**) se obtuvieron mediante una previa impregnación de la placa a través de la inmersión en una disolución de primulina en metanol (200 mg·L⁻¹) utilizando el dispositivo de inmersión cromatográfica III (Camag). El equipo TLC Scanner 3 (Camag) fue usado para la detección de los picos cromatográficos.

La detección densitométrica de las placas se lleva a cabo tras esa impregnación con primulina, basándose en los aumentos de emisión en la fluorescencia que experimenta la primulina en presencia de hidrocarburos saturados y lípidos, cuando el sistema se excita en el Visible. Se genera un aumento en la señal de fluorescencia en la medida a λ_{exc} 365 nm y λ_{em} >400 nm. Este procedimiento de detección se denomina detección fluorescente por cambios de intensidad (FDIC) y es aplicable a las moléculas formadas con cadenas largas hidrocarbonadas. El origen de las señales FDIC se describe en [121, 123, 124].

Se observa en los cromatogramas que todos los componentes del biodiésel proporcionan incrementos de fluorescencia respecto de la línea de base proporcionada por la fluorescencia de la primulina.

Se han desarrollado varios métodos analíticos utilizando este fenómeno FDIC. Como por ejemplo, el catión berberina se utilizó para detectar y cuantificar hidrocarburos saturados en productos de petróleo [123, 124]. En este caso, la excitación se llevó a cabo a 365 nm y la emisión se recogió a partir de 400 nm. La berberina también fue utilizada en la detección de lípidos [47]. Se ha estudiado que este fenómeno se debe a la interacción dipolar inducida entre el catión berberina y el correspondiente alcano en el medio de sílica gel. Con todo ello se desarrolló un modelo con resultados experimentales [121, 123, 124].

Ya se demostró que la detección con primulina es compatible con el análisis posterior ESI-MS [59]. La impregnación en primulina no se considera una derivatización ya que sólo se ven involucradas interacciones no covalentes.

Por lo tanto, los picos a md 15.4 (pico 1), 24.2 (pico 2) y 41.4 mm (pico 3) en el biodiésel (**Figura 4.9**) fueron transferidos mediante la interfaz (Camag) desde la placa impregnada en primulina al sistema ESI-MS.

4.3.4 Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de MG en FAME

Como se ha descrito en el **Capítulo 2**, es posible la transferencia directa al MS de los picos separados en la placa cromatográfica (impregnada con primulina) mediante la interfaz.

Por lo tanto, el siguiente paso que se llevó a cabo fue la caracterización, es decir, la obtención de perfiles e identificación de MG en la muestra FAME.

Las especies de MG, DG y TG no pueden ser ionizadas fácilmente en ESI por protonación de soluciones no acuosas, incluso con la presencia de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido fórmico o acético). Sin embargo, estas especies pueden ionizarse de forma sencilla como aductos, por ejemplo de sodio [5, p. 218][143-146].

Así pues, el pico 1 separado en el cromatograma correspondiente a la muestra (**Figura 4.9**), con md entre 15-20 mm (15.4 mm) se transfirió directamente de la placa al equipo ESI-MS utilizando la interfaz mencionada. En el espectro HPTLC-ESI⁺-MS se obtienen los iones moleculares sodiados [M+Na]⁺ correspondientes al perfil completo (incluye todo el rango de masas) de MG en la muestra (**Figura 4.11**).

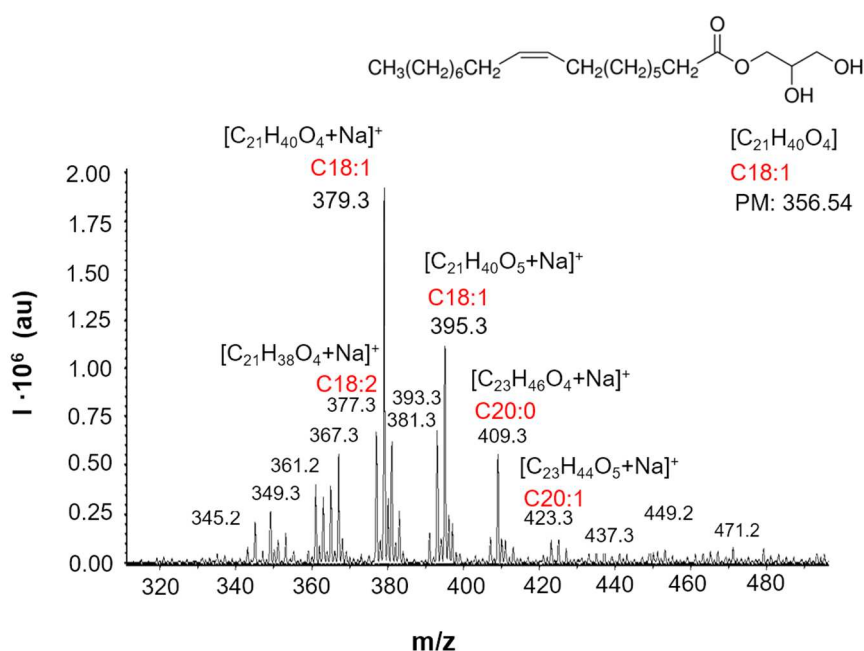


Figura 4.11 Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) obtenido al extraer con la interfaz el pico 1 del cromatograma a md 15.4 mm (**Figura 4.9**). Corresponde al perfil completo de MG en FAME. Estructura molecular del MG 1-oleoil-*rac*-glicerol (extremo superior).

Se procede a estudiar este espectro en detalle, así que se realiza un zoom a la zona del espectro donde aparecen los iones más abundantes (**Figura 4.12 A**). Éstos a m/z 379 y 395 (ambos con cadena hidrocarbonada C18:1), corresponden al aducto de sodio 1-oleoil-*rac*-glicerol $[C_{21}H_{40}O_4+Na]^+$ y su forma oxidada $[C_{21}H_{40}O_5+Na]^+$ respectivamente. El espectro HPTLC-ESI⁺-MS del patrón de 1-oleoil-*rac*-glicerol (**Figura 4.12 B**) y su espectro HPTLC-ESI⁺-HRMS (**Figura 4.12 C**) confirman estas identificaciones.

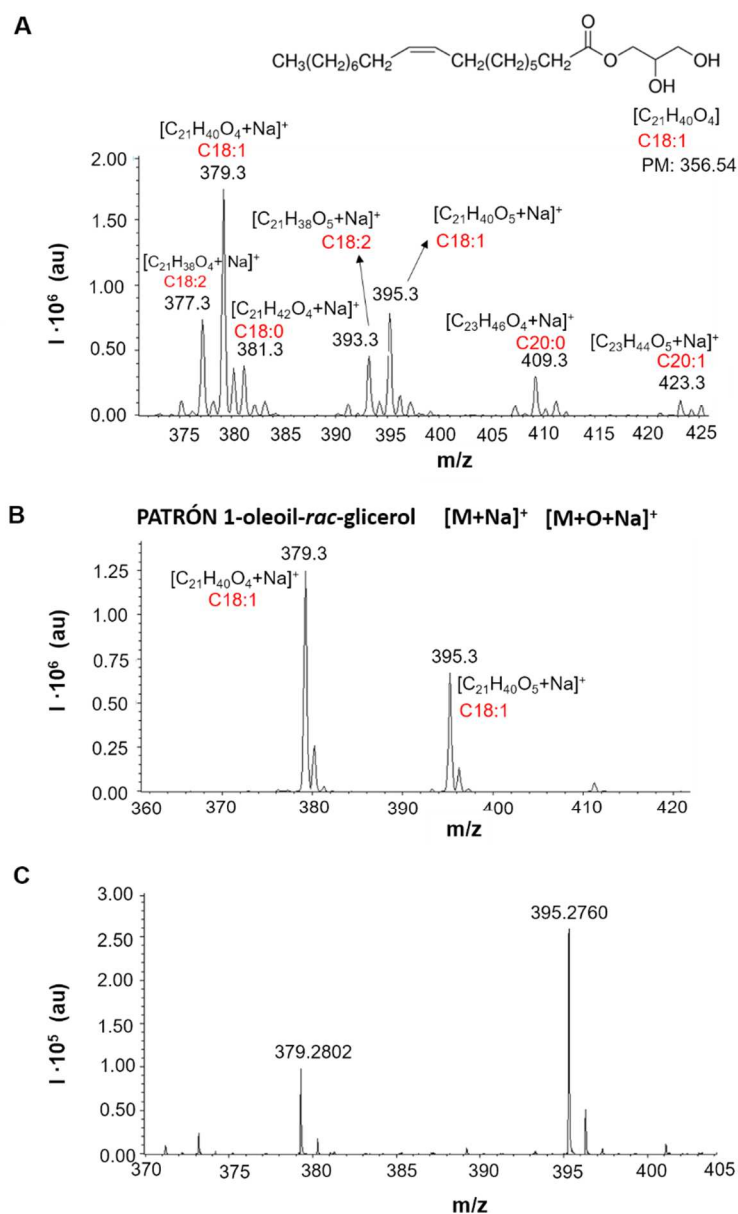


Figura 4.12 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo positivo). Detalle de una parte del perfil de MG en FAME. Estructura molecular del MG 1-oleoil-*rac*-glicerol (extremo superior). En la muestra los iones más abundantes corresponden a m/z 379 y 395, confirmados por **B)** espectro del patrón 1-oleoil-*rac*-glicerol, así como por **C)** espectro HPTLC-ESI-HRMS (en modo positivo) con señales teóricas a m/z 379.2819 (error 1.7 mDa o 4.4 ppm) y m/z 395.2768 (error 0.8 mDa o 2.0 ppm).

El espectro HRMS proporciona la masa exacta y una identificación inequívoca. Se calcula el error relativo (ppm) de los iones más abundantes a m/z 379 y 395, como el cociente entre el valor absoluto y el valor teórico verdadero (**Ecuación 4.1**). El error relativo debería dar como resultado un valor máximo de 5 ppm. En el caso de m/z 379.2819 (señal teórica), se obtiene un error 1.7 mDa o 4.4 ppm; y en el de m/z 395.2768 (señal teórica), es de 0.8 mDa o 2.0 ppm.

$$\text{Error relativo (ppm)} = \frac{\left(\frac{m}{z} \text{ medida} - \frac{m}{z} \text{ teórica}\right)}{\frac{m}{z} \text{ teórica}}$$

Ecuación 4.1 Cálculo del error relativo (ppm) utilizado en la determinación de MG en biodiésel.

En general, hay que destacar la elevada intensidad obtenida para los iones en todos los espectros realizados directamente a partir de la placa cromatográfica.

En el espectro HPTLC-ESI⁺-MS se lleva a cabo también la pre-identificación de una serie de MG sodiados que difieren en la cadena hidrocarbonada de FA (**Figura 4.12 A**). De entre los cuales se encuentran C18:2 (m/z 377), C18:0 (m/z 381) y C20:0 (m/z 409) como FA; o sus respectivas formas oxidadas basadas en C18:2 (m/z 393) y C20:1 (m/z 423). Es decir, se obtiene un perfil de los MG, que puede servir para aportar información sobre la procedencia y la historia del biodiésel analizado.

El siguiente paso a llevar a cabo es la identificación MSⁿ mediante la fragmentación del aducto de sodio del 1-oleoil-*rac*-glicerol presente en la muestra de biodiésel. El ion precursor a m/z 379 [C₂₁H₄₀O₄+Na]⁺ se aísla con una anchura de ventana (tolerancia de masa) de m/z 2±1 y se fragmenta con

una amplitud de voltaje de 0.55 V. En el espectro HPTLC-ESI⁺-MS/MS se observan los iones m/z 361 $[C_{21}H_{38}O_3+Na]^+$ y m/z 333 $[C_{19}H_{34}O_3+Na]^+$. Éste último predomina de forma más clara. Se identifican con iones que provienen de la pérdida de $-H_2O$ y de $-(CH_2)_2H_2O$ respectivamente (**Figura 4.13 A**).

Los fragmentos obtenidos son coherentes con las estructuras de MG de los iones ESI. El equipo de trampa de iones permite una fragmentación de baja energía, muy útil para obtener información estructural.

El ion precursor que predomina a m/z 333 se aísla con una anchura de ventana (tolerancia de masa) de m/z 2 ± 1 y se fragmenta con una amplitud de voltaje de 0.65 V. El espectro HPTLC-ESI⁺-MS³ del ion a m/z 333 muestra los picos correspondientes a la pérdida de $-H_2O$ (m/z 315), $-(CH_2)_2$ (m/z 305), $-(CH_2)_2CH_3$ (m/z 289) y $-(CH_2)_3CH_3H_2O$ (m/z 258) (**Figura 4.13 B**).

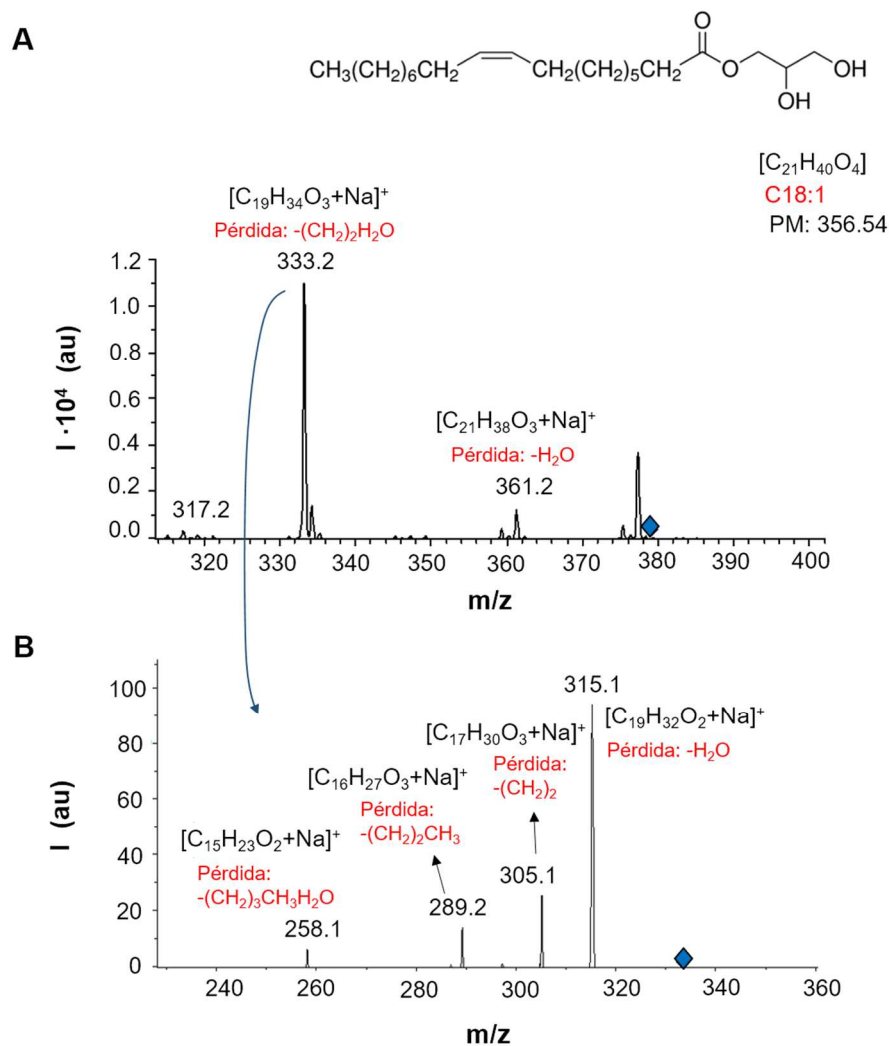


Figura 4.13 A) Espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo positivo) del ion precursor a m/z 379 (Figura 4.12 A). Estructura molecular del MG 1-oleoil-*rac*-glicerol (extremo superior). **B)** espectro HPTLC-ESI-MS³ (en modo positivo) del ion precursor a m/z 333 confirmando el pico 1 a md 15.4 mm (Figura 4.9) como MG en FAME.

4.3.5 Obtención de perfiles semicuantitativos e identificación de DG en FAME

Del mismo modo que en el caso de los MG, se realiza la caracterización, es decir, la obtención de perfiles e identificación de especies de DG en la muestra de FAME (Figura 4.9, pico 3 a md 41.4 mm). El espectro HPTLC-ESI⁺-MS muestra las moléculas sodiadas $[M+Na]^+$ a m/z 643 (C36:2) $[C_{39}H_{72}O_5+Na]^+$, m/z 659 (C36:2) $[C_{39}H_{72}O_6+Na]^+$, m/z 673 (C37:2) $[C_{40}H_{74}O_6+Na]^+$ y m/z 687 (C38:2) $[C_{41}H_{76}O_6+Na]^+$ que corresponden al perfil de DG en FAME (Figura 4.14 A).

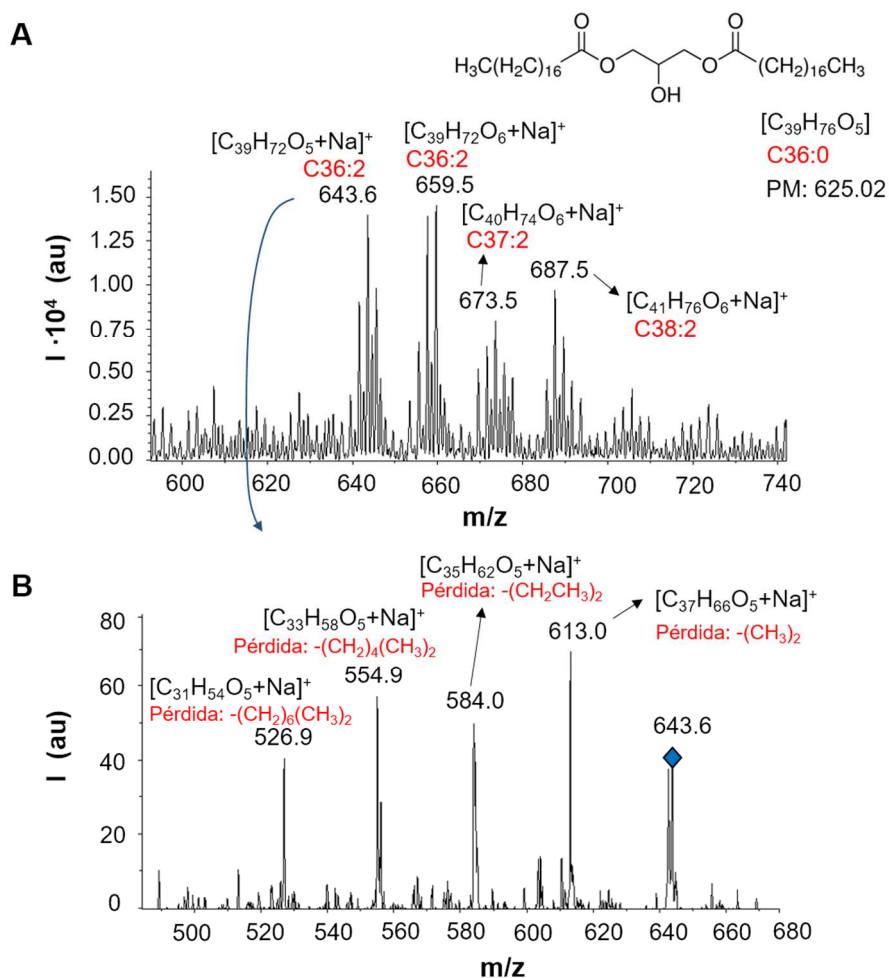


Figura 4.14 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) del pico 3 a md 41.4 mm (**Figura 4.9**) en la muestra de FAME. Estructura molecular del DG gliceril 1,3-diestearato (extremo superior). **B)** Se fragmenta el ion más abundante a m/z 643 para obtener el espectro HPTLC-ESI-MS/MS de este ion precursor (en modo positivo), confirmando así la presencia de DG en FAME.

Se selecciona como ion precursor el más abundante que corresponde a m/z 643, aislándose con una anchura de ventana (tolerancia de masa) de m/z 2 ± 1 y fragmentándose con una amplitud de voltaje de 0.4V, obteniendo su HPTLC-ESI⁺-MS/MS. Se muestran los picos correspondientes a la pérdida de: $-(CH_3)_2$ (m/z 613), $-(CH_2CH_3)_2$ (m/z 584), $-(CH_2)_4(CH_3)_2$ (m/z 554) y $-(CH_2)_6(CH_3)_2$ (m/z 526) (**Figura 4.14 B**).

4.3.6 Obtención de perfiles e identificación de FA en FAME

Habiendo estudiado el perfilado de las familias de MG y DG en FAME, se continuó con la caracterización de FA (**Figura 4.9**, pico 2 a md 24.2 mm), es decir, la obtención de perfiles y su identificación. Éstos van a formar iones moleculares con carga negativa $[M-H]^-$, por lo que el proceso se llevó a cabo mediante ionización ESI negativa, y no positiva formando iones sodiados $[M+Na]^+$ (como sucedía en el caso de MG y DG).

Para ello, mediante el estudio ESI⁻-MS del pico 2, se obtienen las desprotonaciones $[M-H]^-$ que corresponden al perfil típico de FA (**Figura 4.15 A**).

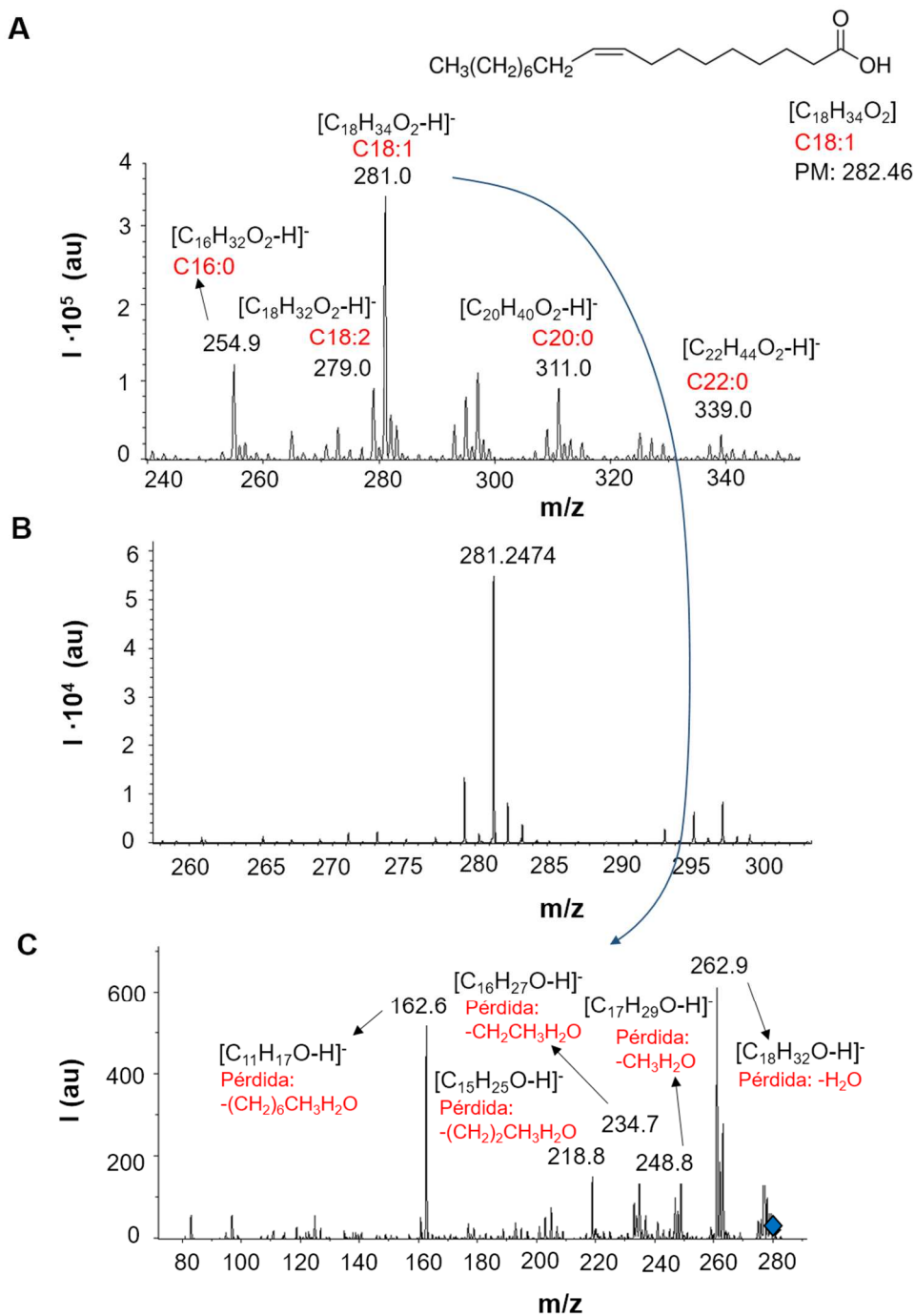


Figura 4.15 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) del pico 2 a md 24.2 mm (**Figura 4.9**) correspondiente al perfil de FA en FAME. Estructura molecular del FA correspondiente al ácido oleico (extremo superior). El ion obtenido más abundante es m/z 281, confirmándose que es ácido oleico, por: **B)** su espectro HPTLC-ESI-HRMS (en modo negativo) con señal teórica a m/z 281.2486 (error 1.2 mDa o 4.3 ppm), **C)** su espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo negativo) del ion precursor m/z 281, confirmando el pico 2 como FA en FAME.

El pico mayoritario observado corresponde a ácido oleico desprotonado $[C_{18}H_{34}O_2-H]^-$ con m/z 281 ($C_{18:1}$). Además de ácido oleico, en la muestra de FAME se identifican otros FA con distintas estructuras en su cadena; de entre los cuales se encuentran $C_{16:0}$ (m/z 254), $C_{18:2}$ (m/z 279), $C_{20:0}$ (m/z 311) y $C_{22:0}$ (m/z 339). Los tres espectros corresponden a la muestra de biodiésel (**Figura 4.15**) y no al patrón de ácido oleico (**Figura 4.16**).

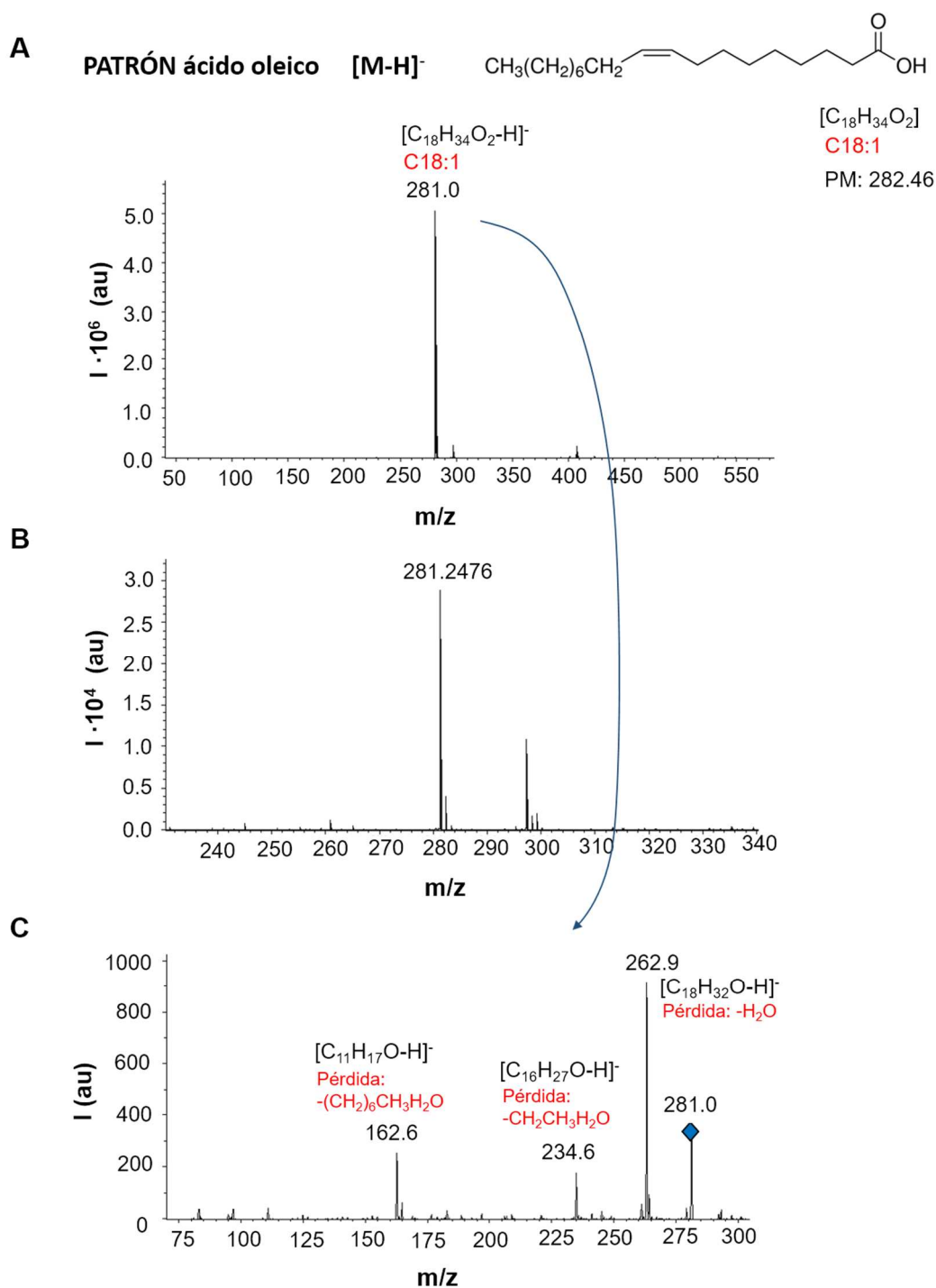


Figura 4.16 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) del patrón de ácido oleico así como **B)** su espectro HPTLC-ESI-HRMS (en modo negativo) con señal teórica a m/z 281.2486 (error 1 mDa o 3.5 ppm). **C)** Espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo negativo) del patrón de ácido oleico con los iones más abundantes obtenidos del precursor m/z 281. Estructura molecular del ácido oleico (extremo superior).

En el espectro HPTLC-ESI-HRMS del pico 2 en la muestra de FAME (**Figura 4.15 B**) se obtiene un ion mayoritario con (m/z 281.2474) masa similar a la obtenida en el espectro HPTLC-ESI-MS (m/z 281.0) y HPTLC-ESI-HRMS (m/z 281.2476) del patrón de ácido oleico (**Figura 4.16 A-B**).

El espectro HPTLC-ESI-MS/MS del ion precursor m/z 281 en FAME (**Figura 4.15 C**) (aislado con una anchura de ventana de m/z 2 ± 1 y fragmentado con una amplitud de voltaje de 0.65 V) ofrece una fragmentación similar a la del patrón de ácido oleico (**Figura 4.16 C**). Los fragmentos obtenidos corresponden a la pérdida de: $-H_2O$ (m/z 263), $-CH_2CH_3H_2O$ (m/z 234) y $-(CH_2)_6CH_3H_2O$ (m/z 163).

CAPÍTULO 5

IDENTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS
UNIDOS A PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN
BACTERIAS PÚRPURAS FOTOSINTÉTICAS

5.1 INTRODUCCIÓN

Los descubrimientos acerca de la implicación de las proteínas de membrana (MP) en procesos biológicos esenciales no dejan de aumentar [147]. Sin embargo, la comprensión de sus mecanismos de funcionamiento es en la actualidad muy limitada. Las MP representan actualmente menos del 2% de las proteínas cuyas estructuras se encuentran depositadas en el Protein Data Bank, mientras que representan aproximadamente el 30% del proteoma humano, y más del 60% de las dianas terapéuticas existentes [148, 149].

Esto es debido a que los detergentes especiales usados para extraer MP impiden su cristalización o la difracción a alta resolución de los cristales obtenidos, incluso pudiendo producir la inactivación de dichas proteínas [150]. De modo parecido, los lípidos han sido tradicionalmente considerados como impedimentos que debían ser eliminados antes de estudiar las estructuras de las MP. Sin embargo, los lípidos que se encuentran interaccionando y rodeando las MP en las membranas biológicas juegan un papel importante en la actividad de estas proteínas, influyendo directamente en su estabilidad [147]. Los lípidos pueden modificar la compacidad del complejo Proteína-Detergente-Lípido (PDL) y cambiar la forma, y la resolución, de los cristales de MP.

En este capítulo se muestra cómo la separación HPTLC y su acoplamiento con ESI-MS y tandem MS puede ayudar, de una manera simple y directa, a identificar los fosfolípidos (PL) que pueden afectar la función de las proteínas de membrana (MP) e, indirectamente, a mejorar la cristalización de éstas.

A continuación, y antes de mostrar los resultados obtenidos, se explican los conceptos básicos necesarios para la comprensión de este capítulo y se plantea en detalle el problema analítico.

5.1.1 Las MP del aparato fotosintético de las bacterias púrpuras

La fotosíntesis, de primordial importancia evolutiva, es el proceso bioenergético por el cual las plantas y ciertas bacterias sintetizan materia orgánica a partir de la luz [151].

Las bacterias púrpuras, que pertenecen a la familia de las Eubacterias, forman un grupo extremadamente heterogéneo a nivel morfológico (forma, tamaño, estructura de membranas...), fisiológico (consumo de carbono, nitrógeno...) y constitutivo (estructura molecular del aparato fotosintético, composición en pigmentos...). En presencia de oxígeno, estas bacterias realizan la respiración “clásica” y reprimen la síntesis de los complejos del aparato fotosintético. Por el contrario, cuando son cultivadas en medio anaerobio y en presencia de luz, realizan la fotosíntesis. Esto implica la formación de membranas invaginadas intracitoplasmáticas, formación que es fuertemente reprimida cuando la bacteria utiliza la respiración. Estas invaginaciones son debidas a la síntesis del aparato fotosintético.

El Premio Nobel 1988 en Química fue concedido a Johann Deisenhofer, Hartmut Michel y Robert Huber por la elucidación de la estructura de Rayos X del centro reaccional fotosintético (RC) de *Rhodospseudomonas viridis*, una bacteria púrpura [151].

La cadena fotosintética de las bacterias púrpuras posee un único fotosistema que convierte la energía luminosa en energía química. Está compuesto de dos tipos de proteínas: las antenas colectoras de luz (LH1, por “light harvesting”) que absorben los fotones, y el centro reaccional fotosintético (RC) que realiza la separación de las cargas eléctricas. La antena LH1 está presente en todas las cepas bacterianas e íntimamente ligada al RC al que rodea. Estas antenas son proteínas integrales, constituidas por la repetición de un heterodímero de dos polipéptidos (de 5 a 7 kDa), a los cuales se asocian los pigmentos carotenoides y bacterioclorofilicos que captan la luz. Las bacterias púrpuras (y las verdes) deben sus nombres a la gran variedad de pigmentos de tipo bacterioclorofilas y carotenoides que contienen, y que confieren a los cultivos bacterianos este color. Estos pigmentos tienen

funciones importantes en las primeras etapas de la fotosíntesis: captación de la luz (por absorción), fotoprotección (por degradación del exceso de energía) y estabilización estructural de los complejos de captación de la luz.

El laboratorio de Genética y Biofísica de Plantas (CEA, CNRS, Université d'Aix-Marseille, Francia), con quien se colabora en este trabajo, fue uno de los primeros en mostrar la existencia de dímeros RC-LH1 en forma de S [152], resultando de la asociación de dos monómeros de RC-LH1 gracias a la presencia del polipéptido suplementario pufX. En este complejo, las antenas LH1 se asocian formando un anillo abierto, en forma de C, que rodea al RC (**Figura 5.1**). El polipéptido pufX juega un papel estructural muy importante. De este modo, se dice que las MP involucradas en la actividad fotosintética de ciertas bacterias púrpuras no sulfurosas se presentan como un dímero, el complejo RC-LH1-pufX [153].

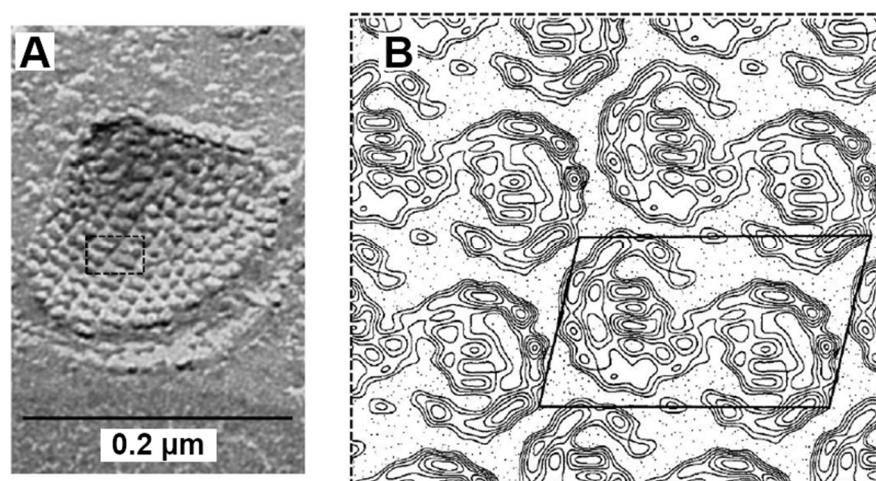


Figura 5.1 Organización de las membranas fotosintéticas [148]. **A)** Fractura de membranas de *Rhodospirillum* (*Rb.*) *bogoriensis* (el rectángulo punteado se indica a modo de ejemplo). **B)** Mapa de proyección a 20 Å de resolución de las membranas nativas por coloración negativa de *Rhodospirillum sphaeroides*.

La proximidad de todos estos elementos juega un papel primordial en la transferencia de electrones, tráfico de H^+ a través de la membrana y, por tanto, el ciclo fotosintético, con la producción simultánea de ATP a partir de ADP (**Figura 5.2**).

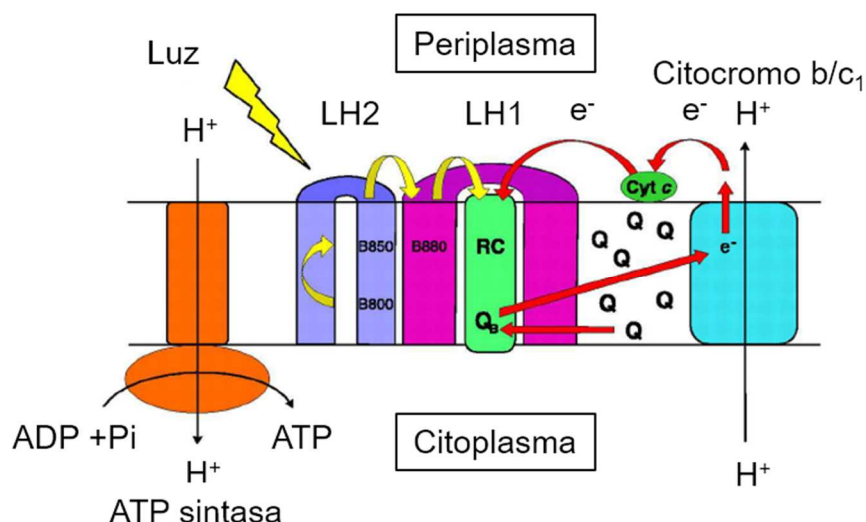


Figura 5.2 Esquema de la cadena fotosintética. LH1 y LH2, antenas colectoras de luz que transfieren energía al RC (Centro Reaccional Fotosintético), donador de e^- para las quinonas (Q). Se denomina Cyt c a Citocromo C.

A pesar de todo este conocimiento, la ausencia de una caracterización de la estructura de alta resolución del complejo RC-LH1-pufX no permite comprender completamente el mecanismo, ni siquiera el papel estructural de pufX. Hasta la fecha, sólo se han propuesto modelos a partir de imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) o de microscopía electrónica.

5.1.2 Solubilización de MP

Las MP constituyentes de este aparato fotosintético son proteínas integrales o intrínsecas, esto es, que se insertan en la bicapa lipídica de la membrana. Estas proteínas son moléculas anfifílicas, puesto que están constituidas por una parte hidrófoba que interacciona con las cadenas alifáticas de los lípidos de la membrana. Pueden estar completamente encajadas en la membrana o poseer dominios extra-membrana para fijar ligandos, transportar metabolitos o para realizar la transducción de energía.

La presencia de una parte hidrofóbica en su estructura las hace insolubles en agua (se desnaturalizan) y complica la cristalización, tanto en la cristalogénesis como en las etapas de producción y purificación. Esto implica que, para manipularlas, hay que utilizar detergentes especiales, que son

compuestos anfifílicos de tipo tensioactivo, para mantenerlas en disolución. El detergente utilizado en este trabajo ha sido el dodecil β -maltósido (DDM), un tensioactivo no-iónico con cabeza tipo azúcar.

Al contacto con la membrana, el detergente desestabiliza los lípidos y se inserta poco a poco en la bicapa lipídica hasta hacerse mayoritario. Hay entonces una solubilización de la membrana con formación de micelas mixtas detergente/lípido y de complejos proteína/detergente. Este complejo imita la bicapa lipídica recubriendo la superficie hidrofóbica de la proteína, lo que permite mantenerla en disolución. Es decir, que habrá una cierta cantidad de detergente asociado a la proteína. Asimismo, ciertos lípidos nativos quedan ligados a la proteína después de la extracción, de ahí el uso de la denominación PDL para designar al complejo Proteína-Detergente-Lípido.

5.1.3 Influencia de los fosfolípidos en la solubilización y cristalización de las MP

Mientras que la importancia del detergente se ha considerado evidente desde los comienzos de la cristalización de las MP, la influencia de los lípidos no fue observada hasta 1993, en que Nussberger [154] mostró la necesidad de un galactolípido específico para la formación de un cristal 3D de un complejo proteico captador de luz en las plantas. Después se sucedieron más ejemplos [155] y, en algunos casos, la adición de lípidos ha contribuido incluso a la obtención de cristales [156, 157]. De hecho, la cantidad de lípidos influye directamente en la estabilidad de la proteína y puede, al igual que el detergente, modificar la compacidad del complejo PDL y cambiar la forma y la resolución de los cristales de MP [158]. Hay pues una cantidad óptima de lípidos a definir para encontrar el mejor compromiso entre ambiente próximo a las condiciones nativas y complejo PDL compacto. Sin embargo, esta cantidad difiere de una proteína a otra y no puede ser conocida a priori. Además, el detergente utilizado para la purificación determinará en gran medida la cantidad de lípidos copurificados con la proteína. La conclusión es que una MP debería cristalizar en un ambiente lo más similar posible a su medio natural.

Considerando las dificultades que acabamos de explicar, no es ilógico plantearse cómo las proteínas de membrana pueden incluso cristalizar. Sin embargo, se han dado aproximadamente 672 casos de éxito hasta 2016 (Figura 5.3).

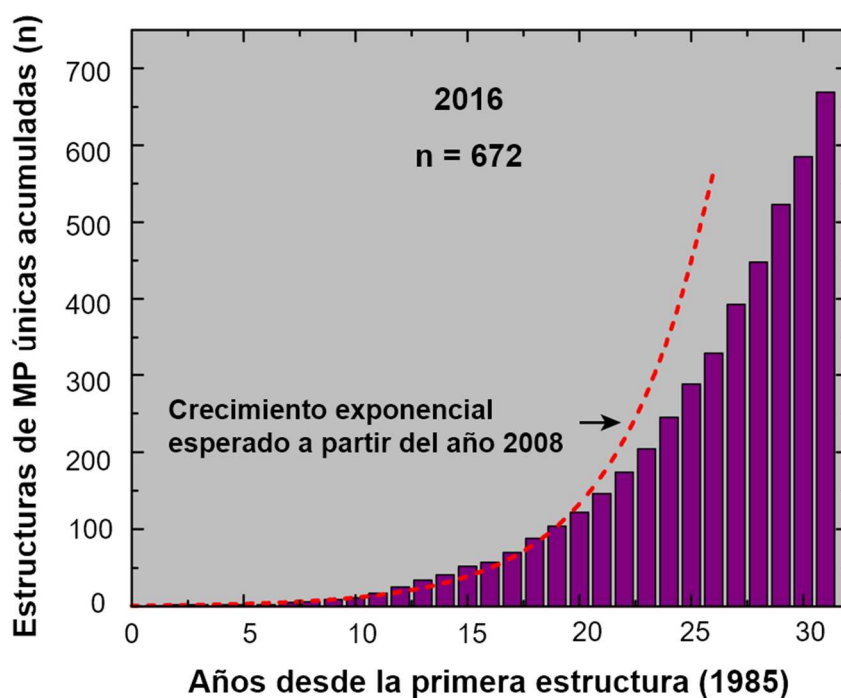


Figura 5.3 Evolución con respecto al tiempo del número de estructuras de MP cristalizadas que se conocen hasta el año 2016.

La cristalización de las MP es, pues, una tarea delicada, fruto de teoría, ensayos prueba-error y cribado extensivo.

Aunque es raro que la extracción por un detergente elimine completamente la cubierta de lípidos unidos a las proteínas de membrana, si esto ocurre puede suponer la pérdida de la actividad biológica de la proteína. Hay docenas de ejemplos de proteínas (que incluyen deshidrogenasa succinato y otros componentes de la cadena de transporte de electrones, varias ATPasas, numerosas transferasas y receptores) que son inactivadas cuando son despojadas de lípidos por el detergente o disolventes orgánicos, y son reactivadas por adición de lípidos [159, p. 51 y p. 98].

5.1.4 Influencia de los fosfolípidos en la función de las MP de bacterias fotosintéticas

Las propiedades de las proteínas de membrana se comprenden mejor en el contexto de su entorno lipídico. De hecho, los contactos entre las proteínas integrales de membrana y los lípidos deben ser muy estrechos para mantener el sellado de la membrana como barrera de permeabilidad. La presencia de una proteína no tiene efecto sobre los lípidos distantes de la bicapa, pero sí lo tiene en el anillo (annulus) de lípidos que la rodean, formando la interfase con el resto de la membrana. Estos lípidos son denominados anulares o “boundary” (fronterizos) y pueden ser distinguidos experimentalmente de los lípidos “bulk” de la bicapa. Además de los lípidos bulk y anulares, hay una tercera clase de lípidos que comprenden aquéllos que están fuertemente unidos en hendiduras o entre subunidades de las proteínas. Estos lípidos son denominados lípidos cofactores, que se necesitan frecuentemente por razones de actividad. Experimentos con proteínas purificadas han mostrado que muchas proteínas de membrana requieren lípidos específicos (o clases de lípidos) para unirse de modo estable o insertarse en las bicapas. Asimismo, numerosos enzimas requieren lípidos específicos para su actividad [159, p. 97].

Las fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE) y fosfatidilglicerol (PG) están entre las clases de fosfolípidos (PL) más importantes en las membranas de las bacterias púrpuras no sulfurosas [148, 160] y son éstas en las que nos hemos centrado en este trabajo (**Figura 5.4**). Asimismo, la bibliografía sugiere un papel específico para la cardiolipina (CL) en los complejos fotosintéticos de las bacterias púrpuras [161]. Por ejemplo, la cristalización del centro reaccional de *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*, también una bacteria púrpura no sulfurosa, mostró que éste contiene un sitio para interactuar con CL. La estructura obtenida por Rayos X muestra que la CL está unida a un dominio transmembrana y que los grupos negativamente cargados de la CL se estabilizan por interacciones con ciertos aminoácidos cargados positivamente (Arg, Lys, His). Las cadenas acilo de la CL

contribuyen a estabilizar la estructura de la proteína, proporcionando un modo de mantener unidas diferentes subunidades a través de este fosfolípido [162].

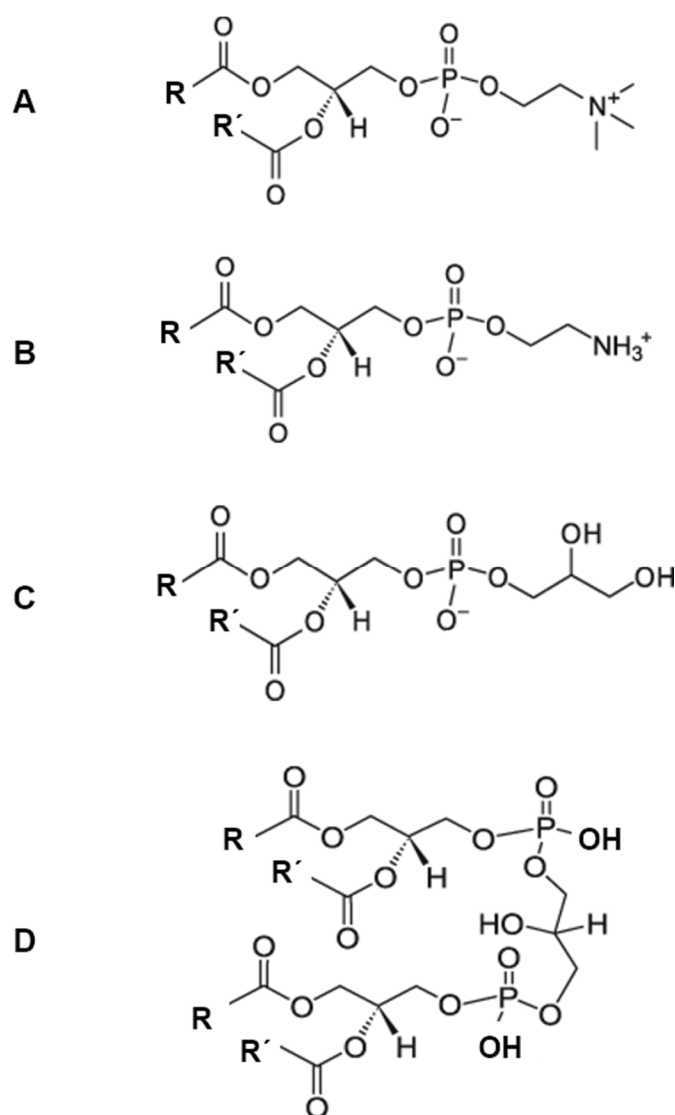


Figura 5.4 Estructura de **A)** fosfatidilcolinas (PC), **B)** fosfatidiletanolaminas (PE), **C)** fosfatidilglicerol (PG) y **D)** cardiolipinas (CL), con R y R' como cadenas hidrocarbonadas.

Adicionalmente, la técnica de resonancia de espín electrónico (EPR) predijo, basándose en la forma y tamaño de su RC, que *Rb. sphaeroides* contiene 30-35 lípidos anulares. Las estructuras de Rayos X mostraron evidencia de lípidos específicos, incluyendo una cardiolipina y un PE, los cuales ajustan perfectamente en los surcos hidrofóbicos de la superficie de la proteína expuesta al dominio apolar de la membrana [159, p. 112].

De las seis moléculas de PE identificadas en la estructura de la citocromo c oxidasa de *Rb. sphaeroides*, cuatro están entre las subunidades y son responsables de la unión de la subunidad IV en el complejo [159, p. 216].

5.1.5 Técnicas analíticas para caracterización de los PL de membrana

Como se observa de lo anteriormente expuesto, la cristalografía de algunas MP, en los casos en los que se ha podido llevar a cabo satisfactoriamente, ha proporcionado una información detallada sobre la influencia de sus interacciones con lípidos en lo referente a sus funciones biofísicas más importantes.

Los RC fotosintéticos fueron descubiertos en las bacterias púrpura y caracterizados por técnicas como EPR y espectroscopía óptica antes de que se probara que eran susceptibles de cristalización, por ejemplo, en el caso de *Rb. sphaeroides* [159, p. 99 y p. 109].

En ausencia de la posibilidad de llevar a cabo un análisis de Rayos X, un seguimiento por EPR o espectroscopía de fluorescencia, se han realizado simulaciones computacionales que han sugerido, como ejemplo, la posibilidad de un papel similar para la CL en otras bacterias púrpuras, además de en el caso mencionado de *Rb. sphaeroides*.

Otra vía para la identificación de los fosfolípidos unidos a las membranas celulares es la extracción y ulterior análisis cromatográfico acoplado a Espectrometría de masas (MS). Esta vía ha sido relativamente poco explorada en el caso de las bacterias que aquí nos ocupan.

La Cromatografía de gases (GC-MS) ha sido utilizada para este fin, si bien se ha demostrado que hasta un 40% de los compuestos presentes en extractos celulares son modificados o destruidos por efectos térmicos con esta técnica, aunque los compuestos hayan sido previamente derivatizados por trimetilsililación [163, 147]. Si bien la aproximación al análisis por Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas (LC-MS) parece

más correcta desde el punto de vista de la posible modificación térmica de los compuestos, esta técnica ha sido poco utilizada hasta el momento en el caso de las bacterias aquí estudiadas.

La Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC) tampoco ha sido muy utilizada. Barret desarrolló un método basado en HPTLC para evaluar semicuantitativamente el efecto de los detergentes en la cristalización del complejo RC-LH1-pufX de *Rhodobacter (Rb.) blasticus* [164].

La misma autora llevó a cabo uno de los pocos estudios realizados hasta el momento para identificar, en general, las especies de cada clase de PL en *Rb. blasticus*. Utilizó LC-MS en fase reversa, ajustando las condiciones de separación con el objetivo de un análisis general de todas las clases de PL y comparó los resultados con los obtenidos mediante análisis por HPTLC. En este trabajo, las clases de PL separadas en la placa fueron rascadas y posteriormente extraídas manualmente para su análisis por MS. Ambas técnicas coincidieron en lo sustancial, si bien sólo detectaron mayoritariamente PC, PE y PG(36:2) y ninguna especie de CL fue encontrada.

El único estudio acerca de bacterias fotosintéticas que se ha centrado en la identificación de las especies de CL ha sido publicado muy recientemente, coincidiendo con la redacción de esta Memoria [19].

Las especies de CL contenidas en los extractos lipídicos de una cepa particular (R26) de la bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rb. sphaeroides* han sido identificadas recientemente por primera vez y de una manera inusual hasta ahora en la literatura. Para ello, se usa un esquema que combina TLC, obtención preparativa de la banda de CL mediante raspado manual de la placa, y ulterior LC en fase reversa acoplada a ESI-MS, con ionización en modo negativo, y tándem secuencial MS/MS, MS³ con un equipo de trampa de iones similar al utilizado en nuestro trabajo. El acoplamiento “off-line” de dos tipos de cromatografía diferentes (y el ulterior acoplamiento “on-line” a MS) ha llevado a encontrar seis tipos principales de CL, CL(72:4), CL(72:3), CL(71:3), CL(70:3), CL(70:4) y CL(66:3), (en total 27 especies fueron identificadas, incluyendo en éstas isómeros composicionales y

regioisómeros). La técnica es eficaz, analíticamente hablando, aunque tediosa en cuanto a tiempo y trabajo experimental. Está enfocada específicamente a CL.

En lo referente a los resultados de ese trabajo, es interesante la presencia de cadenas impares C17 y C19, que en este caso se presentan en forma saturada. La ausencia de cadenas poliinsaturadas, más susceptibles al daño por oxidación, está justificada por la conocida ausencia de carotenoides, que actúan como antioxidantes, en la cepa R26 de esta bacteria. No es el caso de las bacterias estudiadas en nuestro trabajo, que contienen pigmentos carotenoides. Esto está de acuerdo con resultados publicados previamente [165-167].

5.2 OBJETIVO

Nosotros hemos continuado el trabajo de Barret [148] con el mismo enfoque (análisis general de clases de PL en *Rb. blasticus*) para ver si el acoplamiento “on-line” HPTLC-MS (trampa de iones) proporciona datos adicionales sobre las especies moleculares de PL presentes, respecto a los ensayos LC-MS que se realizaron previamente con esta bacteria. Pretendemos comprobar también si es posible, en estas condiciones, encontrar especies de CL en esta misma bacteria y en las otras estudiadas *Rhodospirillum (Rd.) rubrum* y *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis*, así como en el complejo purificado de esta última bacteria, que también ha sido obtenido en condiciones aerobias (presencia de O₂) y anaerobias (luz en ausencia de O₂); aunque los resultados previos encontrados en la bibliografía (caso del *Rb. blasticus* o casos de las otras dos bacterias consideradas) hayan sido negativos [148].

Hemos intentado evaluar si es posible identificar las especies sin introducir la etapa LC-MS tras la separación HPTLC, acoplando ésta directamente a MS.

Pretendemos identificar los fosfolípidos (PL) presentes de las clases PC, PE y PG en los extractos de esas mismas bacterias púrpuras fotosintéticas

no-sulfurosas. Las bacterias han sido cultivadas en el Laboratoire de Biophysique et Génétique de Plantes (CEA, CNRS, Université Aix-Marseille), que estudia su fotosíntesis.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Preparación de muestra

Se prepararon membranas de *Rd. rubrum*, *Rb. blasticus* y *Rbc. bogoriensis* mediante una técnica descrita en la bibliografía [153]. Las dos primeras bacterias fueron obtenidas en condiciones fotosintéticas mientras que *Rbc. bogoriensis* fue cultivada en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B). Las membranas fueron en todos los casos solubilizadas utilizando DDM y purificadas por métodos descritos [153]. Se aisló y purificó el complejo RC-LH1-PufX de *Rbc. bogoriensis*.

5.3.1.1 Aislamiento de las membranas

Las membranas fotosintéticas fueron solubilizadas y purificadas usando el método descrito por Comayras *et al.* [168] y Semchonok *et al.* [153]. Las células recién cultivadas fueron recogidas por centrifugación a $8.0 \cdot 10^3 g$, lavadas con tampon Tris (tris(hidroximetil)aminometano)-HCl (20 mM, pH 8) y con 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro (1mM, Interchim), y posteriormente sometidas a tres ciclos con prensa francesa (hidráulica), a $1.6 \cdot 10^4$ p.s.i. Las células que quedaron intactas y otros residuos fueron eliminadas por centrifugación a $2.0 \cdot 10^4 g$ durante 30 min a 4 °C. Las membranas fotosintéticas fueron “pelletizadas” a $2.0 \cdot 10^5 g$ durante 90 min y resuspendidas en Tris-HCl (20 mM, pH 8) y 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro (1 mM). Para la preparación del complejo RC-LH1 (ver más abajo), las membranas fueron tratadas con NaBr 3M, seguido de dos lavados con Tris-HCl (50 mM, pH 8) para eliminar las proteínas unidas a la membrana. En todos los experimentos, las membranas fueron suspendidas en Tris-HCl (20 mM, pH 8).

5.3.1.2 Aislamiento del complejo RC-LH1-PufX de *Rhodobaca bogoriensis*

Las membranas fotosintéticas fueron solubilizadas con 1% de dodecil β -maltósido (DDM) (Biomol) durante 10 min a 4 °C y luego ultracentrifugadas a $2.0 \cdot 10^5 g$ durante 30 min para eliminar el material insoluble. El complejo solubilizado se depositó en un gradiente continuo de sacarosa, conteniendo Tris-HCl (20 mM, pH 8), sacarosa 0.5 M y DDM al 0.01%, y posteriormente fue ultracentrifugado a $2.0 \cdot 10^5 g$ durante 15h a 4 °C. De este modo, se separaron tres bandas de pigmentos correspondiendo (de arriba abajo) a: citocromo bc_1 , complejo monomérico y dimérico RC-LH1. Esta última fracción fue recogida utilizando una jeringa aplicada a una columna cromatográfica (GE Healthcare) con relleno de intercambio aniónico (Mono Q), preequilibrada previamente con Tris-HCl (50 mM, pH 8) y DDM al 0.015%. Tras lavar con 5 mL de tampon, el complejo fue eluido con 30 mL de un gradiente lineal de NaCl (0-500 mM) a un flujo de $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La fracción dimérica fue recogida y concentrada mediante cromatografía de filtración en gel (GPC) (columna Superose-6, GE Healthcare). Dicha fracción fue congelada y guardada en pequeñas alícuotas para su investigación estructural.

5.3.2 Aplicación de patrones y muestra en HPTLC

La extracción de los lípidos se hizo a partir de 800 μL de dímeros de RC-LH1-PufX obtenidos de la columna anteriormente mencionada ($1\text{-}1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), o bien 100 μL de membranas ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) diluidos con 700 μL de agua. Se añadieron 3 mL de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1, v/v) en tubos previamente enjuagados en CHCl_3 y utilizando pipetas Pasteur también enjuagadas en CHCl_3 , a fin de eliminar trazas de ácidos grasos en el material de vidrio. El tubo fue agitado con el vórtex 10 min. Se añadió 1 mL de CHCl_3 (vórtex 30 s) y 1 mL de NaCl al 0.9%. Los tubos se agitaron 10 min y luego centrifugados (5 min, $4.0 \cdot 10^3 \text{ rpm}$, 4 °C). Se recuperó la fase orgánica (inferior). La fase acuosa se extrajo de nuevo dos veces con 1 mL de CHCl_3 . Tras reunir las fases orgánicas, éstas fueron evaporadas bajo flujo de N_2 . Los lípidos fueron entonces redissueltos en un volumen entre 650-850 μL de DCM-MeOH (1:1,

v/v) para su aplicación en la placa cromatográfica con el aplicador de muestra ATS4.

Utilizando el sistema ATS4, se aplicaron por duplicado varias muestras de membranas y complejo (5 μL /banda) en placas HPTLC de sílica gel 20x10 cm en forma de bandas de 4 mm. Cuatro de las calles iniciales por duplicado se reservaron para la aplicación de los patrones PL (2.0 μg /banda) pertenecientes a las cuatro familias de fosfolípidos investigadas (fosfatidilcolinas PC, fosfatidiletanolaminas PE, cardiolipinas CL y fosfatidilglicerol PG) (**Figura 5.5**).

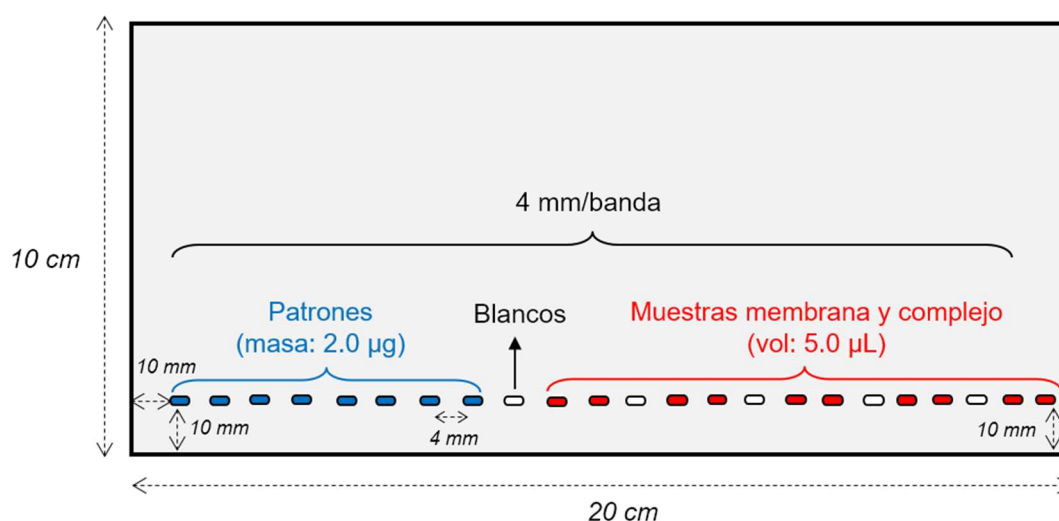


Figura 5.5 Aplicación de patrones y muestras (membrana y complejo) en la placa de sílica gel.

5.3.3 Desarrollo cromatográfico AMD

Los diferentes gradientes AMD estudiados para separar las bandas correspondientes a las cuatro clases de PL mencionadas se describen en las **Tablas A1.2 (Anexo A1)**. Se seleccionó de entre ellos un gradiente que permite: una adecuada separación de los PL; proporciona un medio sodiado que posibilita una ionización ESI positiva; y facilita un buen acoplamiento con la técnica de MS utilizada. Sin embargo, como veremos más adelante, estas condiciones de gradiente que permiten unas condiciones adecuadas para una

inspección general de todas las clases de fosfolípidos, deben ser modificadas si se pretende una caracterización ulterior de las cardiolipinas.

Así pues, se seleccionó un gradiente general en 7 etapas basado en el uso de MeOH-AcOEt-H₂O con preacondicionamiento ácido (HAc 1N) previo de la placa (**Figura 5.6**). Las bandas fueron detectadas por densitometría UV a 190 nm y por videodensitometría a 366 nm (**Figura 5.7 A-B**). Las respectivas zonas de interés para cada familia de PL se pueden seleccionar mediante la interfaz portátil TLC-MS, que está basada en extracción automatizada y elución. De este modo, la banda seleccionada es transferida directamente en cuestión de segundos a un equipo tándem MS de trampa de iones. Así, utilizando las distancias de migración (md) de los patrones de PL, se perforaron las zonas correspondientes de la placa utilizando el cabezal oval (4x2 mm) del pistón de la interfaz. Dado que existe un ligero efecto de matriz, se llevó a cabo una verificación de los límites de elución para cada clase de PL. Las zonas escogidas de la placa fueron: PC (11-13 mm), PE (29-34 mm), CL (39-41 mm) y PG (45-49 mm).

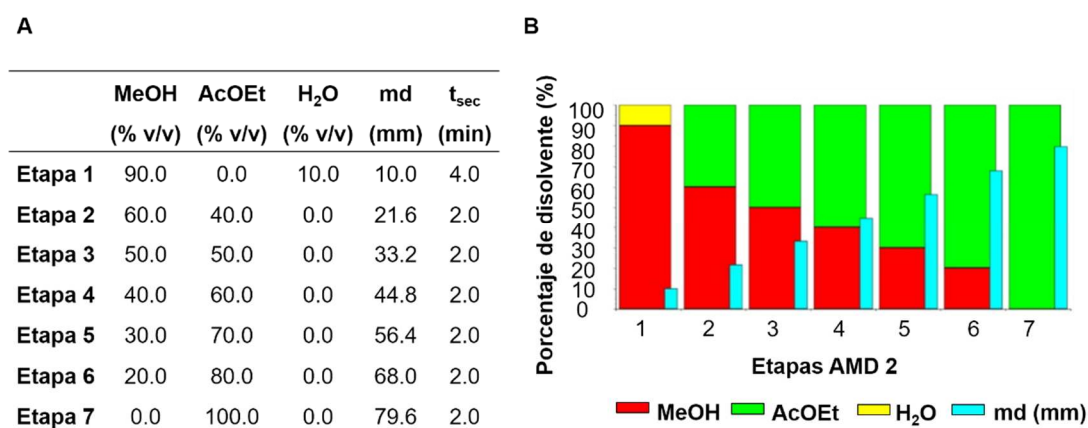


Figura 5.6 A) Tabla del gradiente de elución en siete etapas, basado en mezclas ternarias de MeOH-AcOEt-H₂O, para separación de fosfolípidos en muestras de bacterias púrpuras de membranas fotosintéticas. **B)** Representación de las condiciones de gradiente de elución: MeOH ■, AcOEt ■, H₂O ■, md ■.

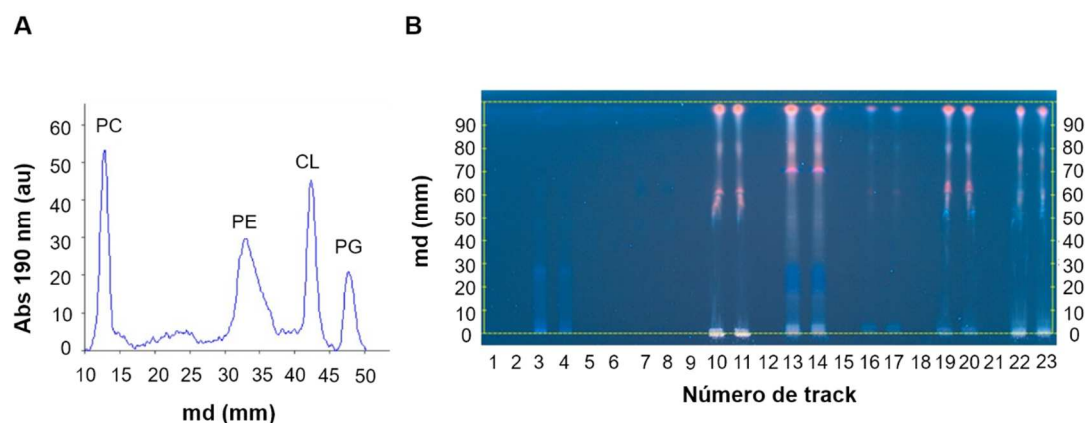


Figura 5.7 A) Separación HPTLC (AMD) de los patrones PC, PE, CL y PG, a 190 nm. **B)** Imagen UV de videodensitometría a 366 nm de PC (calles 1,2); PE (3,4); CL (5,6); PG (7,8); blanco (9); *Rb. blasticus* (10,11); blanco (12); *Rd. rubrum* (13,14); blanco (15); *Rbc. bogoriensis A* (16,17); blanco (18); *Rbc. bogoriensis B* (19,20); blanco (21), complejo RC-LH1-PufX obtenido de *Rbc. bogoriensis* (22,23).

5.3.4 Los patrones de las clases de PL y su análisis por HPTLC-MS

Los patrones (Sigma-Aldrich) provienen de fuentes naturales. Patrón PC: 1,2-diacyl-*sn*-glicero-fosfocolina, de clara de huevo, (pureza $\geq 99\%$) con presencia de ácidos palmítico, oleico, linoleico y esteárico. Patrón PE: L- α -fosfatidiletanolamina, de clara de huevo, (pureza $\geq 97\%$). Patrón PG: sal de sodio de L- α -fosfatidilglicerol, de lecitina de clara de huevo, (pureza $\geq 99\%$). Patrón CL: sal de sodio de cardiolipina, 1,3-bis(*sn*-3'-fosfatidil)-*sn*-glicerol, de corazón bovino, con composición en ácidos poliinsaturados, en especial, ácido linoleico.

Los propios patrones fueron problemas analíticos en sí mismos, ya que sus especificaciones no detallaban su composición en ácidos grasos. Así pues, sus fosfolípidos fueron identificados, al igual que las muestras problemas, por la técnica HPTLC-MS aquí desarrollada.

Es preciso mencionar primero que, para una clase dada de PL, la notación adoptada aquí para la identidad de las especies moleculares es (x:y), donde "x" es el número total de carbonos de las cadenas de ácido graso de la molécula, e "y" corresponde al número total de dobles enlaces.

Los espectros ESI-MS (en modo positivo) de los patrones PC y CL mostraron aductos de sodio $[M+Na]^+$ y $[M-2H+3Na]^+$, respectivamente, cuando se obtuvieron directamente a partir de la placa de sílica gel (utilizando el gradiente AMD seleccionado). Los aductos sodiados son formados conforme a lo descrito en la bibliografía [169]. Dichos aductos pudieron ser fragmentados usando tándem MS.

La caracterización del patrón PC corresponde a una mezcla de PC(34:1) que es mayoritario y PC(36:1). El sodio permaneció como carga de los fragmentos, lo cual, como se verá más adelante, permitirá identificaciones estructurales, tanto en el patrón correspondiente como en las membranas, mediante los iones producto (MS/MS) (**Figura 5.8 A-B**).

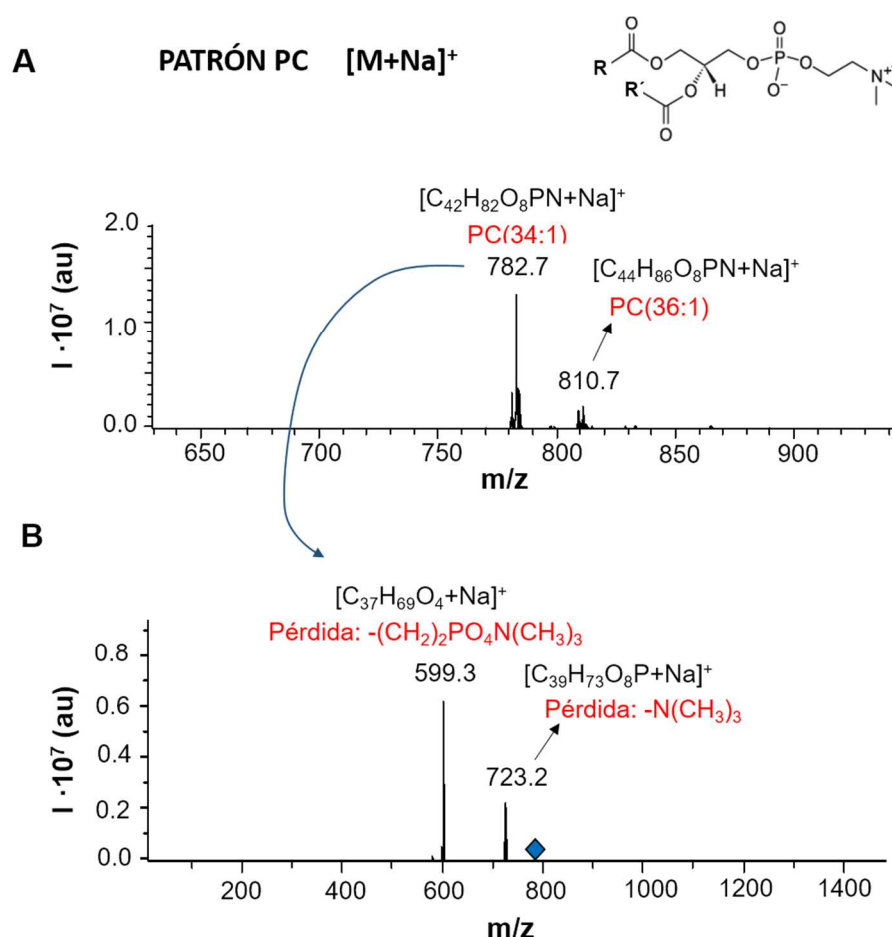


Figura 5.8 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) del patrón de PC (estructura molecular de PC en el extremo superior) y **B)** espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo positivo) del ion precursor a m/z 782.

La CL, con cuatro cadenas de ácidos grasos y dos grupos fosfato en su estructura, puede ser ionizada también mediante ESI⁻ (negativa) como $[M-2H]^{2-}$ [170]. El patrón corresponde mayoritariamente a CL(72:8) y más concretamente a CL[18:2/18:2/18:2/18:2] (**Sección 5.3.10**).

Los patrones PG y PE fueron ionizados preferiblemente en modo negativo. El patrón PG corresponde a un ion mayoritario $[M]^{-}$ de PG(34:1) y otro minoritario de PG(36:2) (**Figura 5.9 A**). El patrón PE ionizado como $[M-H]^{-}$, muestra una mezcla compleja de especies, de las cuales PE(36:2) es la mayoritaria (**Figura 5.9 B**).

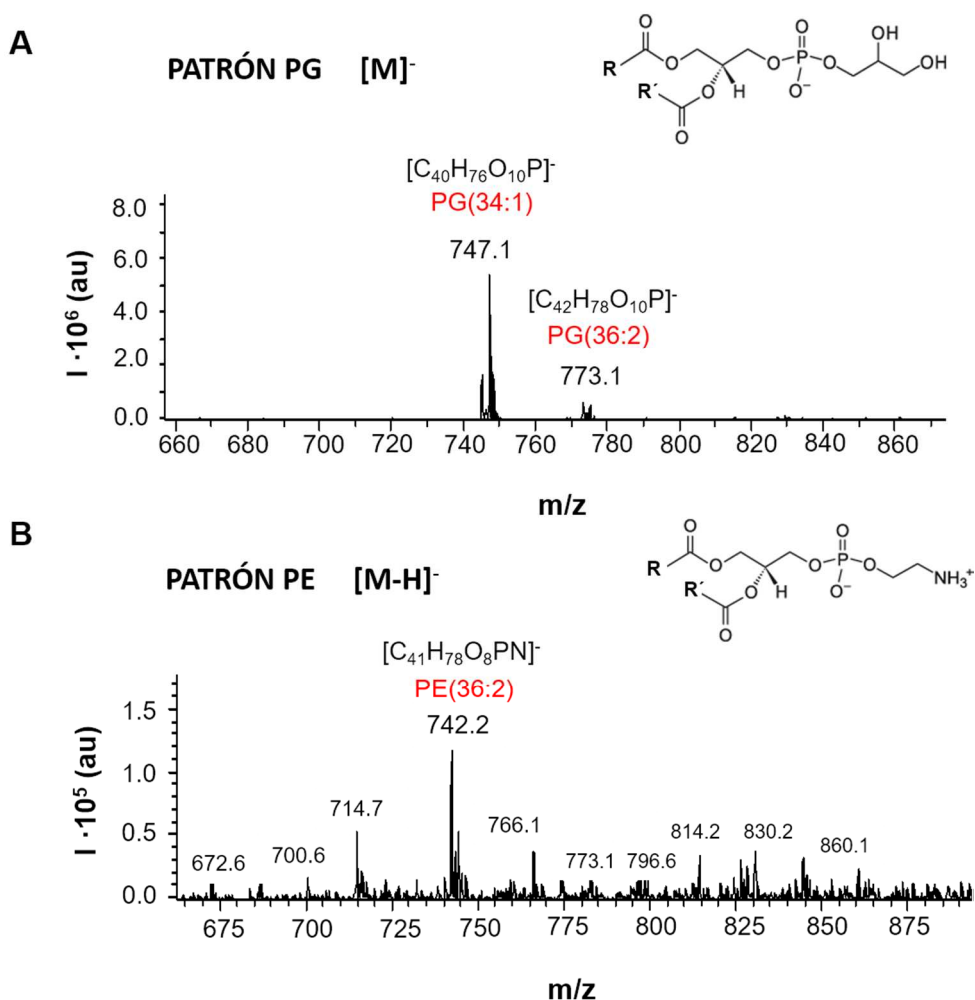


Figura 5.9 Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) de **A)** patrón PG (estructura molecular de PG en el extremo superior); **B)** patrón PE (estructura molecular de PE en el extremo superior).

Se utilizó el software de LIPID MAPS para cribar las especies a partir de los espectros ESI-MS. La identificación de las especies moleculares individuales de cada clase de PL se basa en la distancia de migración cromatográfica, el espectro ESI-MS correspondiente y el análisis de iones producto por MS/MS, así como en algunos casos mediante espectros de HRMS (alta resolución, masa con cuatro decimales), también obtenidos desde la placa.

Los espectros de los patrones PC (HPTLC-ESI⁺-MS) (**Figura 5.10**) y PG (HPTLC-ESI⁻-MS) (**Figura 5.11**) obtenidos entre julio de 2016 y abril de 2017 muestran una adecuada estabilidad en el tiempo y una correcta intensidad de los iones cuando se compara con una ionización en disolución.

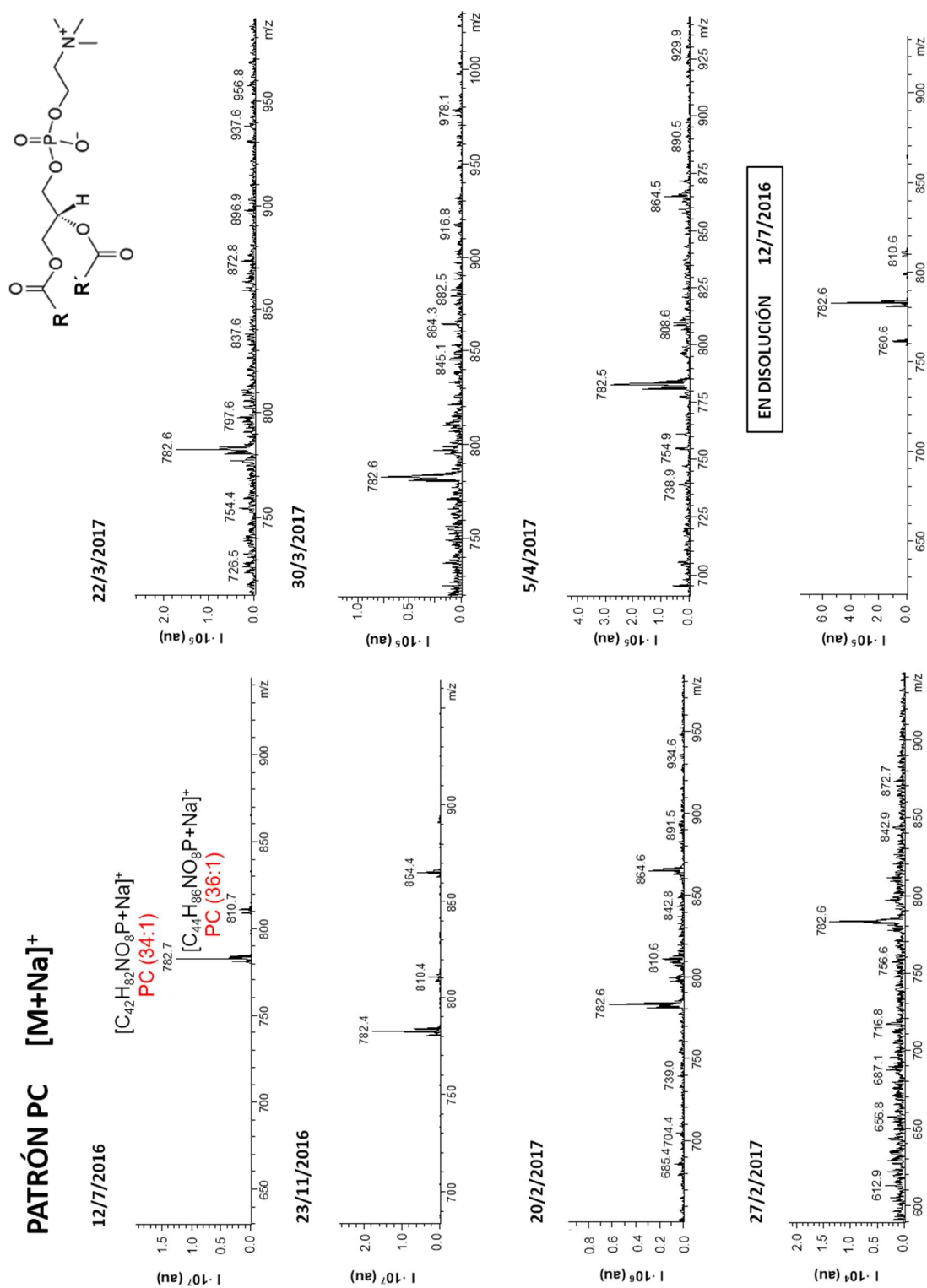


Figura 5.10 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) del patrón de PC obtenidos entre julio 2016 y abril 2017 (estructura molecular de PC en el extremo superior). Comparación placa-disolución.

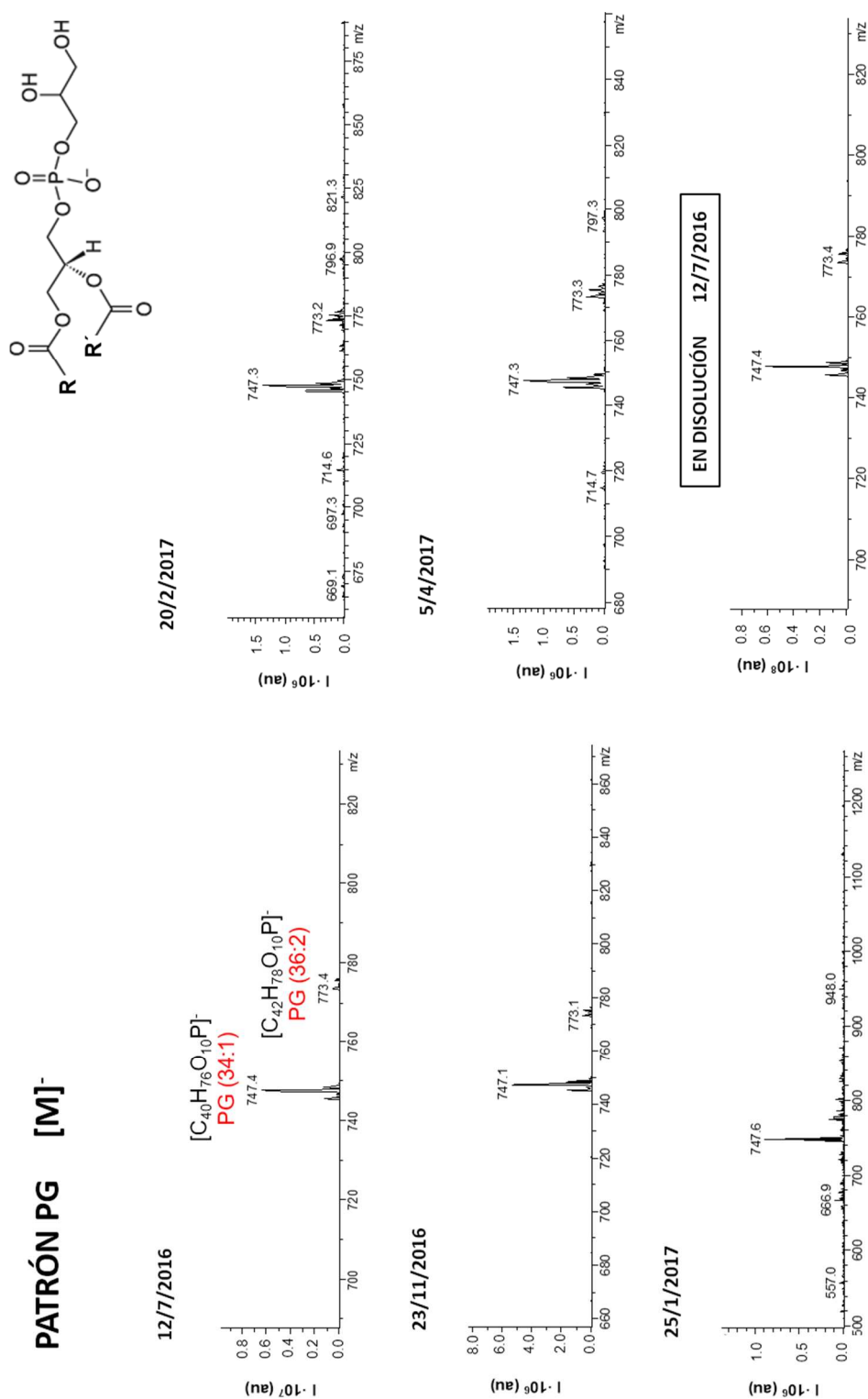


Figura 5.11 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) del patrón de PG obtenidos entre julio 2016 y abril 2017 (estructura molecular de PG en el extremo superior). Comparación placa-disolución.

5.3.5 Artefactos tipo “clúster”

Varios tipos de “clusters” sodiados de fondo fueron detectados durante los experimentos (corresponden a $\text{Na}^+(\text{CH}_3\text{-COONa})_{n1}$, $(\text{HCOONa})_{n2}$, (con $n1, n2 \geq 0$), y que pueden aparecer a intervalos de $m/z \Delta=82$, en el caso de acetato de sodio, y $m/z \Delta=68$, en el caso del formiato). La formación de dichos “clusters” puede estar favorecida por el preacondicionamiento de la placa con HAc, así como la ubicua presencia de Na^+ en las placas, necesaria para posibilitar una ionización positiva. Este fenómeno no sólo ocurre en los experimentos de HPTLC-MS, sino que también está descrito en el caso de experimentos llevados a cabo con LC-MS, como se puede ver en la bibliografía [171, 172].

Además de los “clusters de fondo”, también pueden formarse “clusters” a partir de los iones de la muestra, tales como $[\text{M}+\text{Na}]^+(\text{CH}_3\text{-COONa})/[\text{M}+\text{Na}]^+(\text{HCOONa})$, en el caso de la ionización positiva. La detección de estos “clusters” se ha cuidado especialmente en los experimentos expuestos en esta Memoria.

5.3.6 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de *Rhodobacter (Rb.) blasticus*

En lo referente a *Rb. blasticus*, se obtuvo el espectro HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) de las PC como $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**Figura 5.12 A**). Se encontraron mayoritariamente en esta membrana dos especies de PC. La especie preponderante corresponde a PC(36:2), lo cual está en concordancia con experimentos previos llevados a cabo mediante LC-MS por Barret [148]. Esta estructura puede ser probablemente la del 1,2-divaccenil-glicero-3-fosfocolina, preponderante en membranas de bacterias fotosintéticas [160]. El ácido vaccénico, (Z)-octadec-11-enoico, un ácido graso ω -7, ha sido considerado como uno de los ácidos grasos preponderantes en los PL de *Rd. rubrum*. El resto de iones obtenidos (**Figura 5.12 A**) corresponden a $[\text{M}+\text{Na}]^+(\text{CH}_3\text{-COONa})$ ó $[\text{M}+\text{Na}]^+(\text{HCOONa})$. Así el ion a m/z 864.4 corresponde al “clúster” de $\text{CH}_3\text{-COONa}$ de $[\text{PC}(34:1)+\text{Na}]^+$ ($m/z \Delta=82$). Los

iones a m/z 876.4 y 890.4 pueden ser atribuidos a “clusters” de HCOONa $[\text{PC}(36:2)+\text{Na}]^+$ ($m/z \Delta=68$) y de $\text{CH}_3\text{-COONa}$ de $[\text{PC}(36:2)+\text{Na}]^+$ ($m/z \Delta=82$), respectivamente.

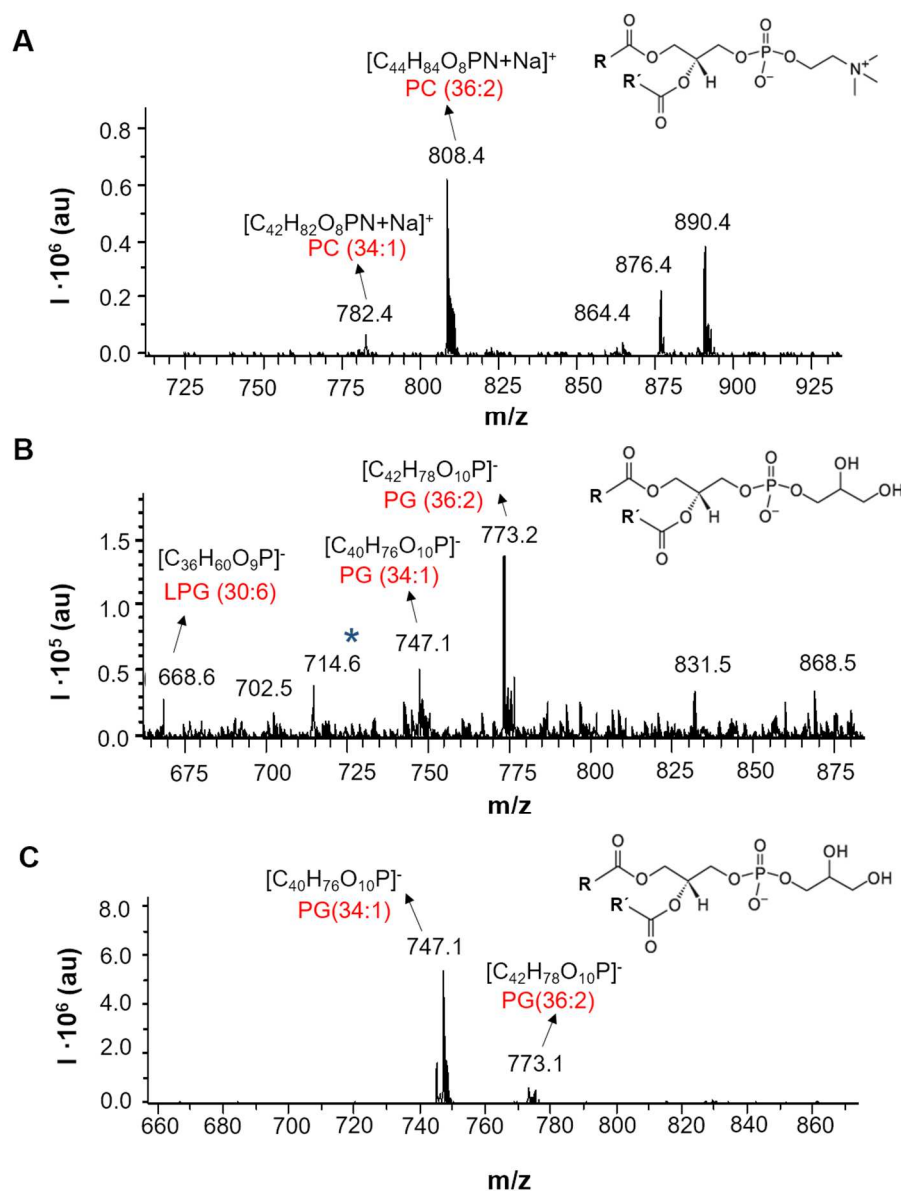


Figura 5.12 Espectro HPTLC-ESI-MS de extractos de membrana de *Rb. blasticus* con detalle de las especies moleculares encontradas: **A)** espectro ESI (en modo positivo) de la banda a md 12 mm (PC) (estructura molecular de PC en el extremo superior); **B)** espectro ESI (en modo negativo) de la banda a md 48 mm (PG) (*ion a m/z 714.6 corresponde a “clúster” de fondo de $\text{-CH}_3\text{COONa}$ que proviene probablemente del preacondicionamiento de la placa con HAc). Las atribuciones a cada ion se detallan en la Memoria (estructura molecular de PG en el extremo superior); **C)** espectro ESI (en modo negativo) del patrón PG a md 48 mm (estructura molecular de PG en el extremo superior).

A continuación, se obtuvo el espectro HPTLC-ESI⁻-MS de las especies moleculares de PG encontradas en los extractos de membrana de *Rb. blasticus*, ionizadas como [M]⁻ (**Figura 5.12 B**). Las especies moleculares más intensas son: PG(36:2) (ya detectada en los experimentos previos LC-MS mencionados anteriormente [148]) y PG(34:1). Estos compuestos tienen la misma composición de cadenas que los encontrados en el patrón de PG (**Figura 5.12 C**). Otros iones probablemente correspondientes a PG(31:3, 40:1; 43:4) fueron detectados con bajas intensidades en *Rb. blasticus* (a m/z 702.5, 831.5 y 868.5 respectivamente), así como una probable estructura de lyso-PG(30:6) (a m/z 668.6).

La ionización negativa de PE fue difícil. La eficiencia de ionización de las especies PE como aductos protonados y/o sodiados es más baja que la de las especies PC, ya que la amina cuaternaria de las especies PC con carga positiva es mucho más estable que la amina primaria de las especies PE [5, p.180]. Se obtuvieron señales de baja intensidad correspondientes a iones de PE en *Rb. blasticus*. Dichas señales fueron del mismo orden de magnitud que las de los “clusters” de fondo de acetato sódico.

5.3.7 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de *Rhodospirillum (Rd.) rubrum*

En lo relativo al extracto de membrana de *Rd. rubrum*, se obtuvo el espectro HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) de las PE como [M-H]⁻ (**Figura 5.13 A**). En esta membrana se encontraron mayoritariamente dos especies de PE, junto con iones a m/z 714.3, 796.5 y 878.6 que corresponden a “clusters”. A modo de ejemplo de identificación de PE, se obtuvo el espectro HPTLC-ESI⁻-MS/MS a partir del aislamiento y fragmentación del ion precursor a m/z 742.2. El correspondiente ion producto a m/z 682.2 muestra una pérdida del grupo –OCH₂CH₂NH₃ (**Figura 5.13 B**). El precursor puede, por consiguiente, ser identificado como PE(36:2). Por su parte, PE(32:1) fue la especie ponderalmente más importante, con una cadena derivada de ácido palmitoleico (Δ -9-cis-hexadecénico, ácido graso ω -7 monoinsaturado) y otra de ácido palmítico (ácido hexadecanoico, saturado).

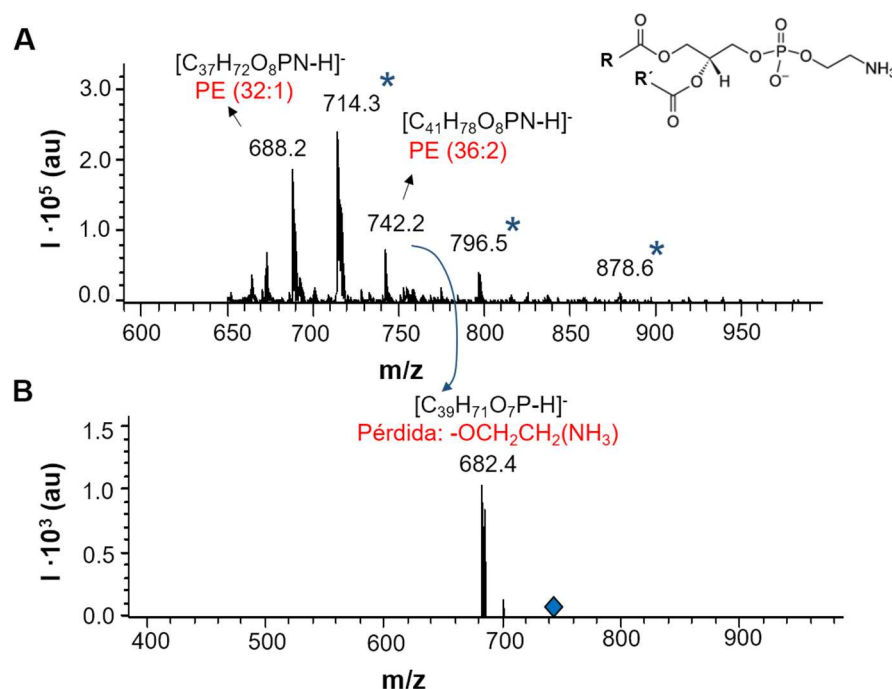


Figura 5.13 A) Espectro HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) de la banda a md 30 mm (PE) correspondiente al extracto de membrana de *Rd. rubrum* (estructura molecular de PC en el extremo superior) **B)** El ion a m/z 742 fue fragmentado para obtener el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo negativo) de este ion precursor. (*m/z 714.3, 796.5 y 878.6 corresponden a “clusters” de -CH₃COONa).

Respecto a PC, se encontraron diversas señales de baja intensidad, como [M+Na]⁺, correspondientes a varias especies de PC. La baja concentración/ausencia de especies preponderantes de PC en membranas de *Rd. rubrum* fue puesta de manifiesto por Russell y Harwood [160] y referencias allí encontradas.

En cuanto al PG no se llegaron a encontrar estructuras moleculares de esta especie en los extractos de membrana de *Rd. rubrum*.

5.3.8 Especies de PC, PG, PE en extractos de membrana de *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis* A, B, y en el complejo purificado

Varias especies moleculares de PC fueron detectadas en los extractos de membranas de *Rbc. bogoriensis* A y B, aunque como en el caso de *Rd. rubrum*, presentan bajas intensidades y son de la misma magnitud que el ruido producido por los “clusters” de fondo de sodio.

De modo similar, varias especies moleculares de PC fueron detectadas en baja concentración (a nivel de ruido) en *Rbc. bogoriensis* A. Sin embargo, los espectros ESI⁺-MS, tanto del extracto de membrana *Rbc. bogoriensis* B, como del complejo purificado, muestran claras, intensas y definidas especies de PC (**Figura 5.14 B-C**). La técnica permite evaluar diferencias entre las especies presentes en las membranas obtenidas en condiciones aerobias y anaerobias. PC(36:2) a m/z 808.6 es la especie preponderante en el extracto de *Rbc. bogoriensis* B. Otras especies de PC se encuentran en baja concentración. Entre ellas, iones a m/z 782.6 y 822.7, correspondientes a PC(34:1) y PC(37:2).

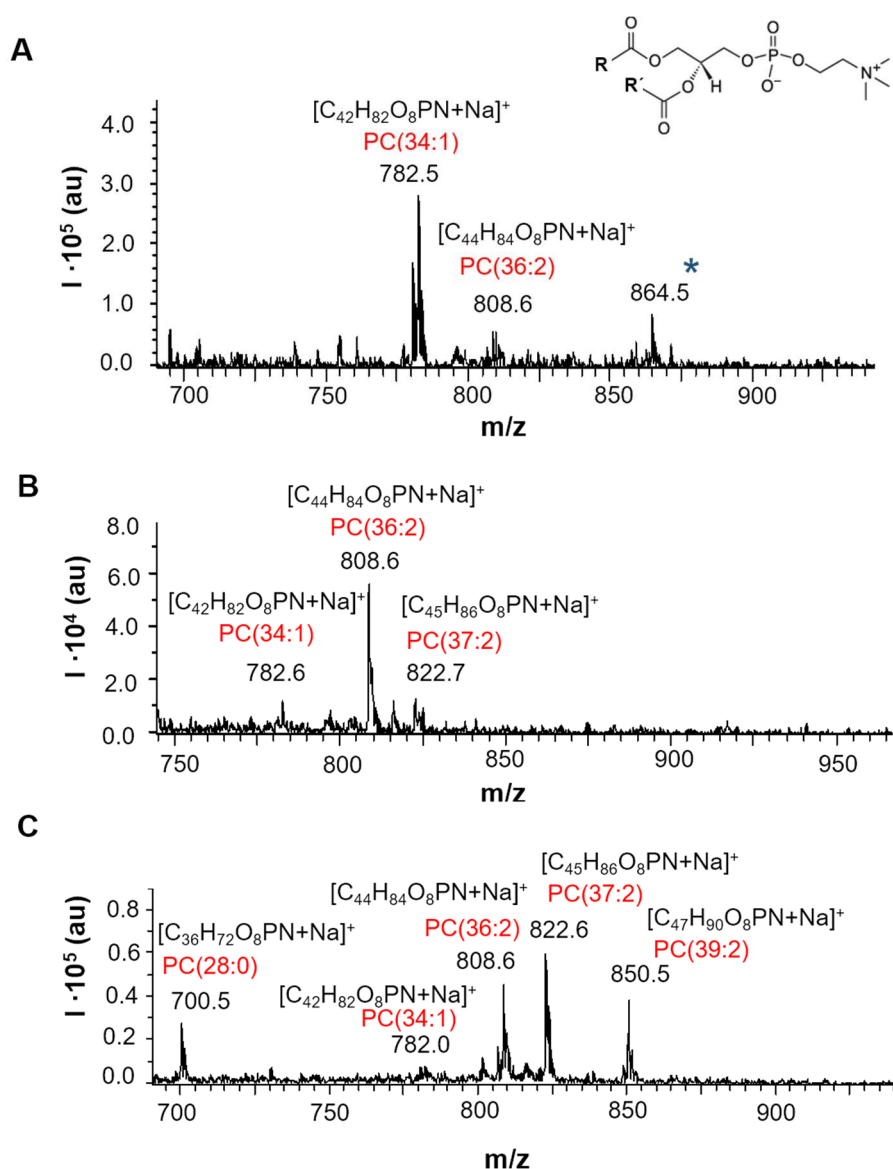


Figura 5.14 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) de especies moleculares de PC en **A)** Patrón (el ion a m/z 864.5 corresponde al “clúster” $[\text{PC}(36:2)+\text{Na}]^+\text{CH}_3\text{COONa}$) (estructura molecular de PC en el extremo superior); **B)** extracto de membranas de *Rbc. bogoriensis* B (condiciones anaerobias); **C)** complejo RC-LH1-PufX purificado a partir de *Rbc. bogoriensis*.

El complejo purificado muestra un espectro $\text{ESI}^+\text{-MS}$ (**Figura 5.14 C**) con iones correspondientes a especies de PC y preponderantes a m/z 822.6 $[\text{PC}(37:2)]$, 808.6 $[\text{PC}(36:2)]$, 850.5 $[\text{PC}(39:2)]$, 700.5 $[\text{PC}(28:0)]$. El ion a m/z 782 $[\text{PC}(34:1)]$ presenta muy baja intensidad.

Las especies PG mostraron una buena ionización en modo negativo. Se obtuvo el espectro ESI-MS (en modo negativo) del patrón PG, con un ion intenso a m/z 747.3 correspondiente a $\text{PG}(34:1)$, y un ion de baja intensidad a m/z 773.3 de $\text{PG}(36:2)$ (**Figura 5.15 A**). Al igual que en el caso de PC, se encontraron varios iones de baja intensidad ($0.5\text{-}1 \times 10^5$) correspondientes a especies PG en *Rbc. bogoriensis* A y B, entre el ruido de los “clusters” sodiados. No existen especies predominantes. En cambio el complejo purificado (**Figura 5.15 B**) muestra señales intensas debidas a especies moleculares de PG, siendo la más prominente $\text{PG}(36:2)$. Otras especies con menor intensidad fueron $\text{PG}(34:4)$ y $\text{PG}(33:4)$.

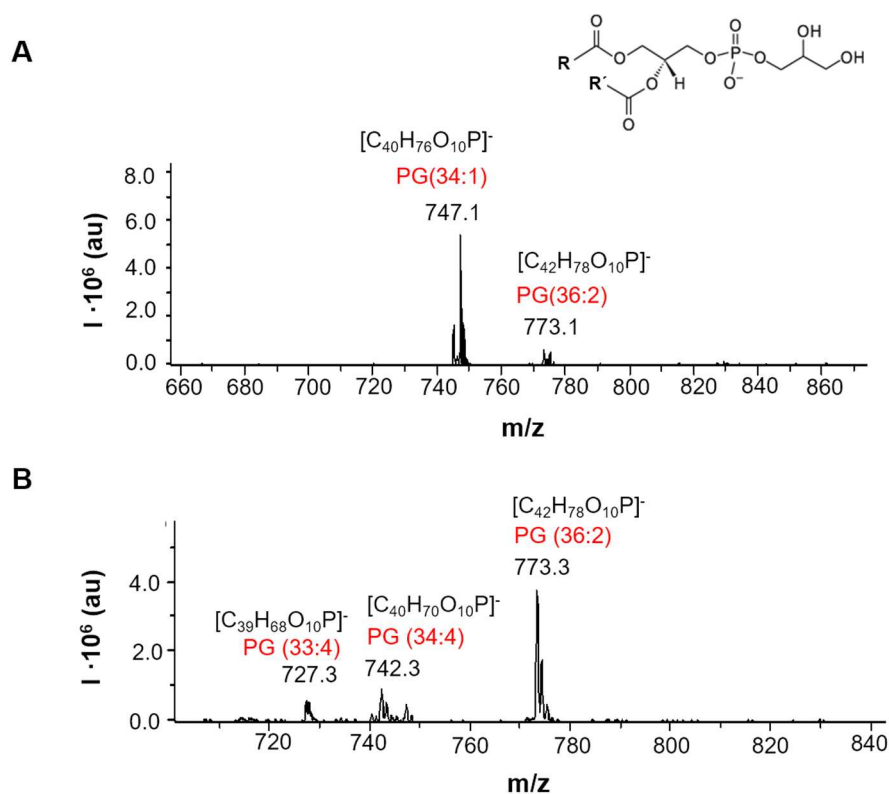


Figura 5.15 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) de especies moleculares de PG en **A)** Patrón (estructura molecular de PG en el extremo superior); **B)** complejo RC-LH1-PufX purificado a partir de *Rbc. bogoriensis*.

En cuanto al PE no se llegaron a encontrar estructuras moleculares de esta especie en los extractos de membrana de *Rbc. bogoriensis* A, B, ni en el complejo purificado.

A modo de resumen, se presentan en la **Tabla 5.1** las especies moleculares de PC, PG y PE identificadas en este trabajo.

<i>Rb. blasticus</i>				
	m/z	Especies moleculares	Formas de ionización	Fórmula molecular
PC	808.4	(36:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.4	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
PG	773.2	(36:2)	[M] ⁻	[C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P] ⁻
	747.1	(34:1)		[C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P] ⁻
	668.6	Liso-PG (30:6)		[C ₃₆ H ₆₀ O ₉ P] ⁻

<i>Rd. rubrum</i>				
	m/z	Especies moleculares	Formas de ionización	Fórmula molecular
PE	742.2	(36:2)	[M-H] ⁻	[C ₄₁ H ₇₈ O ₈ PN-H] ⁻
	688.2	(32:1)		[C ₃₇ H ₇₂ O ₈ PN-H] ⁻

<i>Rbc. bogoriensis A</i>				
	m/z	Especies moleculares	Formas de ionización	Fórmula molecular
No hay especies identificadas				

<i>Rbc. bogoriensis B</i>				
	m/z	Especies moleculares	Formas de ionización	Fórmula molecular
PC	808.6	(36:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.6	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
	822.7	(37:2)		[C ₄₅ H ₈₆ O ₈ PN+Na] ⁺

Complejo RC-LH1-PufX				
	m/z	Especies moleculares	Formas de ionización	Fórmula molecular
PC	822.6	(37:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₅ H ₈₆ O ₈ PN+Na] ⁺
	808.6	(36:2)		[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	850.5	(39:2)		[C ₄₇ H ₉₀ O ₈ PN+Na] ⁺
	700.5	(28:0)		[C ₃₆ H ₇₂ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.0	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
PG	773.3	(36:2)	[M] ⁻	[C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P] ⁻
	742.3	(34:4)		[C ₄₀ H ₇₀ O ₁₀ P] ⁻
	727.3	(33:4)		[C ₃₉ H ₆₈ O ₁₀ P] ⁻

Tabla 5.1 Resumen de las especies moleculares de PC, PG y PE identificadas.

5.3.9 Cadenas impares de ácidos grasos en PL

En principio, podría resultar sorprendente la presencia de alguna cadena impar de ácido graso [PC(37:2), PC(39:2)] en el extracto de membrana de *Rbc. bogoriensis* B (condiciones fotosintéticas) y en su complejo dimérico purificado. Sin embargo, la presencia de cadenas impares ya ha sido descrita en dos casos en bacterias púrpuras no sulfurosas. Así, los PL de una cepa de *Rhodopseudomonas acidophila* mostraron una composición inusual en las cadenas de ácidos grasos, con la presencia de 17:1 (20%) y 19:1 (9%) en condiciones aerobias, y aproximadamente un 2% para ambas cadenas en condiciones anaerobias [173]. También, varios autores han encontrado cadenas saturadas impares (17:0, 19:0) de CL en la cepa R26 de *Rhodobacter (R.) sphaeroides*, que no contiene pigmentos carotenoides. La función de dichas cadenas impares podría estar relacionada con el incremento de la fluidez de las membranas [19, 165-167].

Fuera del campo de las bacterias fotosintéticas, hay que reseñar que desde hace tiempo se vienen consignando en la literatura la presencia de cadenas de ácidos grasos impares en diferentes organismos de los reinos de las plantas, animal y microbiano [174]; tanto en el caso de ácidos grasos libres [175] como de PL (poli) insaturados [176]. Esto también se ha descrito en el hombre, por ejemplo en el suero humano [175, 177].

5.3.10 Especies de CL en extractos de membrana y en el complejo purificado

Esta investigación presenta varias dificultades. Por un lado, los espectros MS de las especies de CL son sumamente complejos y la ionización difícil. Por otro lado, la base de datos LIPID MAPS no contiene muchos lípidos de bacterias. Además, solo están comercialmente disponibles patrones CL con cadenas acilo muy concretas (C18:2), lo que hace que la caracterización de especies CL en bases de datos se lleve a cabo a partir de los espectros completos de las muestras biológicas que se van estudiando [5, capítulo 5].

No se observaron especies de CL en los extractos de membrana de *Rd. rubrum* ni en los de *Rbc. bogoriensis* y tampoco en su complejo purificado. Sin embargo, presentamos aquí los resultados obtenidos que, si bien no son concluyentes, permiten lanzar una hipótesis, a confirmar en un futuro, acerca de la presencia de CL en la membrana de *Rb. blasticus*.

5.3.10.1 Modos de ionización de CL

El esquema de fragmentación de un lípido particular depende de la cinética de su reacción de descomposición, así como de la termodinámica de los iones producto resultantes. En otras palabras, las propiedades químicas determinan la fragmentación. Sin embargo, la aparición de un determinado ión-producto tras disociación inducida por colisión (CID) puede variar drásticamente. La variación del espectro depende de la energía cinética del ion precursor y del número de colisiones tanto del ion precursor como de los iones resultantes.

En general, los iones detectados a partir de patrones sintéticos CL pueden ser encontrados en los iones producto de las CL naturales. Sin embargo, las intensidades pueden variar de muestra a muestra.

La CL es una clase de PL aniónico que contiene dos grupos fosfodiéster en cada molécula (**Figura 5.4 D**). Las especies de CL forman aniones mono y di-cargados en ESI-MS (en modo negativo). En la mayoría de los casos, el ion $[M-2H]^{2-}$ es más abundante que $[M-H]^-$. En ESI⁺-MS, la CL puede formar aductos de sodio, $[M+Na]^+$ y $[M-2H+3Na]^+$ en disolución [169, 170].

A fin de verificar la fragmentación en ambos modos, y tanto en disolución como directamente desde la placa cromatográfica de sílica gel, utilizamos en nuestro trabajo el patrón comercial de CL anteriormente descrito (**Sección 5.3.4**).

5.3.10.2 ESI-MS negativo

1) Viabilidad de la ionización negativa de CL patrón en la placa

La ionización ha sido idéntica en la placa cromatográfica y en disolución, mostrando el patrón un ion a m/z 723.4 correspondiente a $[M-2H]^{2-}$, que corresponde a CL(72:8) y más concretamente a CL(18:2/18:2/18:2/18:2), característico [170, 178]. La repetibilidad del ensayo en placa fue evaluada satisfactoriamente (**Figura 5.16 A-B**).

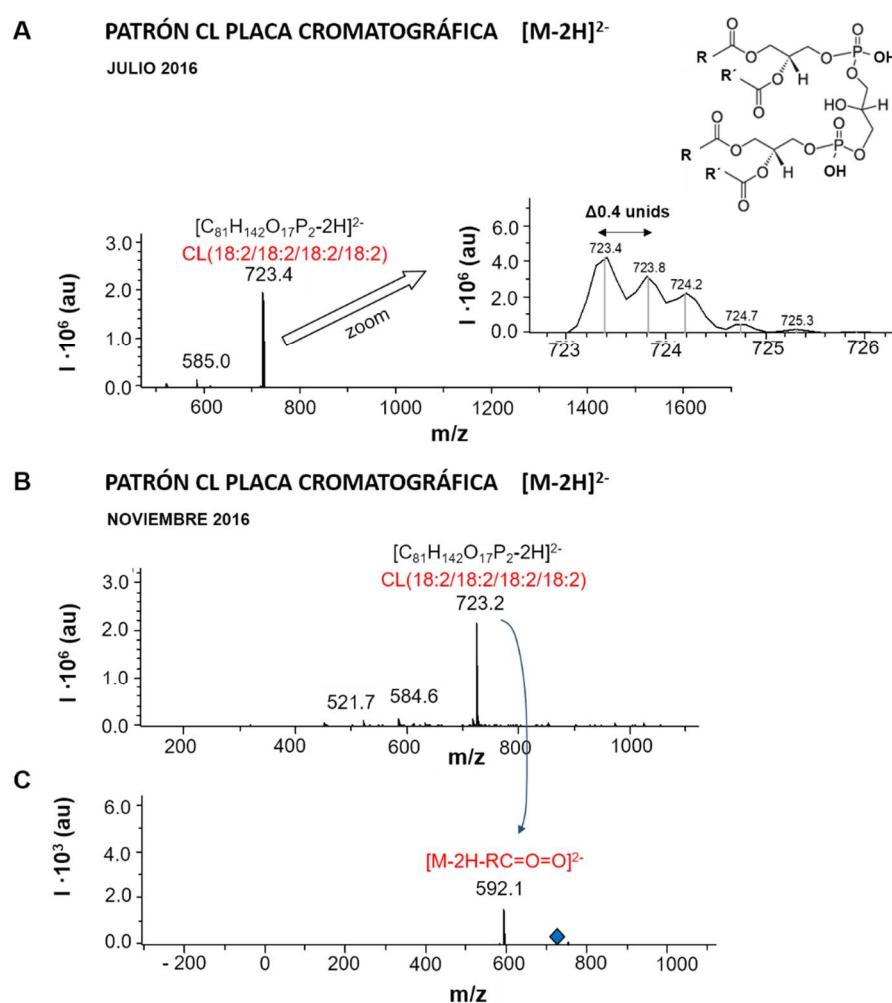


Figura 5.16 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo negativo) de especies moleculares de CL en **A**) Patrón en placa cromatográfica (Julio 2016) con detalle del desdoblamiento del pico más intenso a m/z 723.4 (estructura molecular de CL en el extremo superior); **B**) Patrón en placa cromatográfica (Noviembre 2016); **C**) El ion a m/z 723.2 fue fragmentado para obtener el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo negativo) de este ion precursor.

Asimismo, el espectro MS/MS obtenido a partir del ion a m/z 723.4 (**Figura 5.16 C**) proporcionó un ion producto a m/z 592.1, asignado a una estructura $[M-2H-RC=O=O]^{2-}$, que está de acuerdo con la bibliografía antes citada obtenida en disolución, y con la idea de que el ion $[M-2H]^{2-}$ es un precursor básico que sufre más fácilmente una pérdida del grupo ceténico que de algún grupo ácido graso [5].

2) No se produce oxidación de CL en la placa

A modo de curiosidad, en una muestra de CL patrón en disolución (en MeOH) que se dejó varios días a temperatura ambiente, se detectaron varios productos de oxidación (**Figura 5.17**), que pueden ser asignados a las estructuras descritas por E. Maciel [178]. Toda su tesis doctoral fue dedicada a la ionización negativa de CL. Esta investigadora obtuvo los iones de la figura tras oxidación de CL en disolución en condiciones drásticas ($H_2O_2/FeCl_2$).

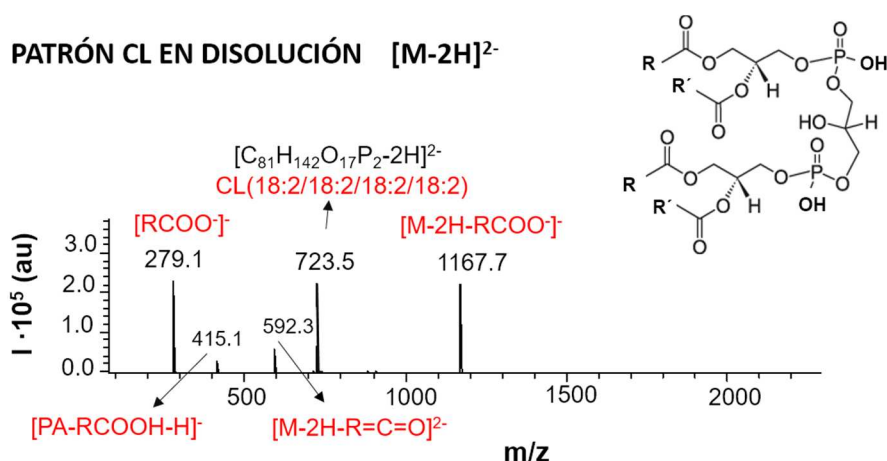


Figura 5.17 Espectro ESI-MS (en modo negativo) de especies moleculares de CL en patrón en disolución oxidado a temperatura ambiente (estructura molecular de CL en el extremo superior).

Nosotros ponemos aquí de manifiesto que una oxidación en el disolvente a temperatura ambiente produce los mismos productos (**Figura 5.17**):

- El ion a m/z 1167 se forma por la pérdida del anión acilo del ácido graso.
- El ion doblemente cargado a m/z 592 se forma por la pérdida del anión acilo del ácido graso como grupo ceténico.

- El ion a m/z 279 se debe a aniones carboxilato.
- El ion a m/z 415 se debe a la pérdida de RCOOH a partir del ácido fosfatídico (PA) correspondiente.

Cuando se realizó una preparación fresca del patrón, no se observó oxidación ni en los espectros en disolución ni en los obtenidos desde la placa. Otra conclusión interesante es que el desarrollo cromatográfico en la placa tampoco produce oxidación (**Figura 5.16 A**).

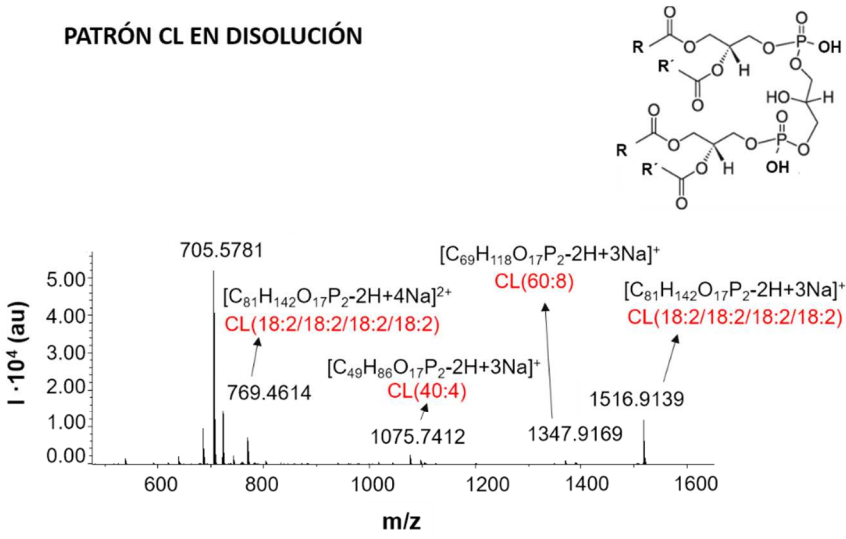
Tras mostrar la viabilidad de la obtención de espectros ESI-MS y MS/MS en modo negativo a partir de CL patrón, se intentó aplicar este modo de ionización a la muestra de *Rb. blasticus*. Sin embargo, los resultados fueron negativos. O bien la muestra no se ioniza correctamente en este modo, o bien no contiene CL.

De cara a una futura investigación sobre la posibilidad de la ionización negativa de las CL en las muestras, los experimentos deberían ser enfocados al desarrollo de una secuencia que no implicara un medio ácido y que fuera más compatible con una ionización en modo negativo.

5.3.10.3 ESI-MS positivo

Cuando se visualiza el espectro ESI⁺-HRMS (alta resolución, masa exacta) del patrón CL en disolución, se observa un espectro que da una idea de la complejidad del propio patrón y de la dificultad de la asignación de estructuras a los fragmentos iónicos (**Figura 5.18 A**). El ion a m/z 1516.9139, que no es el más intenso, corresponde a CL[C₈₁H₁₄₂O₁₇P₂-2H+3Na]⁺, y concuerda con la estructura mayoritaria en el patrón CL[(18:2)₄]. El error estimado con la estructura teórica es de 8.2 ppm (**Tabla 5.2**). El desdoblamiento del pico es característico de las estructuras CL (**Figura 5.18 B**). La estructura es, además, coherente con la fragmentación propuesta por Hsu y Turk [169] que es aceptada como la más completa y fiable para las especies CL.

A **PATRÓN CL EN DISOLUCIÓN**



B

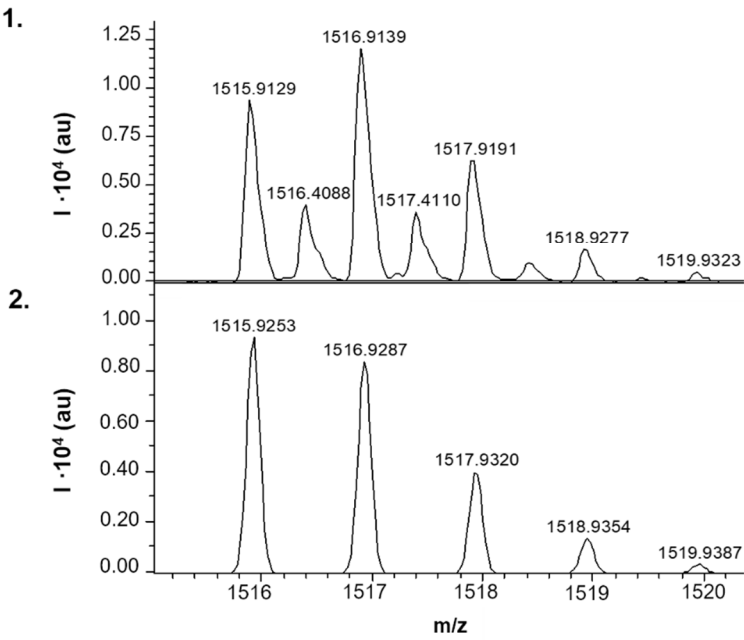


Figura 5.18 Espectro ESI-HRMS (en modo positivo) de **A)** especies moleculares presentes en CL patrón en disolución (estructura molecular de CL en el extremo superior); **B) 1.** Detalle del pico a m/z 1516.9139 observando su desdoblamiento; **2.** Datos teóricos del pico más intenso a m/z 1515.9253 de CL.

m/z medida	Fórmula molecular	m/z teórica	Error [mDa]	Error [ppm]
1515.9129	$[C_{81}H_{142}O_{17}P_2-2H+3Na]^+$	1515.9253	12.4	8.2
769.4614	$[C_{81}H_{142}O_{17}P_2-2H+4Na]^{2+}$	769.4573	4.1	5.4

Tabla 5.2 Valores de m/z medida, fórmula molecular, m/z teórica y error calculado (en valor absoluto) en CL patrón en disolución.

En la zona del espectro HRMS con $m/z > 1000$, el patrón presenta varios iones, alguno de los cuales no ha podido ser asignado. Dos de dichos iones, obtenidos en bajas intensidades, nos interesan porque también han sido encontrados en los espectros obtenidos en placa, tanto a partir del patrón como a partir de la muestra de *Rb. blasticus* (**Figura 5.19 A-B**). Uno de ellos, a m/z 1347.9169, podría corresponder a una estructura CL(60:8), esto es, $\text{CL}[\text{C}_{69}\text{H}_{118}\text{O}_{17}\text{P}_2\text{-2H+3Na}]^+$. El otro ion, a m/z 1075.7412, podría corresponder a una estructura CL[40:4], esto es, $\text{CL}[\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_{17}\text{P}_2\text{-2H+3Na}]^+$.

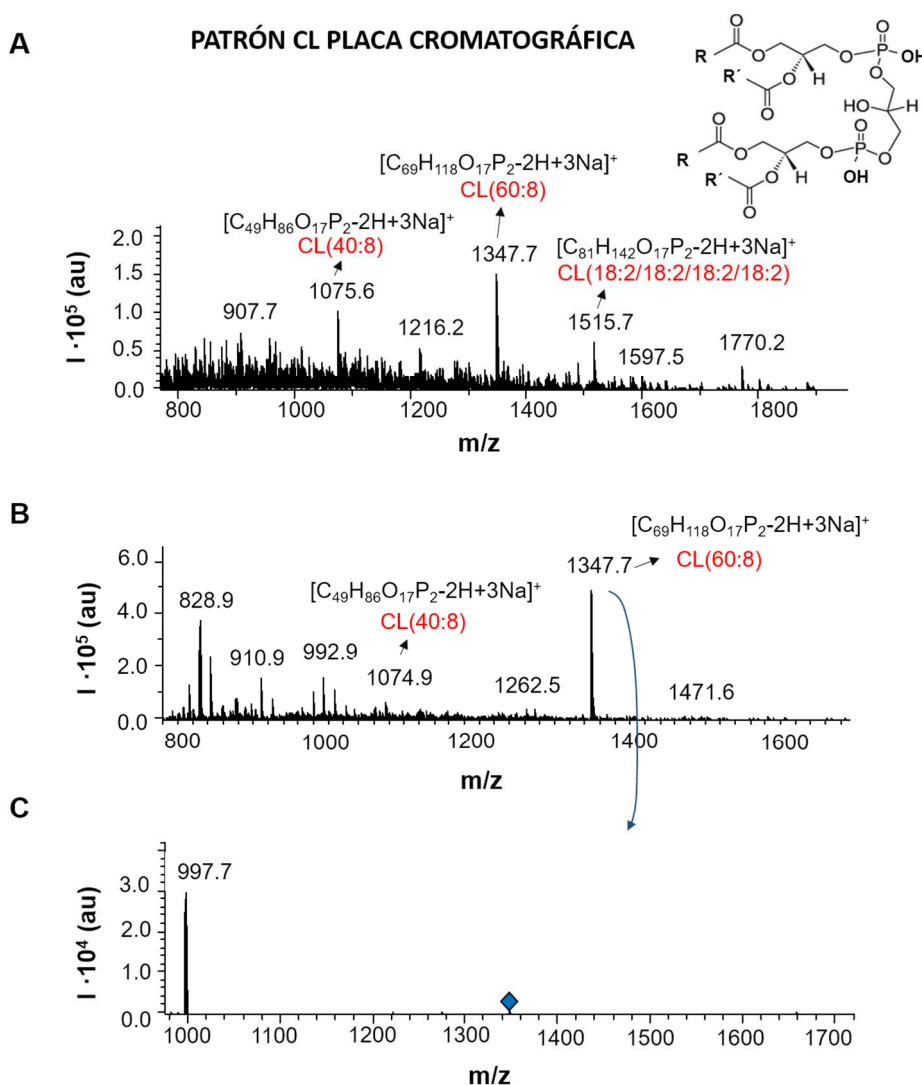


Figura 5.19 Espectros HPTLC-ESI-MS (en modo positivo) de especies moleculares de CL en **A)** Patrón en placa cromatográfica (estructura molecular de CL en el extremo superior); **B)** Extracto de membranas de *Rb. blasticus*; **C)** El ion a m/z 1347.7 en el extracto de membranas de *Rb. blasticus* fue fragmentado para obtener el espectro HPTLC-ESI-MS/MS (en modo positivo) de este ion precursor.

Siguiendo con el espectro del patrón en disolución (ESI^+), existe un ion de baja intensidad a m/z 769.4614 que podría corresponder a una fragmentación $[\text{M}-2\text{H}+4\text{Na}]^{2+}$, siendo M la especie del patrón $\text{CL}[(18:2)_4]$, y que viene avalada por el bajo error (<5 ppm) entre la masa estimada y la teórica (con 4 decimales) (**Tabla 5.2**).

Hay bastantes iones en el espectro ESI-MS (en modo positivo) del patrón CL, tanto por debajo de m/z 800 como en la zona de m/z 1347-1390, que no hemos encontrado descritos en la bibliografía ni podemos interpretar en el estado actual de la investigación. Esto incluye el ion más intenso a m/z 705.5781, que no concuerda con las estructuras presumiblemente presentes en el patrón de CL. Todo esto da una idea de la complejidad de la interpretación de las especies de CL (**Figura 5.18 A**).

Se obtuvo el espectro HPTLC- ESI^+ -MS de CL patrón a partir de la placa cromatográfica (**Figura 5.19 A**). El esquema de fragmentación corresponde al descrito por Hsu y Turk [169], es decir, $[\text{M}-2\text{H}+3\text{Na}]^+$. Entre las estructuras obtenidas se observa:

- El ion a m/z 1515.7 que corresponde a la estructura del patrón $\text{CL}(72:8)$, esto es, $\text{CL}[\text{C}_{81}\text{H}_{142}\text{O}_{17}\text{P}_2-2\text{H}+3\text{Na}]^+$.
- El ion a m/z 1347.7 que en este caso es la especie más intensa y que podría corresponder a $\text{CL}(60:8)$, $\text{CL}[\text{C}_{69}\text{H}_{118}\text{O}_{17}\text{P}_2-2\text{H}+3\text{Na}]^+$, como se ha visto anteriormente en el espectro HRMS del patrón en disolución, al igual que
- el ion a m/z 1075.6 probablemente debido a $\text{CL}(40:4)$, correspondiente a $\text{CL}[\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_{17}\text{P}_2-2\text{H}+3\text{Na}]^+$.

Hemos encontrado estos dos iones (m/z 1347.7 y 1074.9) en los espectros obtenidos a partir de una placa cromatográfica correspondiente a una muestra de *Rb. blasticus*, obtenida y separada en las condiciones descritas en este capítulo (**Figura 5.19 B**). Dichos iones se han obtenido en dos extracciones “on-line” diferentes efectuadas con la interfaz TLC-MS. En ambas, el ion a m/z 1347.7 ha sido el más intenso, al igual que en el caso del patrón.

Hay que recordar que, al ionizar en modo positivo, estos dos iones aparecían con baja intensidad en el espectro HR del patrón CL en disolución, lo que quiere decir que no se trata de un artefacto debido a la placa cromatográfica.

Ha sido posible aislar y fragmentar el ion a m/z 1347.7 para obtener el ion producto, esto es, su MS/MS a partir de la muestra de *Rb. blasticus* (**Figura 5.19 C**). El ion producto presenta un m/z 997.7. Sin embargo, dicha fragmentación no ha podido ser explicada.

Dado que ambos iones no parecen provenir de un artefacto debido a un “clúster” de los descritos anteriormente, ni de la propia placa cromatográfica, podemos sugerir en principio la hipótesis, que debería ser confirmada en el futuro, de que estas especies moleculares de CL se encuentran en la muestra de extracto de membrana de *Rb. blasticus*.

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS QUE
CONTIENEN COLINA EN LECHE
MATERNO-INFANTIL MEDIANTE
REACCIONES BASADAS EN LA
FLUORESCENCIA DE LAS FLAVOENZIMAS

6.1 INTRODUCCIÓN

6.1.1 Fosfolípidos que contienen colina

Los fosfolípidos (PL), como ya se ha comentado (**Capítulo 5**), son compuestos con gran importancia biológica. Éstos son los componentes principales de las membranas celulares, controlando la transferencia de sustancias entre el interior y el exterior de la célula. Asimismo, controlan el proceso de digestión (formando parte de la bilis), actuando como movilizador de lípidos, evitando la acumulación de grasas en el sistema cardiovascular.

Como se ha descrito en la **Sección 1.1 (Capítulo 1)**, la categoría de PL la componen los derivados de glicerol, en el que los grupos hidroxilo de los carbonos 1 y 2 están esterificados con ácidos grasos, y el alcohol restante lo hace con ácido fosfórico, para dar diacilglicerol-3-fosfato. El fosfato se une (mediante un enlace fosfodiéster) a otro grupo de átomos (colina, etanolamina o glicerol entre otros).

En realidad, son una mezcla de diferentes familias, siendo las especies mayoritarias en el plasma sanguíneo la de los fosfolípidos que contienen colina (Ch-PL) como base nitrogenada en su estructura [179]; entre ellas la fosfatidilcolina (PC) es una de las más interesantes [180, 181]. Ésta se caracteriza porque las cadenas hidrocarbonadas están formadas mayoritariamente por los ácidos palmítico (16:0) o esteárico (18:0) en la posición del carbono 1 y los insaturados de 18 carbonos oleico, linoleico o linolénico en la posición del carbono 2 [182].

Un subproducto de la PC (**Figura 6.1 A**) es el fosfato de colina (ChoP), también llamado fosforilcolina o fosfocolina, formado por la acción de la enzima fosfolipasa C (PLC) sobre la PC o por la degradación de esfingolípidos (SL) como la esfingomielina (SM) (**Figura 6.1 B**) también presente en el plasma, mediante la enzima esfingomielinasa [183, 184].

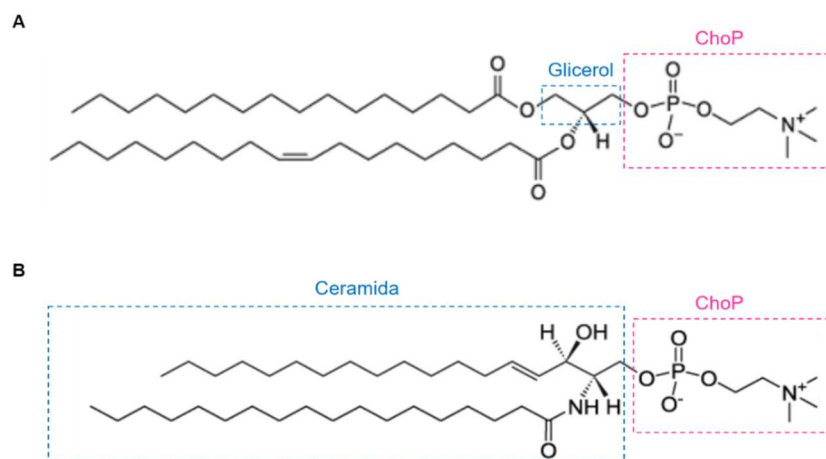


Figura 6.1 Estructura de: **A)** fosfatidilcolina (PC) y **B)** esfingomielina (SM).

En los últimos años, está habiendo un interés creciente en el ChoP. Éste se utiliza como recubrimiento de lentillas [185, 186] y, debido a su biocompatibilidad es la base de polímeros utilizados para la fabricación de stents coronarios [187-189] y de los stents liberadores de fármacos [190]. Además, el ChoP, como otros PL que contienen Ch es también un componente que se encuentra en muchos alimentos [191] (actuando como fuente de Ch para el cuerpo) especialmente en la leche. Ya que es un nutriente esencial para el desarrollo del cerebro [192], la Academia Americana de Pediatría (AAP), ha recomendado que las fórmulas infantiles contengan al menos 7 mg Ch/100 Kcal ($0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{Kcal}^{-1}$); como consecuencia, Ch, ChoP y otros PL se determinan generalmente en este tipo de muestra [193]. El contenido de Ch difiere según la fuente comercial. En general, el rango de valores de concentración total de Ch es de $31.1 \cdot 10^{-5}$ a $227.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ donde la Ch libre comprende el rango de $4.3 \cdot 10^{-5}$ a $72.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y el ChoP hasta $83.6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Por todo esto, se pone de manifiesto lo importante que es el disponer de métodos para cuantificar los Ch-PL, tanto PC como sus subproductos.

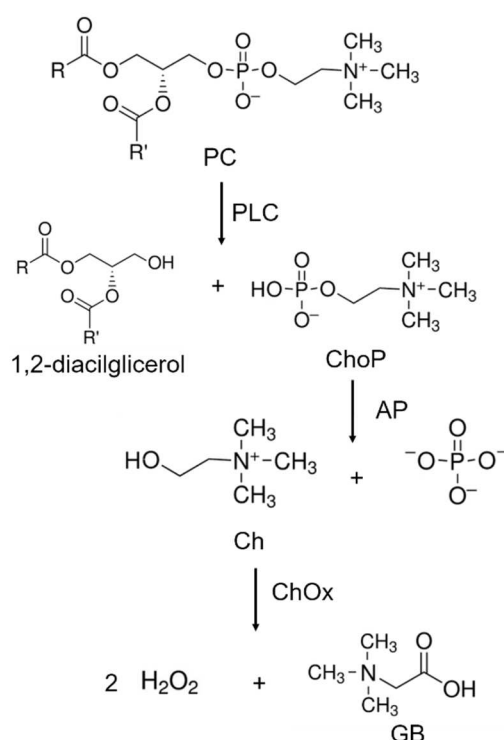
6.1.2 Estrategias para el análisis de Ch-PL

Tradicionalmente, la determinación de Ch-PL y, en consecuencia el ChoP y Ch, se ha realizado utilizando técnicas de separación que requieren

varios pasos para separar los compuestos solubles en agua (Ch y ChoP) de los compuestos hidrofóbicos (PC y SM) antes de llevar a cabo su determinación por TLC [194], HPLC [195], MALDI-TOF-MS [196] o LC-MS/MS [197].

En los últimos años han surgido nuevas alternativas. Por ejemplo, Nzai [198] ha desarrollado un método rápido y simple basado en espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) para determinar el contenido total de PL en aceite vegetal. Uno de los métodos más interesantes es el uso de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de P-31 [199]. Se basa en el cambio químico que sufre el átomo de fósforo en cada fosfolípido, dando un espectro RMN con la señal correspondiente a los diferentes PL separados. La técnica tiene baja sensibilidad, pero al ser no destructiva se ha aplicado a la determinación de PL en varias muestras, por ejemplo en aceite de oliva.

Para el control rutinario, los métodos enzimáticos son una de las opciones más interesantes. Algunos autores han desarrollado métodos enzimáticos para la determinación de PC [180, 200], basados en tres procesos según se muestra en el **Esquema 6.1**:



Esquema 6.1 Reacciones enzimáticas llevadas a cabo para la determinación de PC. Enzimas involucradas en el proceso: PLC, AP y ChOx.

- En la primera etapa, se utiliza la enzima fosfolipasa del tipo C (PLC) para liberar el residuo de fosfato de colina (ChoP) de la molécula de PC. A continuación, se utiliza la enzima fosfatasa alcalina (AP) con la que se obtiene Ch y fosfato.
- En la segunda etapa, si bien hay algún método que se centra en la determinación de fosfato con molibdato en presencia de un reductor, como la hidroquinona [201], la mayoría se centra en la determinación de Ch por su reacción enzimática con la colina oxidasa (ChOx), en la que uno de sus productos es el H_2O_2 .
- La tercera etapa es la de detección, en la que el H_2O_2 se somete a una segunda reacción catalizada por la enzima peroxidasa (HRP) y que involucra a un cromóforo [180, 200, 202] o un fluoróforo [203], que proporciona la señal analítica.

Para alcanzar la sensibilidad necesaria se requieren tiempos de incubación entre 5 y 30 minutos. Estos métodos también se han aplicado a la determinación de Ch y ChoP [204, 205], así como al análisis en flujo.

Como se ha comentado en la **Sección 1.8.1 (Capítulo 1)**, la enzima ChOx es una flavoenzima que cambia sus propiedades de fluorescencia durante su reacción con la Ch.

En esta parte de la Memoria se mostrarán las posibilidades de la fluorescencia de la ChOx para determinar Ch-PL, evitando de este modo la etapa de detección del **Esquema 6.1**.

6.2 OBJETIVOS

El objetivo fundamental es poner de manifiesto las posibilidades de la fluorescencia de las flavoenzimas (ChOx) para la determinación de fosfolípidos que contienen colina (Ch-PL).

El método se desarrolla utilizando un lector de placas de pocillos, con el consiguiente ahorro de reactivos, para lo que habrá que optimizar las condiciones de medida.

Se trabajará tanto a las longitudes del FAD como de un marcador derivado de fluoresceína (FS), poniendo de manifiesto las opciones de eliminación de interferencias.

Por simplicidad el estudio se centra en el fosfato de colina (ChoP), permitiendo la determinación conjunta o secuencial de Ch y ChoP en una muestra de leche materno-infantil.

Esta metodología tiene tres ventajas adicionales con respecto a los métodos propuestos anteriormente: 1) no se requiere de la participación o de la adición de otros reactivos más que los implicados en las reacciones, 2) no hay pasos de incubación, así que es un método rápido y 3) las enzimas se regeneran durante el proceso, por lo que pueden ser utilizadas en varias ocasiones. El proceso es, por lo tanto, de gran interés para su aplicación en biosensores ópticos.

Esta posibilidad se explora en el segundo apartado de este capítulo (**Sección 6.4**) en el que se construye y optimiza una lámina sensora, en la que están inmovilizadas tanto AP como ChOx.

6.3 RESULTADOS EN DISOLUCIÓN

6.3.1 Preparación y tratamiento de muestra

Puesto que la metodología se aplica en leche materno-infantil, se explica a continuación cómo se prepara la muestra a analizar:

Se pesan exactamente alrededor de 0.4 g de leche en polvo en un frasco de vidrio y se añaden 5 mL de tampon carbonato a pH 9.0. El frasco se cierra y se agita manualmente para obtener una suspensión coloidal estable (~2 min). Cualquier resto de sobrenadante se retira antes de seguir con el tratamiento.

Se preparan varias fracciones de 1.0 mL de esta disolución en tubos Eppendorf por separado (cada uno con capacidad para 1.5 mL). Se centrifugan durante 30 min a $1.34 \cdot 10^4$ rpm. Después de la centrifugación, se observan capas de sobrenadante en la parte superior e inferior de los tubos. El líquido obtenido se retira con la ayuda de una jeringa de plástico, unida a una aguja metálica. La fase acuosa contiene la Ch y el ChoP presentes en la leche, mientras que los PL se encontrarán en la fase sólida.

El líquido se hace pasar a través de un filtro de nylon para retirar las posibles trazas de sobrenadante. La muestra líquida final recogida contiene los analitos de interés (Ch y ChoP).

6.3.2 Preparación de la enzima modificada ChOx-FS

Las señales se miden a la longitud de onda del FAD (Fluorescencia intrínseca) y también a las de un marcador derivado de la fluoresceína que se une a la enzima (fluorescencia extrínseca). En este apartado se explica cómo se realiza el marcaje.

Se disuelve 1.0 mg de ChOx en 12.8 μ L de tampon carbonato ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a pH 9.0 y se mezcla con 8.0 μ L de disolución del fluoróforo FS en un tapón de Eppendorf. La mezcla se deja que actúe reposando en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 min. El exceso de FS se separa de la enzima ChOx-FS utilizando una columna cromatográfica de exclusión molecular casera.

La columna consiste en una jeringa de plástico de 1.0 mL de capacidad, con lana de vidrio colocada en el extremo inferior y rellena de una disolución de Sephadex® G-50 en agua. Para compactar la enzima, permanece 1 min a $4.8 \cdot 10^3$ rpm en la centrífuga.

La muestra que permanece en el tapón de Eppendorf se recoge con la ayuda de una jeringa de vidrio, añadiendo 20.0 μ L de la mezcla por la parte superior de la columna. El cuerpo del Eppendorf, tarado, que previamente se había separado del tapón, se coloca en la parte inferior de la columna. Éste,

sirve para recoger la fracción de enzima unida a la FS, por lo tanto el exceso del marcaje quedará eliminado. La columna se coloca en la centrífuga 5 min a $4.8 \cdot 10^3$ rpm.

A continuación, la columna se retira de la centrífuga. Una franja de color amarillo (debida a la FS) aparece en la parte superior de la jeringa, indicando que todo el exceso de agente de marcaje no se había eluido. El peso molecular de la FS es de 586 Da, mucho más bajo que el de la ChOx de $7.2 \cdot 10^4$ Da. Por exclusión molecular, la enzima ChOx unida al marcador cae por gravedad al interior del Eppendorf. Esta disolución se mantiene estable durante unos 4 días a 8 °C.

6.3.3 Señal analítica

Como se ha indicado anteriormente, el método pretende ser desarrollado utilizando el lector de placas como instrumento de medida. La zona espectral de trabajo es la región visible, bien a las longitudes de onda del FAD o a las del marcador unido a la enzima. Como el instrumento es de filtros, lo primero es conocer los espectros de excitación y emisión de ChOx y ChOx-FS. Los espectros de ChOx se muestran en la **Figura 6.2**.

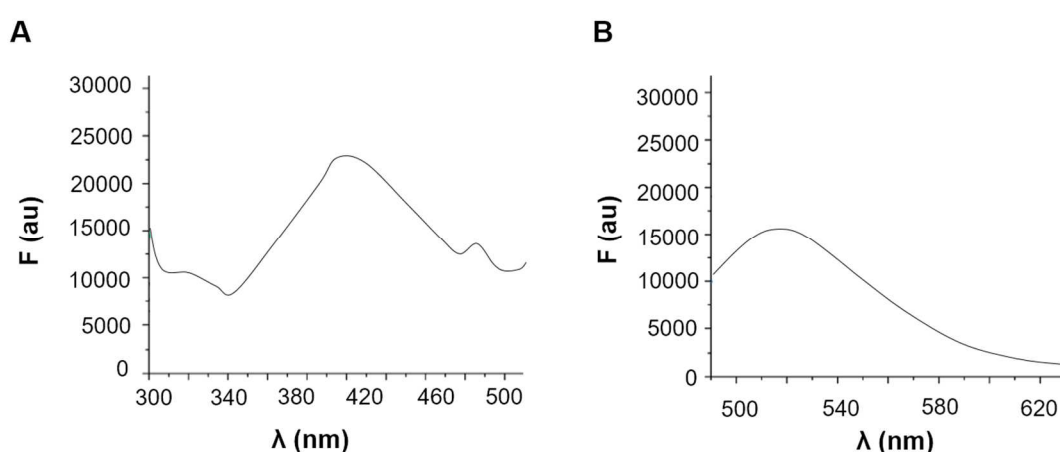


Figura 6.2 Espectros de **A)** excitación y **B)** fluorescencia, del FAD de ChOx ($10 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) a pH 9.0.

Según estos registros, para trabajar a las longitudes de onda del FAD se deberían elegir los filtros de 420 nm para excitación y 530 nm como filtro de fluorescencia.

La **Figura 6.3** muestra los de ChOx-FS. En este caso se deberían elegir 485 nm como filtro de excitación, pero el ancho de banda espectral de los filtros es de 20-50 nm, por tanto, se elige 440 nm como longitud de onda de excitación para ChOx-FS y así evitar la interferencia con la emisión.

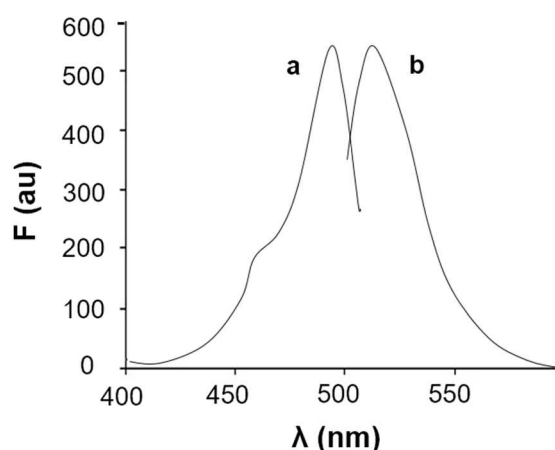


Figura 6.3 Espectros de **a.** excitación y **b.** fluorescencia, de ChOx-FS ($1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) a pH 9.0.

El siguiente paso, fue comprobar si se podía seguir la reacción de la colina (Ch) usando la fluorescencia de la ChOx, utilizando un equipo lector de placas.

A continuación, se muestra la variación de intensidad de fluorescencia corregida (F_c) durante la reacción de colina/colina oxidasa (Ch/ChOx) trabajando en el lector de placas, tras haber instalado los filtros mencionados (**Figura 6.4 a**), cuando sobre una disolución de ChOx se inyecta Ch y se sigue la variación de fluorescencia a las longitudes de onda del FAD. Como se observa, la señal es similar a la que cabía esperar, y que fue mostrada y explicada en la **Sección 1.8.1 (Capítulo 1)**.

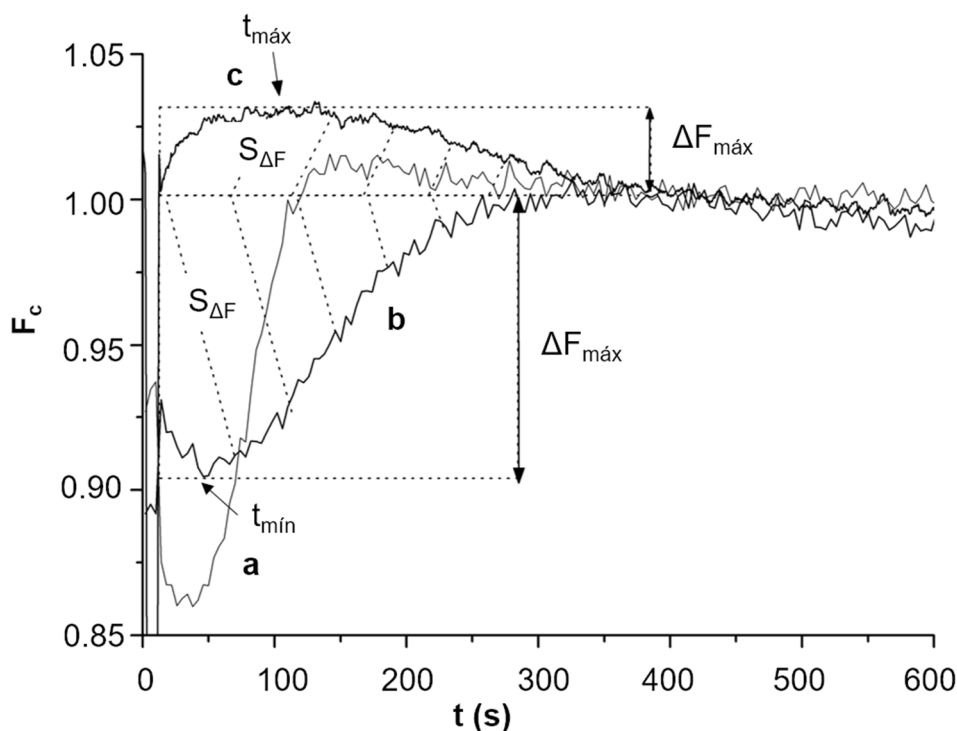


Figura 6.4 Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante la reacción enzimática. **a.** $[\text{Ch}]=1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{ChOx}]=1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 9.0 a las longitudes de onda del FAD ($\lambda_{\text{exc}} 420 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$); **b.** $[\text{ChoP}]=1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{ChOx}]=1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{AP}]=40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 9.0 a las longitudes de onda del FAD ($\lambda_{\text{exc}} 420 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$); **c.** $[\text{ChoP}]=1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{ChOx-FS}]=1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{AP}]=40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 9.0 a las longitudes de onda de la FS ($\lambda_{\text{exc}} 440 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$).

Cuando el analito es el ChoP, ambas reacciones enzimáticas se llevan a cabo al mismo tiempo, por lo que en el pocillo se depositan las enzimas AP y ChOx, y sobre ellas se inyecta la disolución de ChoP. Inicialmente, la Ch no está presente en la disolución. Ésta se libera lentamente durante la hidrólisis enzimática previa con la enzima fosfatasa alcalina (AP) (**Figura 6.4 b**). Si se comparan la **Figura 6.4 (a)** vs. **(b)**, se observa que la hidrólisis del ChoP es más lenta que la oxidación de Ch (el decaimiento de la fluorescencia al inicio de la reacción es mucho más rápido en la **Figura 6.4 (a)**). El comportamiento posterior de la señal es similar.

Cuando la ChOx se modifica químicamente con FS, y su fluorescencia se mide a las longitudes de onda de la FS, la representación gráfica de F_c vs. t es casi una imagen especular con valores de fluorescencia positivos (**Figura**

6.4 b vs. c). Este comportamiento se ha explicado ya previamente en la **Sección 1.8.1 (Capítulo 1)** [89].

Como parámetros analíticos en la determinación de ChoP se pueden utilizar el área de la variación de la señal de fluorescencia ($S_{\Delta F}$), la máxima variación en la señal de fluorescencia ($\Delta F_{\text{máx}}$), así como el tiempo de reacción necesario para que aparezca el valor de señal mínimo ($t_{\text{máx / mín}}$). Los dos primeros se utilizan continuamente a lo largo de la Memoria (**Figura 6.4 b-c**).

6.3.4 Optimización de parámetros

6.3.4.1 Concentración de enzima

Desde el punto de vista cinético de la enzima, ambas ChOx y ChOx-FS se comportan del mismo modo, por lo que la optimización se puede realizar utilizando cualquiera de ellas, extrapolando las conclusiones a la otra enzima. En este trabajo la optimización se ha realizado con la enzima ChOx.

Dado que en este método están involucradas de forma simultánea dos reacciones enzimáticas es importante aclarar en detalle el efecto de cada una sobre la señal de fluorescencia. Sin embargo, debe tenerse en cuenta, que el objetivo es obtener una señal que permita una determinación con suficiente sensibilidad a corto plazo, es decir, el objetivo es lograr un equilibrio entre sensibilidad y tiempo de análisis, evitando también realizar incubaciones.

Se estudia el efecto de la concentración de la enzima AP en la determinación de ChoP, al medir los parámetros $S_{\Delta F}$ y $\Delta F_{\text{máx}}$; encontrando que ambas señales analíticas dependen directamente de la concentración de AP (**Figura 6.5**).

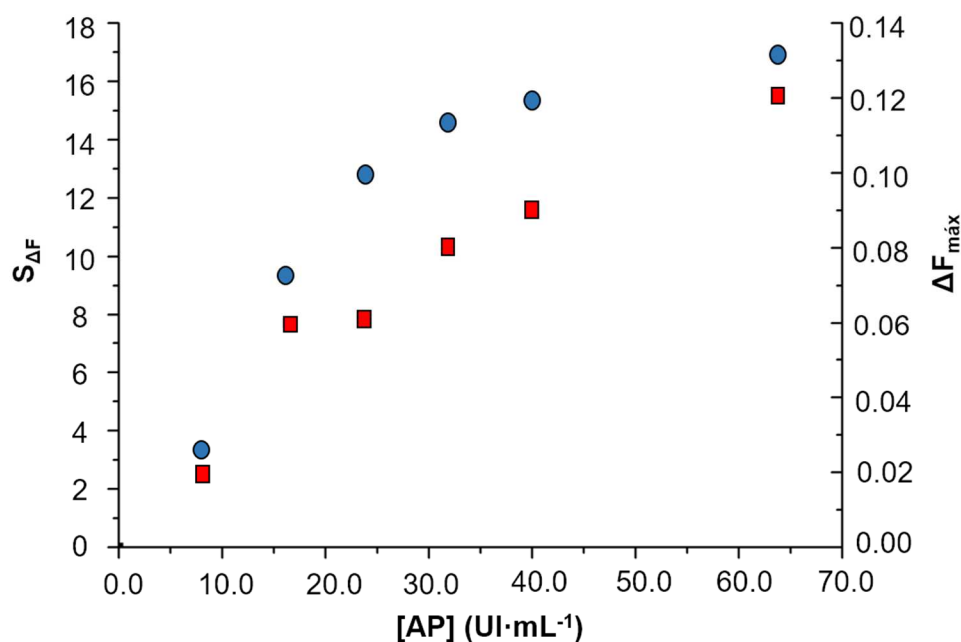


Figura 6.5 Influencia de la [AP] sobre $S_{\Delta F}$ y $\Delta F_{\text{máx}}$. $[\text{ChOx}] = 1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{ChoP}] = 1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0, $\lambda_{\text{exc}} 420 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$.

A medida que la concentración de enzima se hace más alta, el incremento en la señal es menos importante y para concentraciones altas ($40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $64.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) los resultados tienden a ser casi planos sin observarse prácticamente ninguna mejoría. Esto indica que si hay un aumento muy alto en la concentración de AP no aumentaría la señal, así que $40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ se considera como valor óptimo. El $t_{\text{mín}}$ se comporta de forma independiente a la concentración de enzima AP (**Tabla 6.1**).

[AP] (UI·mL ⁻¹)	8.2	16.4	23.6	31.8	40.0	63.6
$t_{\text{mín}}$ (s)	96	92	98	92	96	92

Tabla 6.1 Efecto de la concentración de AP con respecto del $t_{\text{mín}}$. $[\text{ChOx}] = 1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{ChoP}] = 1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0, $\lambda_{\text{exc}} 420 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$.

A continuación, se estudia el efecto de la concentración de enzima colina oxidasa (ChOx) en la determinación de ChoP (**Figura 6.6**), tanto en el área ($S_{\Delta F}$) como en el tiempo en alcanzar el mínimo de señal ($t_{\text{mín}}$). Los resultados se ofrecen a partir de valores de intensidad normalizados.

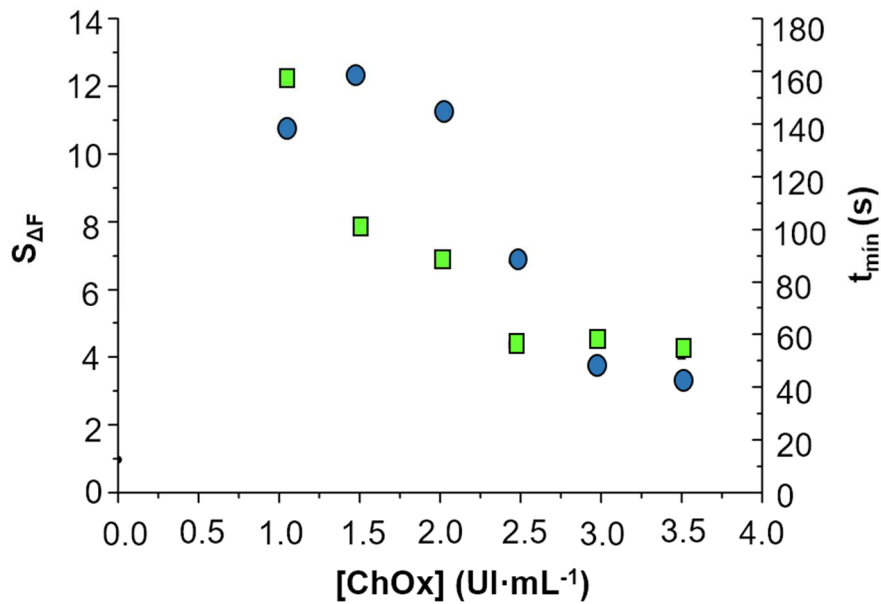


Figura 6.6 Influencia de la [ChOx] sobre S_{ΔF} ● y t_{min} ■. [AP]=40.0 UI·mL⁻¹, [ChoP]=1.0·10⁻⁵ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 420 nm / λ_{em} 530 nm.

Estos resultados se explican mejor si se tiene en cuenta que se mide la fluorescencia de la enzima; así, cuanto más alta sea la concentración de la enzima, más rápida será la reacción, por tanto menor S_{ΔF} y t_{min}. Por otro lado, la variación de fluorescencia máxima es independiente de la concentración de ChOx (Tabla 6.2).

[ChOx] (UI·mL ⁻¹)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
ΔF _{máx}	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.07

Tabla 6.2 Efecto de la concentración de ChOx con respecto a ΔF_{máx}. [AP]=40.0 UI·mL⁻¹, [ChoP]=1.0·10⁻⁵ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 420 nm / λ_{em} 530 nm.

Teniendo en cuenta el tiempo de reacción y la señal obtenida, se considera como óptimo un valor de concentración de ChOx de 2.0 UI·mL⁻¹.

6.3.4.2 pH de trabajo

La actividad de ambas enzimas depende del pH. La ChOx ya había sido estudiada en nuestro grupo de investigación [89]. Para valores menores a pH 7.0 no se detecta reacción, mientras que para valores superiores a pH 11.0

comienza rápidamente la desnaturalización de la enzima; el pH óptimo para ChOx es 9.5 pero también es posible trabajar en un rango entre 8.0 y 10.0. Respecto a la AP, la enzima es estable en el rango de pH de 7.5-11.0, siendo el pH óptimo para la actividad enzimática de 8.0-10.0.

Con el fin de optimizar las condiciones de pH para la determinación de ChoP, la reacción se ha llevado a cabo a cuatro pHs diferentes (7.0, 8.0, 9.0 y 10.0). Se han obtenido los perfiles $F_c=f(t)$ (**Figura 6.7**) modificando el pH y los resultados se muestran en la **Tabla 6.3**.

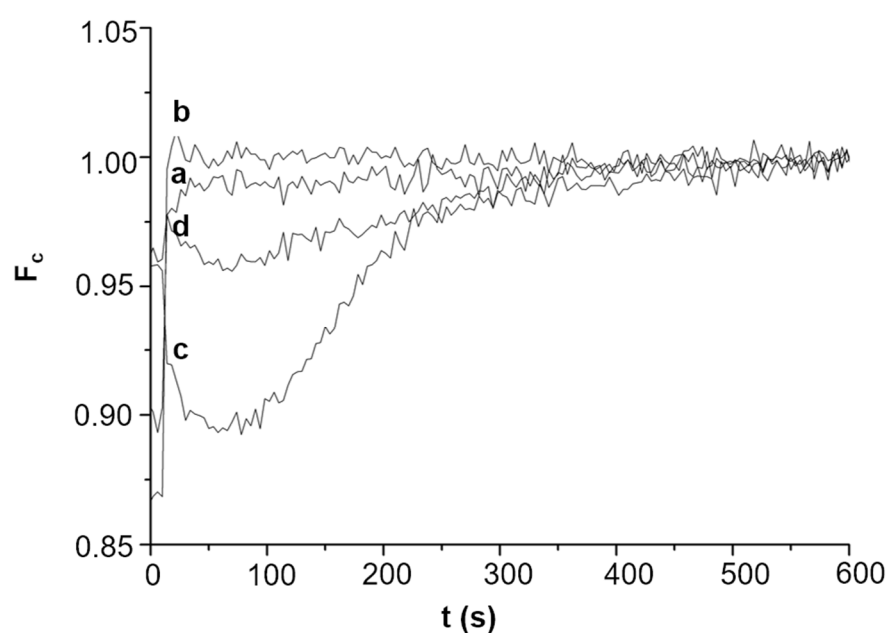


Figura 6.7 Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante la reacción enzimática modificando el pH del medio. $[AP]=40.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[ChOx]=2.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[ChoP]=1.0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda_{exc} 420 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} 530 \text{ nm}$. **a.** pH=7.0, **b.** pH=8.0, **c.** pH=9.0, **d.** pH=10.0.

pH	7.0	8.0	9.0	10.0
$S_{\Delta F}$	2.780	0	16.800	9.000
$\Delta F_{m\acute{a}x}$	0.011	0	0.105	0.042

Tabla 6.3 Influencia del pH sobre $S_{\Delta F}$ y $\Delta F_{m\acute{a}x}$. $[AP]=40.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[ChOx]=2.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[ChoP]=1.0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda_{exc} 420 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} 530 \text{ nm}$.

Como conclusión, se ha elegido finalmente pH 9.0 como óptimo para llevar a cabo este método, ya que se obtiene mayor señal.

6.3.5 Características analíticas para la determinación de ChoP

A la luz de las consideraciones anteriores, se han elegido como condiciones experimentales finales: disolución $[AP]=40.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, disolución $[ChOx]=2.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ y pH 9.0. Utilizando estas condiciones, se ha realizado un estudio de calibración de ChoP, midiendo la fluorescencia del FAD (**Figura 6.8**).

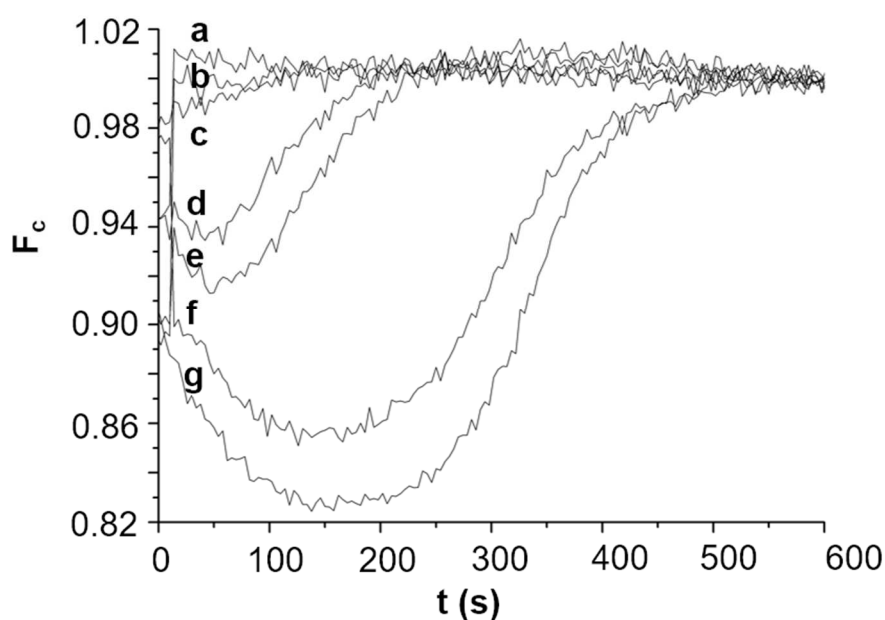


Figura 6.8 Estudio de calibración de ChoP a las longitudes de onda del FAD. $[AP]=40.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[ChOx]=2.0 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 9.0, $\lambda_{exc} 420 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} 530 \text{ nm}$. $[ChoP]=$ **a.** Blanco, **b.** $5.2\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **c.** $1.0\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **d.** $5.2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **e.** $1.0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **f.** $5.2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **g.** $1.0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se han obtenido rectas de calibrado, tanto por áreas ($S_{\Delta F}$) como por variaciones de fluorescencia ($\Delta F_{\text{máx}}$), encontrando las ecuaciones mostradas en las filas 1ª y 2ª de la **Tabla 6.4**.

Obviamente, la metodología es más rápida midiendo el parámetro $\Delta F_{\text{máx}}$, pero el rango lineal y la reproducibilidad son peores.

En las condiciones establecidas, se ha llevado a cabo un calibrado utilizando la fluorescencia de la ChOx-FS. Los resultados recogidos en las filas 3ª y 4ª de la **Tabla 6.4** indican similitud con los obtenidos en el caso de la ChOx.

	Calibración lineal [ChoP] o [Ch] (mol·L ⁻¹)	Rango (mol·L ⁻¹)	RSD (%)
ChOx	$S_{\Delta F} = 0.13_{(\pm 3.5)} + 1.27_{(\pm 2.0)} \cdot 10^6$ [ChoP] $r=0.999$	$5.2 \cdot 10^{-7}$ a $1.0 \cdot 10^{-5}$ (a)	3.7% (n=4)
	$\Delta F_{\text{máx}} = 0.003_{(\pm 3.5)} + 1.34_{(\pm 2.0)} \cdot 10^4$ [ChoP] $r=0.993$	$5.2 \cdot 10^{-7}$ a $5.2 \cdot 10^{-6}$	4.8% (n=4)
ChOx-FS	$S_{\Delta F} = 0.47_{(\pm 3.5)} + 2.41_{(\pm 2.0)} \cdot 10^5$ [ChoP] $r=0.999$	$5.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-4}$ (a)	4.2% (n=4)
	$\Delta F_{\text{máx}} = 0.004_{(\pm 3.5)} + 8.60_{(\pm 2.0)} \cdot 10^2$ [ChoP] $r=0.989$	$5.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-5}$	5.0% (n=4)
	$S_{\Delta F} = 1.96_{(\pm 3.5)} + 1.57_{(\pm 2.0)} \cdot 10^5$ [Ch] $r=0.998$	$9.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-4}$ (a)	4.1% (n=4)

(a) Concentraciones máximas probadas

Tabla 6.4 Determinación de ChoP y Ch utilizando la fluorescencia de la ChOx y/o ChOx-FS en las condiciones óptimas para el ChoP.

6.3.5.1 Consideraciones sobre la determinación de Ch y ChoP

En muchas de las muestras que contienen ChoP, la Ch está presente como constituyente, por lo que la metodología así descrita serviría para una determinación conjunta de ambas. Sin embargo, se puede adaptar para realizar también una determinación secuencial de los mismos, simplemente cambiando el orden de adición de las enzimas.

Se han obtenido los perfiles F_c vs. t al añadir secuencialmente ChOx-FS y AP sobre una disolución que contiene una mezcla de Ch+ChoP (**Figura 6.9**). Después de la adición de ChOx-FS, solo va a reaccionar la Ch presente en la disolución (primer máximo). Cuando la fluorescencia de la ChOx-FS vuelve a su valor inicial (lo que significa que la reacción con la Ch ya ha acabado), la adición posterior de AP hace que comience la reacción del ChoP, dando el segundo máximo. Las concentraciones de Ch y ChoP se pueden determinar gracias a los parámetros analíticos $S_{\Delta F}$ y $\Delta F_{\text{máx}}$.

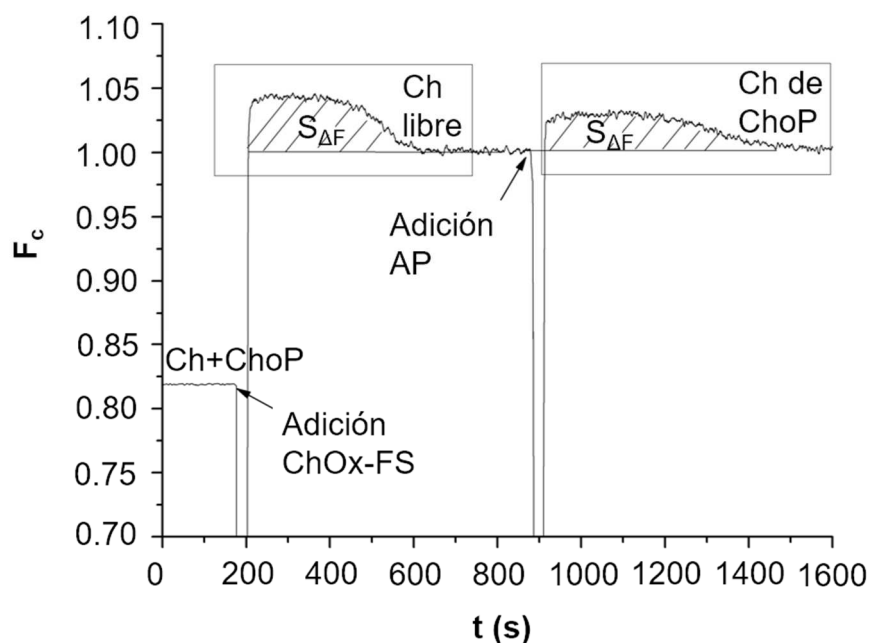


Figura 6.9 Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante la reacción enzimática secuencial de una muestra que contiene Ch y ChoP medido a las longitudes de onda de la FS. $[Ch]=5.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[ChoP]=2.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[ChOx-FS]=1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[AP]=40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 9.0, a las longitudes de onda de la FS ($\lambda_{exc} 440 \text{ nm} / \lambda_{em} 530 \text{ nm}$).

Para poder llevar a cabo la determinación secuencial se debe comprobar que:

1. La presencia de AP o ChoP en la disolución no afecta a la reacción ChOx-Ch como se observa en la **Figura 6.10** en la que se muestra la señal de (b) ChOx-Ch, en presencia de (c) AP y (d) ChoP.

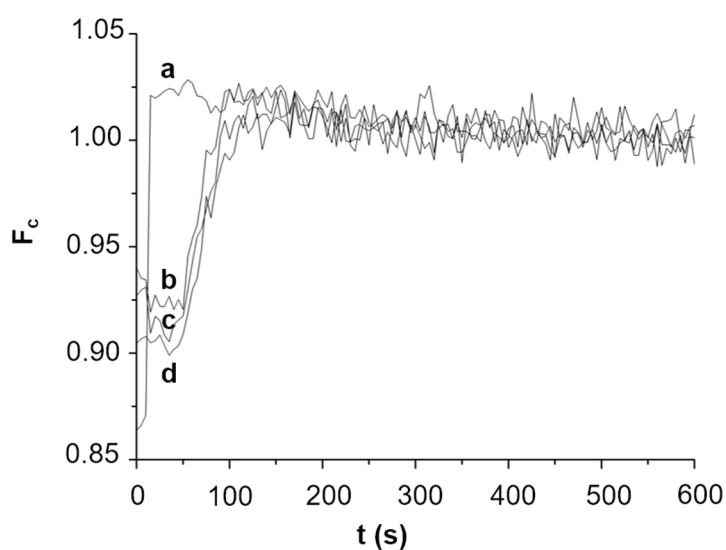


Figura 6.10 Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo durante la reacción enzimática de Ch/ChOx con y sin adición de AP y ChoP. $[Ch]=1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[ChoP]=1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[ChOx]=2.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[AP]=40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 9.0, a las longitudes de onda del FAD ($\lambda_{\text{exc}} 420 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$). **a.** ChOx + tampon (blanco); **b.** ChOx + Ch (referencia); **c.** ChOx + AP + Ch; **d.** ChOx + ChoP + Ch.

2. La reacción previa de Ch no tiene efecto sobre la cinética de la enzima en la reacción de determinación de ChoP como se pone de manifiesto en la **Figura 6.11** para distintas concentraciones de Ch.

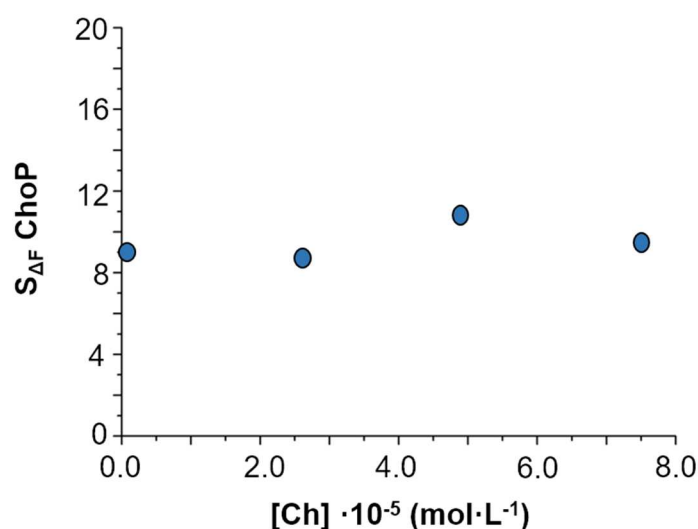


Figura 6.11 Influencia de la concentración de Ch en la señal de $S_{\Delta F}$ de ChoP para un proceso de reacción secuencial. $[AP]=40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[ChOx-FS]=1.6 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[ChoP]=2.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0, a las longitudes de onda de la FS ($\lambda_{\text{exc}} 440 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$).

3. En las condiciones de ChoP, la señal de Ch depende de la concentración, como se puede observar en la fila 5ª de la **Tabla 6.4**, en la que se ha realizado una calibración de Ch en las condiciones del ChoP.

6.3.6 Determinación de Ch y ChoP en leche materno-infantil

En este apartado se ha aplicado la metodología descrita para determinar ambos, Ch y ChoP, en leche materno-infantil en polvo.

6.3.6.1 Eliminación de interferencias

La leche es una matriz muy compleja formada por agua, grasas, proteínas, lactosa, vitaminas y otros compuestos. Las interferencias hidrofóbicas se pueden eliminar después de llevar a cabo un tratamiento simple de la muestra (**Sección 6.3.1**). La reacción enzimática asegura la especificidad del método, sin embargo, algunas sustancias solubles en agua podrían presentar fluorescencia, dando como resultado interferencias espectrales importantes. Se ha estudiado la fluorescencia de fondo correspondiente a la fase acuosa. Para ello, se han obtenido espectros de excitación/emisión 3D (comprende el espectro de emisión fluorescente entre 300 y 700 nm, excitando a longitudes de onda de 280 a 480 nm, a intervalos de 10 nm) (**Figura 6.12**).

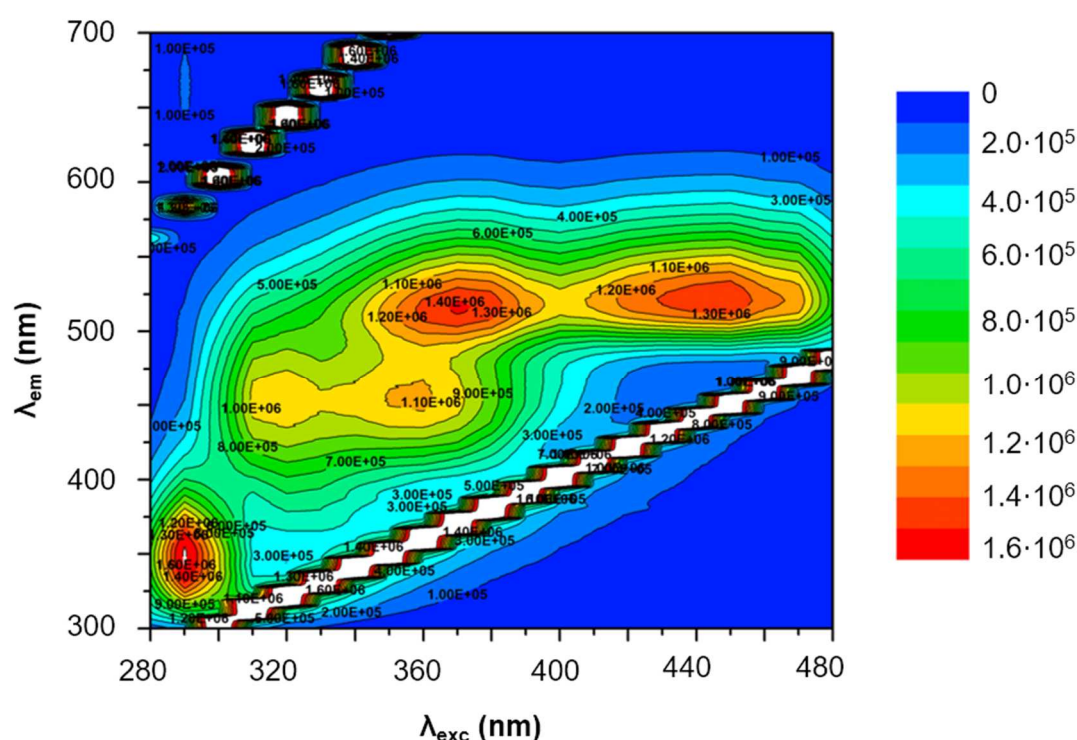


Figura 6.12 Espectro 3D de la fracción acuosa de leche infantil. Cubeta de cuarzo, λ_{exc} 280, 290, 300, 310... hasta 480 nm / λ_{em} 300-700 nm.

El eje-x representa las longitudes de onda de excitación, y el eje-y las de emisión. La fluorescencia se ha representado mediante líneas de contorno. A la derecha de la figura aparece la escala de intensidades por colores. Se

pueden destacar tres picos importantes. Dos de ellos se encuentran a λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 520 nm, y λ_{exc} 450 nm / λ_{em} 520 nm, respectivamente. Estos picos, que corresponden a los del FAD, se deben a la riboflavina presente en la leche como Vitamina B2. El tercer pico, el más prominente por su intensidad de fluorescencia, es λ_{exc} 290 nm / λ_{em} 340 nm y corresponde al triptófano (trp) de los aminoácidos presentes en la leche. También aparece la dispersión Rayleigh y su armónico (bandas blancas).

Para eliminar la fluorescencia de las riboflavinas se han probado varias alternativas:

1. Por irradiación con luz UV (la radiación podría degradar la riboflavina), la interferencia solo se reduciría de forma parcial.
2. Se ha podido observar que la fluorescencia depende del pH y la composición de la disolución tampon influye en la estabilidad de la fluorescencia de la leche; si el pH aumenta, se observa un decrecimiento en la fluorescencia, los mejores resultados se obtienen a pH 9.0 o 10.0 (se prueba 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0). Ya que a pH 9.0 se ha obtenido buena sensibilidad, se elige éste como óptimo para llevar a cabo la determinación. La naturaleza del tampon afecta de forma sustancial a la señal. Se han probado disoluciones tampon diferentes (carbonato, fosfato y Tris-HCl). De entre todos los resultados que se han obtenido, los mejores han sido en tampon carbonato.
3. Trabajar con ChOx-FS en vez de ChOx. ChOx-FS presenta una intensidad de fluorescencia que enmascara la fluorescencia residual de la muestra. Además, puesto que se miden las señales cinéticas, la interferencia espectral residual se puede corregir por diferencia de señales.

Por último, el problema de la interferencia espectral se ha evitado combinando la opción **(2)** (trabajando a pH 9.0 carbonato) y **(3)** (utilizando ChOx-FS en vez de ChOx).

Después de eliminar la fluorescencia de fondo, se observa un cierto efecto matriz de la muestra en la cinética de reacción. Este inconveniente se resuelve llevando a cabo una calibración por adición estándar.

6.3.6.2 *Determinación enzimática de Ch y ChoP en la muestra*

Para llevar a cabo la determinación en fórmula de leche materno-infantil, se ha utilizado el método de adición estándar. Se lleva a cabo por triplicado. La muestra se prepara siguiendo un método simple (**Sección 6.3.1**), añadiendo ambos analitos antes del tratamiento de separación, para que sufrieran el mismo proceso que la muestra en todo momento.

Como señal analítica se toma el área ($S_{\Delta F}$). Se ha obtenido como resultados 0.157 ± 0.013 mg/g Ch libre y 0.022 ± 0.002 mg/g ChoP en leche ($n=3$), de acuerdo con los resultados de la bibliografía [193]. Asimismo, se ha realizado un estudio de recuperación. Las concentraciones de Ch y ChoP que se resumen en el procedimiento descrito, se añadieron a la disolución obtenida antes de la centrifugación. Para Ch la recuperación ha sido de un 93% y para ChoP de un 95%, lo que pone de manifiesto los buenos resultados obtenidos [206].

Las enzimas utilizadas se regeneran durante las reacciones enzimáticas, por lo que se pueden utilizar varias veces. Esta es la base para el desarrollo de un sensor óptico autoindicador, que es lo que se expone en el siguiente apartado.

6.4 RESULTADOS CON EL BIOSENSOR

A la hora de desarrollar un biosensor enzimático, hay que inmovilizar la enzima en un soporte que permita la entrada del analito para que se produzca la reacción. El soporte estará basado en un gel de poliacrilamida que absorbe en la región ultravioleta, por lo que el estudio se realizará en la región visible del espectro, y por tanto se trabajará con la enzima modificada con un marcador fluorescente.

6.4.1 Preparación de la enzima modificada ChOx-FS y ChOx-SE para medidas en lámina

Se utilizaron dos marcadores: éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 6-[fluorescein-5(6)-carboxamido] hexanoico (FS) y CFTM 405S succinimidil éster (SE).

Para llevar a cabo el marcaje de la enzima el procedimiento fue distinto al descrito en la **Sección 6.3.2**, que correspondía a las medidas realizadas en disolución. Para las medidas en la lámina se llevó a cabo de la siguiente forma: se disuelve 3.0 mg de ChOx en 230 μL de tampon carbonato $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 9.0 y se mezcla en un eppendorf con 250 μL de disolución del fluoróforo FS o con 6.0 μL de disolución de SE. Dependiendo del marcador utilizado, la relación molar enzima-FS era de 1:8 o enzima-SE de 1:1. La mezcla se deja que actúe reposando en la oscuridad a temperatura ambiente, en agitación durante 180 min. El exceso de marcador en este caso no se separa, para conseguir retener en el interior de la lámina la mayor cantidad que sea posible.

6.4.2 Preparación de la lámina sensora

Se disuelven 37.5 mg de acrilamida y 2.5 mg de bis-acrilamida en 250 μL de disolución de enzima marcada ChOx-FS o ChOx-SE.

Transcurrido ese tiempo, se añaden 2 μL de disolución de persulfato de amonio (10.0% m/v) y mediante un borboteo de N_2 se elimina el exceso de oxígeno. Se añaden 0.2 μL de TEMED. Al momento se extiende la mezcla (aproximadamente 150 μL de disolución) sobre un molde de vidrio ($1.0 \times 0.5 \times 0.08 \text{ cm}$), cubriéndose con un cristal y dejando polimerizar ~60 min. Una vez que se ha formado la lámina, se lava y se guarda en disolución tampon en el frigorífico a 4°C para que no sufra modificaciones de tamaño y propiedades debido a un posible cambio de pH.

6.4.3 Procedimiento experimental

Como se ha descrito en la **Sección 2.4.2**, las medidas en flujo en la lámina se llevaron a cabo con el espectrómetro de fluorescencia “Perkin Elmer LS-50B” (**Figura 2.10 B**). La celda de flujo que contiene la lámina sensora (**Figura 2.11 B**) se colocó sobre el accesorio que actúa como lector de placas

de fibra óptica (**Figura 2.11 A**). El caudal de flujo de analito se suministró mediante una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson).

Las medidas en disolución, tanto de los espectros como de las reacciones cinéticas, se llevaron a cabo según el procedimiento ya descrito en la **Sección 6.3.3**.

Para realizar las medidas en la lámina sensora, la celda de flujo (con la lámina en su interior) se coloca en el fluorímetro. Se hace pasar un flujo de disolución de carbonato a pH 9.0 a $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y se recoge la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión elegidas para cada marcador (490 / 530 nm para FS y 380 / 430 nm si es SE). Cuando la señal se estabiliza, se inyecta durante un tiempo determinado la disolución de analito, y se obtiene entonces una variación en la señal. Más tarde, se vuelve a pasar disolución de carbonato.

6.4.4 Sensor de colina (Ch)

El objetivo de esta parte del trabajo es la construcción de un sensor que responda a la concentración de fosfato de colina (ChoP), por lo que hay que inmovilizar las dos enzimas, colina oxidasa (ChOx) y fosfatasa alcalina (AP). Por ello se comenzó con la inmovilización de ChOx, lo que dio lugar a la construcción de un biosensor enzimático autoindicador de Ch.

6.4.4.1 Ensayos previos. Elección del modificante enzimático

Lo primero fue comprobar que la reacción ChOx-FS con Ch daba señal en la lámina. Para ello, utilizando el dispositivo que se detalla en la **Figura 2.11 B**, y según el procedimiento descrito en la **Sección 2.4.2**, se bombeó la disolución de analito durante 2 min. No se obtuvo la señal esperada, ni incluso aumentando la concentración de analito, el tiempo de inyección o la cantidad de enzima.

Podrían existir dos posibles razones por las que la señal no se observara:

1. Que la reacción enzimática no se produjera en suficiente extensión para observar la señal.

La Ch debe de difundir en la lámina biosensora para reaccionar con la enzima. Para facilitar este proceso se realizaron varios ensayos. Algunos de ellos fueron dirigidos a la mejora del diseño de la lámina (se construyeron láminas más finas, agujereadas o con superficie rugosa) y otros ensayos se destinaron a mejorar las propiedades del analito para difundir en la lámina. La Ch es una especie cargada positivamente, por lo tanto, se utilizaron tensioactivos (SDS) para formar un par iónico y facilitar su entrada. Asimismo, se realizaron ensayos con parada de flujo (Stop-Flow), pero los resultados siguieron sin ser satisfactorios. Puesto que el H_2O_2 es un producto de la reacción enzimática, se comprobó mediante tiras reactivas de un kit comercial para la detección de peróxidos, si éste estaba presente en las soluciones residuales y los resultados fueron positivos. Esto indicaba que la reacción enzimática tenía lugar.

2. Que aunque la reacción enzimática se produjera, ésta no fuera detectable.

La **Figura 6.13** muestra los espectros de absorción del FAD libre (**a**), y el espectro de excitación de la FS (**b**) en la ChOx-FS en disolución. Son señales relativas para poder comparar entre sí la forma de los espectros. Como puede observarse, existe un solapamiento entre ellos, lo que produce un filtro interno en la fluorescencia de la FS. Durante la reacción enzimática, el FAD se reduce a FAD.H₂. Como el FAD libre presenta mayor absorción que el FAD.H₂ (**c**), cuando la flavina está en su forma reducida, el filtro interno es menor y la fluorescencia de la ChOx-FS a las longitudes de onda de la FS aumenta. Por lo tanto, aunque la reacción enzimática ocurra, debe existir un filtro interno diferencial para observar la señal.

Se hicieron los espectros de excitación de fluorescencia de la ChOx-FS inmovilizada en la lámina a las longitudes de onda de la FS para comprobar si se mantenía el solapamiento. Como puede observarse (**d**), el espectro queda ligeramente desplazado a la derecha con respecto al obtenido en

disolución (**b**). Por tanto, el solapamiento con el espectro del FAD es más pequeño y el efecto de filtro interno en la fluorescencia de la FS, debería ser menor, pero esto no es suficiente para explicar la casi ausencia de señal.

Simultáneamente a este trabajo, se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación un estudio exhaustivo de la fluorescencia del FAD en la ChOx [95]. En este estudio se obtuvo una conclusión importante y sorprendente: se observó una alteración inusual en los espectros de excitación, en comparación con los espectros de absorción, observada en función del pH.

A pH 9.0 el espectro de excitación del FAD (**e**) sufre un desplazamiento hipsocrómico de alrededor de 50 nm (400 nm) en comparación con el espectro de absorción. Esto no se observa a otros pHs. Como puede observarse, a este pH no hay solapamiento entre el espectro de excitación del FAD (**e**) y de la ChOx-FS (**d**), así que no hay filtro interno. Aunque la reacción enzimática se produjera, no había ninguna variación de fluorescencia a las longitudes de onda de la FS y por lo tanto no se obtenía ninguna señal.

Era necesario elegir otro marcador cuyo espectro de excitación se solapara al espectro de excitación del FAD en la ChOx a pH 9.0.

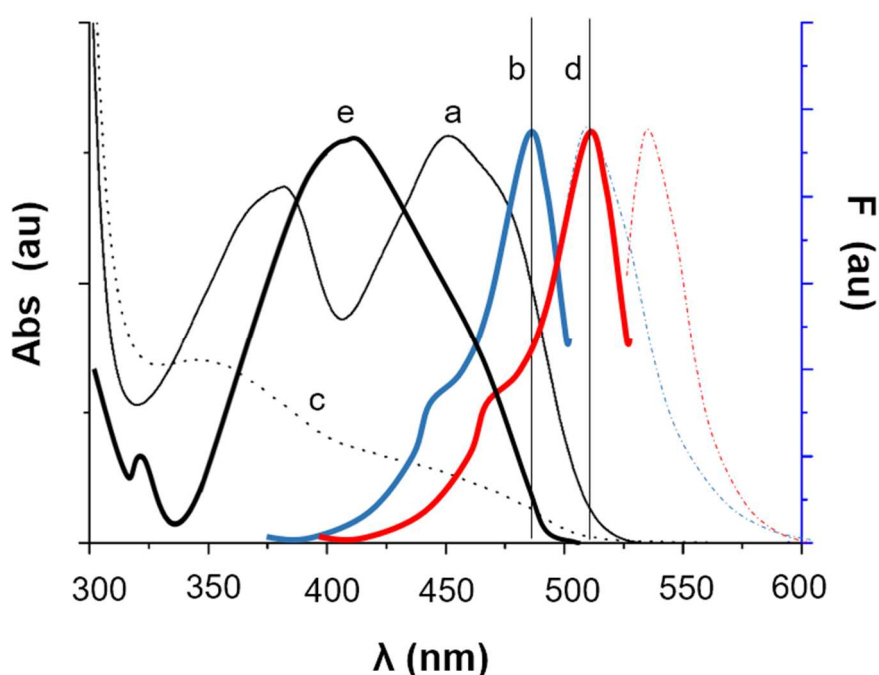


Figura 6.13 Espectros de: **a.** absorción del FAD libre —, **b.** excitación de la ChOx-FS en disolución —, **c.** absorción FAD.H₂ libre ----, **d.** excitación de la ChOx-FS inmovilizada en la lámina — y **e.** excitación del FAD a pH 9.0 en la ChOx —.

El marcador seleccionado fue CFTM 405S, succinimidil éster (SE). La **Figura 6.14 A** muestra los espectros de excitación 3D del marcador CFTM 405S SE en disolución. Al contrario que en la **Figura 6.12**, aquí el eje-x representa las longitudes de onda de emisión, y el eje-y las de excitación. Igualmente, la fluorescencia se ha representado mediante líneas de contorno. Como se observa, el máximo de emisión es de 430 nm, teniendo cuatro máximos de excitación a 250, 280, 380 y 410 nm, dos de ellos (380 y 410 nm) están solapados con el espectro de excitación del FAD a pH 9.0 (**Figura 6.14 B**). Si bien se podría trabajar con cualquiera de ellos, se eligió como óptimo 380 nm, ya que evitaba solapamientos con la banda de emisión y con las bandas de dispersión.

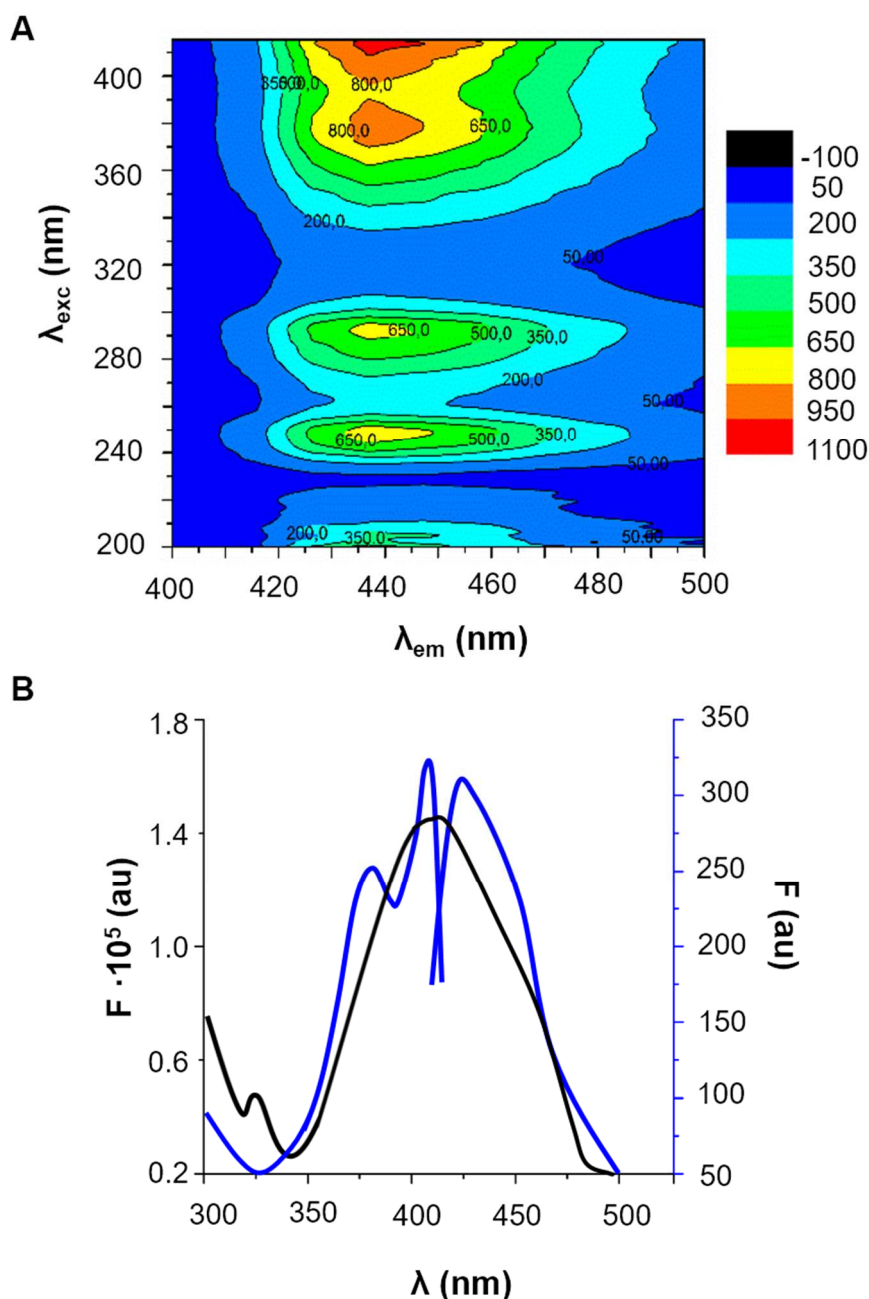


Figura 6.14 A) Espectro 3D del marcador CFTM 405S, succinimidil éster (SE) en disolución. Cubeta de cuarzo, λ_{exc} 200, 240, 280, 320... hasta 410 nm / λ_{em} 400-500 nm. **B)** Espectro de excitación del FAD a pH 9.0 en la ChOx — y de excitación / emisión de la ChOx-SE inmovilizada en la lámina —.

El procedimiento de marcaje para el SE se detalla en la **Sección 6.4.1**. Previamente, se probó en disolución la reacción enzimática entre la ChOx-SE con Ch, a las longitudes de onda del SE, obteniendo buenos resultados en su funcionamiento (**Figura 6.15**) para diferentes concentraciones de Ch.

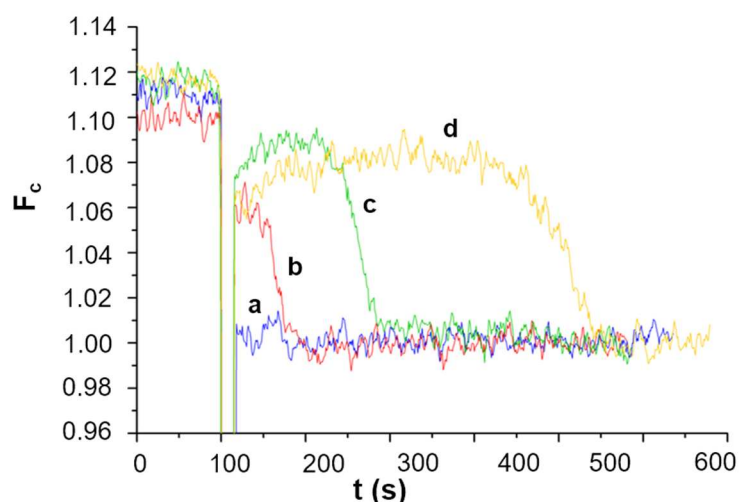


Figura 6.15 Estudio de calibración de Ch en disolución a las longitudes de onda del marcador CFTM 405S SE. [ChOx-SE]=1.6 UI·mL⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm. [Ch]= **a.** Blanco, **b.** $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹, **c.** $5.0 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹, **d.** $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹.

El siguiente paso fue la inmovilización de la ChOx-SE en gel de poliacrilamida, y una vez colocada la lámina en la celda, tuvo lugar la reacción enzimática con Ch (a 380 / 430 nm como longitudes de onda de excitación / emisión respectivamente). En este caso, sí se observó la señal (**Figura 6.16**) y ésta dependía de la concentración de Ch, aunque fueron muy bajas.

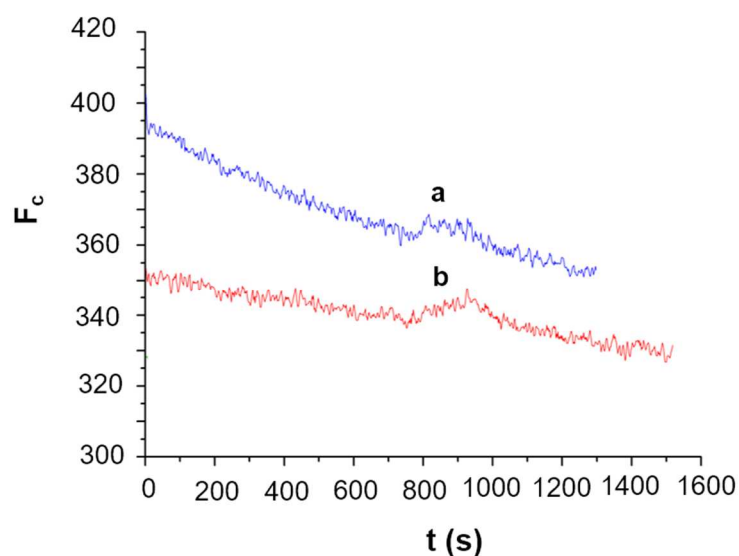


Figura 6.16 Estudio de calibración de Ch, con inmovilización de ChOx-SE en la lámina, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE. [ChOx-SE]=9.4 UI, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 0.5 mL·min⁻¹, $t_{iny. Ch}$: 2 min. [Ch]= **a.** $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, **b.** $5.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹.

6.4.4.2 Optimización

Para mejorar la señal se estudiaron diferentes parámetros:

- **Efecto del DMSO en la señal**

Cuando se llevó a cabo la reacción de derivatización de la enzima, se observó un aumento de temperatura en la disolución. Una posible causa es la presencia de DMSO (ya que el marcador SE se disuelve en este solvente para evitar ser hidrolizado). Se estudió el efecto de la presencia de DMSO en la actividad de la enzima para lo que la reacción enzimática entre ChOx y Ch se llevó a cabo a diferentes concentraciones de DMSO. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.5**.

% DMSO	0	5	20
% Variación de fluorescencia	14	6	3

Tabla 6.5 Influencia del DMSO sobre la actividad de la enzima en la reacción ChOx con Ch. [ChOx]=1.6 UI·mL⁻¹, [Ch]=1.0·10⁻⁵ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 280 nm / λ_{em} 340 nm.

Como puede observarse, si la concentración de DMSO aumenta, la variación de fluorescencia durante la reacción enzimática disminuye.

Para evitar que el DMSO en la lámina afecte a la señal, se lleva a cabo una evaporación del disolvente previa a la reacción de marcaje.

- **Preparación de la lámina**

La lámina sensora tenía una duración muy corta. En la **Tabla 6.6** se observan las señales obtenidas con la misma lámina en días distintos, durante una misma semana. Como puede observarse, el área y la altura disminuyen con el tiempo. Puede deberse a que la enzima no quedó suficientemente atrapada en el gel y se perdió en el exterior, lo que se comprobó conservando una lámina en tampon y haciendo espectros de la disolución.

Con el fin de mejorar la retención de la enzima en la lámina, se modificó el procedimiento de preparación de la lámina. Como el marcador se une a la enzima mediante el grupo succinimida, se pensó en unir a la enzima a través de ese grupo un componente que interviniera en la polimerización. De esta manera, la enzima quedaría más atrapada en la lámina porque formaría parte de ella. El componente elegido fue el N-succinimidil acrilato, que se añade a la enzima ChOx junto con el marcador SE, para que ambos se unan a la enzima y con esta disolución se forme la lámina.

Día	$S_{\Delta F}$	$F_{\max}-F_0$
1	22.86	0.103
4	16.14	0.075
5	5.13	0.028
6	3.98	0.022

Tabla 6.6 Señales de área y altura en la reacción de ChOx-SE con Ch, obtenidas por la misma lámina sensora en días distintos. [ChOx-SE]=27.8 UI, [Ch]= $4.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, $t_{\text{iny. Ch}}$: 5 min.

Se probaron diferentes proporciones de enzima-acrilato, encontrando que una relación molar de 1:10 ofrecía buenos resultados. La **Tabla 6.7** muestra los resultados obtenidos con la misma lámina sensora durante 1, 3 y 6 días. Como se observa, las señales son similares, indicando ya que la enzima se encuentra atrapada en el sensor.

Día	$S_{\Delta F}$
1	27.9
3	34.2
6	30.3

Tabla 6.7 Señales de área en la reacción de ChOx-SE con Ch, obtenidas por la misma lámina sensora en días distintos. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [Ch]= $4.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, $t_{\text{iny. Ch}}$: 5 min.

- **Tiempo de inyección**

Al trabajar con la lámina en continuo, primero se hace pasar el portador (tampon carbonatos pH 9.0) a través de la celda de flujo. A continuación, el

analito se bombea durante un tiempo, al que llamamos tiempo de inyección (t_{iny}) y finalmente se bombea de nuevo el portador.

La **Figura 6.17 B** muestra la influencia del t_{iny} sobre el área de la señal, indicando que el área depende del t_{iny} . Para tiempos superiores a 5 min, los resultados tienden a un valor constante y las mejoras en la señal son nulas. Por lo tanto, se consideró 3 min como un buen compromiso entre tiempo de análisis y señal obtenida.

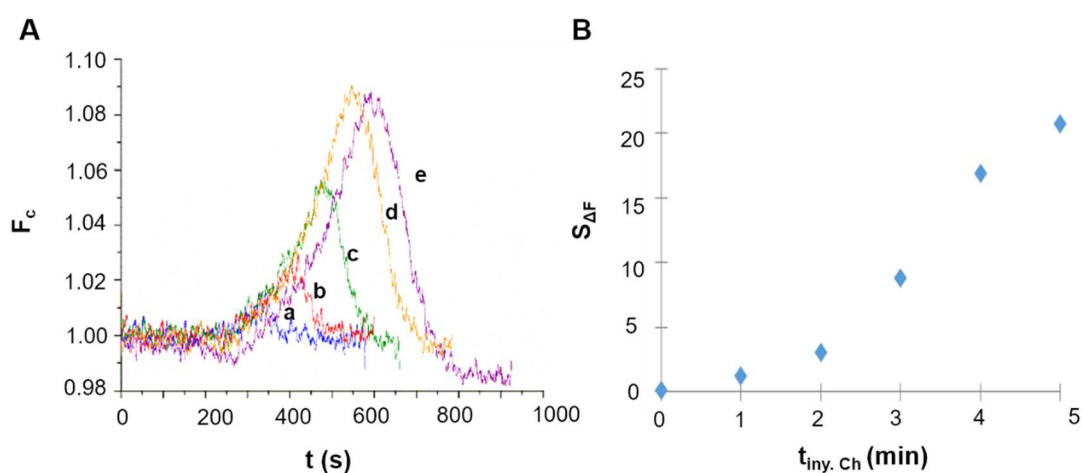


Figura 6.17 A) Estudio de tiempos de inyección de Ch, con inmovilización de ChOx-SE en la lámina, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [Ch]= $4.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, $t_{\text{iny, Ch}}$: **a.** 1 min, **b.** 2 min, **c.** 3 min, **d.** 4 min, **e.** 5 min. **B)** Influencia del tiempo de inyección sobre el área de la señal.

Como se puede observar, los perfiles de las señales obtenidas son diferentes a los que se obtienen en disolución, ya que en este caso, además de producirse la reacción enzimática, el analito debe difundir en el interior de la membrana, por lo que el perfil de subida es más lento que el obtenido en disolución.

Para mejorar la sensibilidad, se podría utilizar la reacción ChOx-SE con Ch con el modo de parada de flujo (Stop-Flow). La **Figura 6.18** muestra la señal obtenida a una $[\text{Ch}]=8.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹. **(a)** Se obtiene tras inyección de 5 min de Ch sin parada posterior de flujo (área calculada $S_{\Delta F}=28.95$) y **(b)** se

obtiene mediante 5 min de inyección de Ch con parada de flujo posterior de 20 min (área calculada $S_{\Delta F}=203.16$).

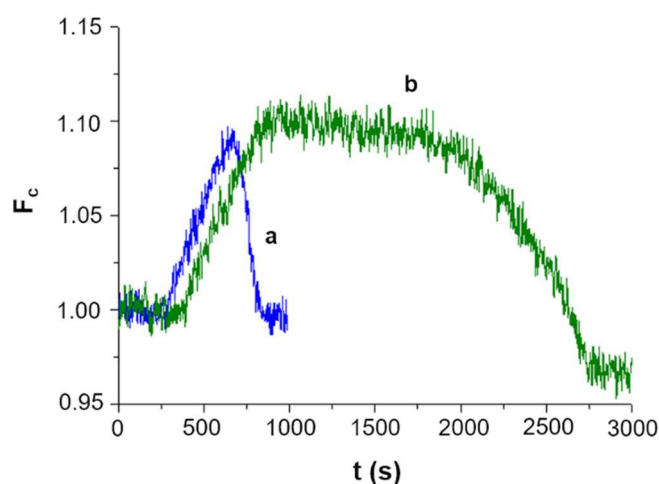


Figura 6.18 Estudio de la reacción sin y con parada de flujo, con inmovilización de ChOx-SE en la lámina, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [Ch]= $8.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, $t_{iny. Ch}$: **a.** 5 min, **b.** 5 min + 20 min en parada de flujo.

Por otro lado, la pendiente de subida no depende del tiempo de inyección (como se puede observar en las figuras anteriores) para la misma concentración de analito.

6.4.4.3 Características analíticas

Bajo las condiciones seleccionadas, se obtuvieron las figuras de mérito. La **Figura 6.19 A** muestra el estudio de calibración de Ch midiendo la fluorescencia a las longitudes del marcador CFTM 405S SE. Utilizando como parámetro $S_{\Delta F}$, la dependencia con la concentración se muestra en la **Figura 6.19 B**. Se observa que si bien no es lineal, existe un corto intervalo de concentraciones entre $2.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ y $4.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, en que sí lo es ($y=132204x-21.371$). La RSD fue del 4.2%, para una [Ch] de $4.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ (n=4).

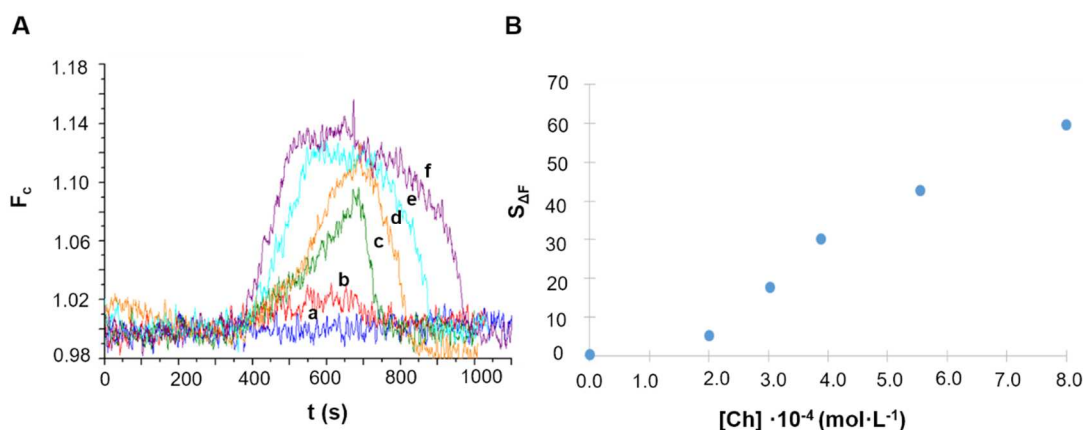


Figura 6.19 A) Estudio de calibración de Ch, con inmovilización de ChOx-SE en la lámina, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE. $[\text{ChOx-SE}] = 27.8 \text{ UI}$, pH 9.0, $\lambda_{\text{exc}} 380 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} 430 \text{ nm}$, $\text{caudal}_{\text{Ch}} 1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $t_{\text{iny. Ch}} 3 \text{ min}$. $[\text{Ch}] = \text{a. Blanco, b. } 2.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{c. } 3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{d. } 4.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{e. } 5.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{f. } 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **B)** Influencia de la $[\text{Ch}]$ sobre el área de la señal.

Para ampliar el rango, se podría ajustar la representación a la ecuación correspondiente pero, como se puede observar en la **Figura 6.19 A**, la pendiente de subida de la señal depende de la concentración, haciéndose mayor a medida que ésta aumenta, por lo que se evaluó la posibilidad de hacer la calibración utilizando como parámetro analítico esa pendiente, resultados que se muestran en la **Figura 6.20**.

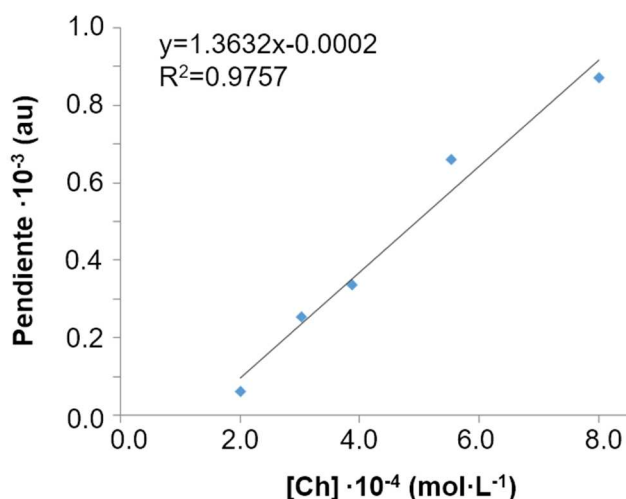


Figura 6.20 Calibración utilizando la pendiente como parámetro analítico respecto a la $[\text{Ch}]$, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE.

Como se puede ver, los resultados son satisfactorios; existe una relación lineal ($y=1.3632x-0.0002$) ampliándose el rango de respuesta lineal hasta $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, con una RSD para una $[\text{Ch}]$ de $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 4.8% ($n=4$).

Esta opción reduce considerablemente el tiempo de análisis, puesto que no es necesario dejar que la reacción concluya, ya que solo se necesita obtener la pendiente de subida.

6.4.5 Sensor de fosfato de colina (ChoP)

Para desarrollar un sensor para la determinación de ChoP, se debe inmovilizar además de la ChOx, la enzima AP. Si bien no se han podido concluir todos los estudios sobre este sensor, se han querido incluir en esta Memoria los resultados obtenidos porque son muy alentadores y los primeros obtenidos en nuestro grupo con la inmovilización de dos enzimas.

Cuando se determinó ChoP en disolución, se utilizaba en concentración de $40.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$. En este caso, en primer lugar, se probó en inmovilizar en la lámina una $[\text{AP}]$ de $100.0 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$, un valor algo superior al óptimo en disolución y $[\text{ChOx-SE}]=27.8 \text{ UI}$.

La **Figura 6.21** muestra la señal obtenida para $[\text{ChoP}]$ de $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (a). Aunque se obtuvo una señal muy baja (en comparación a la señal obtenida para la misma $[\text{Ch}]$ de $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (b), este primer resultado fue muy alentador. Por un lado indicaba que ambas enzimas se habían inmovilizado en la lámina, por otro, que ChoP difundía a través de la lámina, y por último, que ambas reacciones enzimáticas se estaban produciendo simultáneamente en ella.

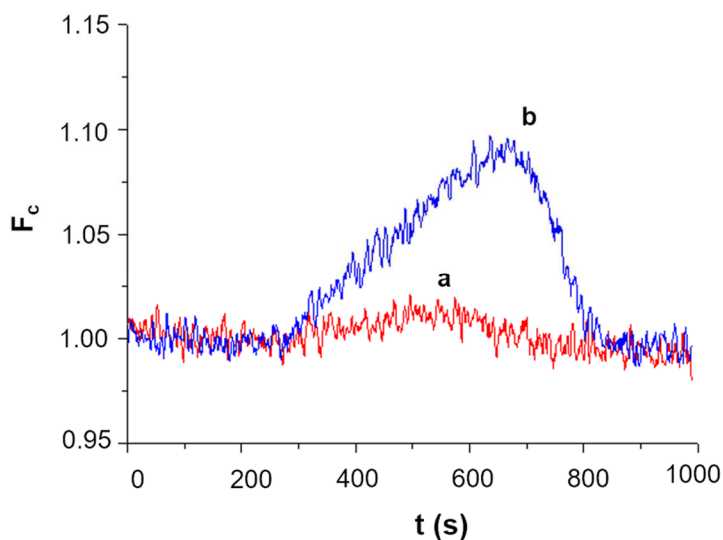


Figura 6.21 Estudio de la reacción sin parada de flujo (no Stop-Flow), con inmovilización de las enzimas ChOx-SE y AP en la lámina, medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [AP]=100 UI·mL⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, t_{iny} . 5 min. **a.** [ChoP]=8.0·10⁻⁴ mol·L⁻¹, **b.** [Ch]=8.0·10⁻⁴ mol·L⁻¹.

Con el fin de mejorar la señal obtenida, se estudió la influencia de la enzima AP, mostrando los resultados en la **Tabla 6.8**.

[AP] UI·mL ⁻¹	100	200	400
S_{ΔF}	5.7	18.2	21.3

Tabla 6.8 Señales de área en la reacción de AP, ChOx-SE con ChoP, obtenidas por la misma lámina sensora. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [ChoP]=8.0·10⁻⁴ mol·L⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, t_{iny} . ChoP: 5 min.

El área S_{ΔF} y la variación de fluorescencia dependen directamente de la [AP]. La máxima concentración probada fue de 400 UI·mL⁻¹. Se eligió ese valor como óptimo, aunque también podría haberse utilizado una [AP] de 200 UI·mL⁻¹.

Se realizó la optimización del tiempo de inyección para la determinación de ChoP, obteniendo resultados similares a los anteriores, por lo que 5 min fue elegido como tiempo suficiente para que se lleve a cabo el transcurso de la reacción.

Se realizó una calibración de ChoP. Si como parámetro analítico se toma el $S_{\Delta F}$ bajo cada señal, se obtienen los resultados que se observan en la **Figura 6.22**, que al igual que ocurría para Ch, es una curva.

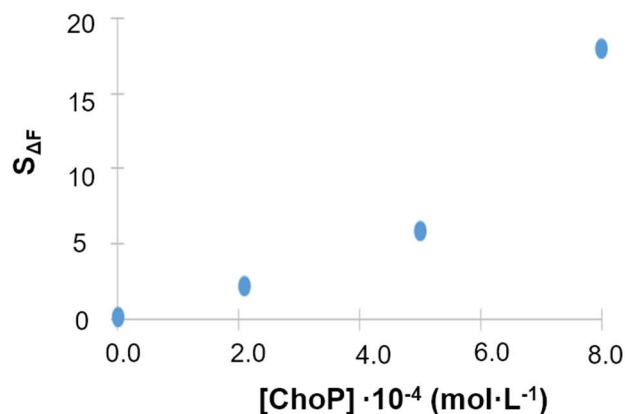


Figura 6.22 Estudio de calibración de ChoP en la reacción con AP y ChOx-SE inmovilizadas. Relación molar enzima-acrilato 1:10. [ChOx-SE]=27.8 UI, [AP]=400 UI·mL⁻¹, pH 9.0, λ_{exc} 380 nm / λ_{em} 430 nm, caudal_{Ch} 1.0 mL·min⁻¹, $t_{iny. Ch}$ 5 min.

La calibración utilizando las pendientes de subida de la señal se muestra en la **Figura 6.23** con buenos resultados.

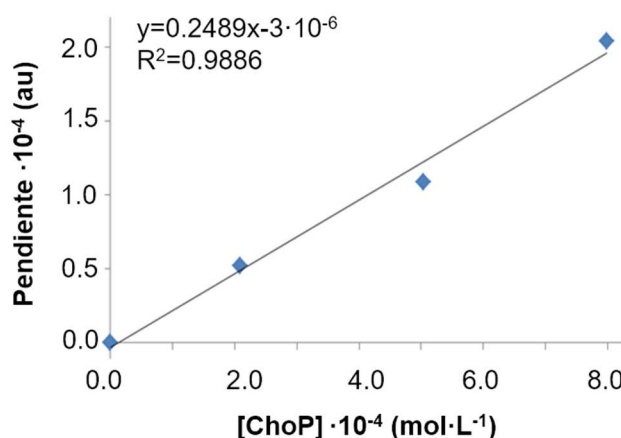


Figura 6.23 Calibración utilizando la pendiente como parámetro analítico respecto a la [ChoP], medido a las longitudes de onda del CFTM 405S SE.

El rango lineal de concentración fue de $2.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ a $8.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ (máxima concentración probada). La precisión RSD para una [ChoP] de $8.0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ (n=3) fue del 5.2%.

CHAPTER 7

THESIS SUMMARY

7.1 SCOPE

There is no single technique to fully address the analysis of lipidome, but usually a combination of different experimental approaches. The choice of the appropriate technique and method will depend on the objective of the analysis and on knowing its starting hypotheses and limitations. From each technique, different types and levels of information on the molecular structure of lipids can be obtained, with varying degrees of sensitivity and selectivity.

This Thesis aims to evaluate the viability of two techniques and to develop new analytical methodologies for the analysis of different classes of lipids and their individual molecular species, in complex samples from different matrices:

- A platform based on High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) with densitometry and coupled with tandem-MS techniques has been developed for the separation of lipid classes and structural identification of their individual molecular species, i.e. classes from neutral lipids, sphingolipids and phospholipids, in various samples related to lipidomics and complex industrial mixtures.

Although column-based LC-MS is mostly used in lipidomics, development of HPTLC-MS may help to overcome some disadvantages of column-based LC-MS approaches and complement the information obtained by this technique because TLC inherent properties and the possibility of improving MS analysis.

- A methodology based on the fluorescence of flavoenzymes which have flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor. This approach is an alternative when one wants to determine a single lipid (or class), and a previous separation is not necessary to perform, but to look for selectivity towards that lipid/class. In this work, we applied this methodology for the analysis of phospholipids that contain a choline phosphate residue.

7.2 DEVELOPMENT OF A PLATFORM BASED ON HPTLC COUPLED TO DENSITOMETRY AND TO TANDEM-MS/HRMS

The platform consists of the following successive steps, which are carried out on the same chromatographic plate, either silica gel or reverse phase one, after automated application of the sample by means of a spray-on nebulization system:

1. Automated Multiple Development (AMD) which was performed in steps, with decreasing solvent strength in combination with increasing migration distances (md, in mm). The possibility of band refocusing increases separation efficiency.

AMD2 development is an interesting alternative for challenging separations or compound-class separations in complex mixtures. The separation of poorly resolved zones in a chromatogram of studied lipid-containing samples was improved by optimization of the gradient (solvents, solvent composition, number of steps and time of drying).

2. Detection of lipid-classes by densitometry, either by UV at 190 nm or by induced-fluorescence using primuline post-chromatographic impregnation. This allows detection of lipid-long hydrocarbon chains to be performed through weak, non-covalent interactions.

The concentration of primulin used allows to modulate the sensitivity of lipid signal. Densitometric detection has been used in this work not for performing semi-quantitative analysis, but for evaluating the efficiency of separation in lipid classes and for fixing band(s) coordinates to MS transfer.

3. On-line, direct transfer of each plate-separated band to an Ion-Trap Mass Spectrometer (IT-MS) or to a Time of Flight quadrupole (QTOF), through a portable interface. This allows automatic band extraction and on-line elution in seconds.

The eventual use of primulin does not interfere in the subsequent acquisition of MS spectra from the plate because the interactions it establishes

with the lipids are weak, and because its MW range is lower than those of the lipids studied.

7.3 INFORMATION OBTAINED FROM THE MS SPECTRA OBTAINED FROM THE CHROMATOGRAPHIC PLATE. NOVELTY OF THE APPROACH.

ESI-MS

Each class of lipids separated on a silica gel plate as a band and transferred through the interface shows its corresponding distribution of sodium adducts sodium (in ESI⁺), whose formation is favoured in the experimental conditions used in the operation of the platform.

Although ions obtained in the spectrum of each band may provide a structural pre-identification of the lipid species, an unambiguous identification of species is not possible “sensu stricto” if it is not confirmed by MS/MS or HRMS.

The distribution of ions obtained, however, constitutes a semi-quantitative profile that provides a relative percentage of the participation of each species in the corresponding lipid class. This is due to the fact that the gradient of solvents used in the AMD instrument is evaporated after separation, and, later, the extraction with the interface is carried out with a single solvent (MeOH in our case) which guarantees that the ionization will be carried out in the same mobile phase composition conditions for each species. Therefore, the response factors of the species of the same lipid class will be very similar, since they depend fundamentally on the polar head group.

ESI-MS/MS (MSⁿ)

Recording of exploitable MS/MS spectra (in general, MSⁿ) of lipids directly from the plate, has until now been impeded by the ubiquitous presence of sodium ions during the chromatographic process, which causes poor fragmentation of the isolated ions and their coexistence with protonated ions, complicating or preventing the structural interpretation of the product-ions.

IT-MS allows the possibility of multistage tandem analysis (MS/MS...MSⁿ). This Thesis shows that it is possible to obtain working conditions so that the sodium adducts, formed in ESI-MS from a wide variety of lipids, can be fragmented in positive ESI mode, directly from the plate, and that the sodium remains as the charge of stable ionic fragments. These have been useful for unequivocal structural identification of ions in complex samples, through the fragmentations obtained in the MSⁿ spectra by the selection of CID conditions, i.e. ion-precursor, window width, mass tolerance and fragmentation voltage, so that mostly sodium adducts are formed.

This has proved to be quite general for a wide number of lipid classes from the plate, as demonstrated by the MSⁿ (ESI⁺) spectra of compounds such as: sphingolipids (sphingomyelins, SM; globotriaosylceramides, Gb₃; and lyso-globotriaosylceramides, lyso-Gb₃); neutral lipids (monoacylglycerides, MG; and diacylglycerides, DG); and phospholipids (phosphatidylcholines, PC; and cardiolipins, CL). Likewise, this analytical system is compatible for ionization in negative mode (ESI⁻) of some members of these families that did not show an adequate ionization in positive mode (fatty acids, FA; phosphatidylethanolamines, PE; and phosphatidylglycerols, PG).

HRMS

Alternative on-line coupling of HPTLC-densitometry with a quadrupole Time of Flight (QTOF) allows recording of high resolution spectra to be obtained from the separated bands, which provide mass exact identification of lipids.

7.4 APPLICATIONS

This platform has been applied to three analytical problems of interest, which are related to: neutral sphingolipids in human plasma; neutral lipid impurities in Fatty Acid-Methyl Esters (FAME-biodiesel); and phospholipids in membranes of photosynthetic bacteria. They were selected because they cover different fields of interest related to lipidomics, and an energy-related industrial sample. The different levels of lipid concentrations present in the

matrices illustrate a variety of real analytical situations and exemplify the functions of the lipids present in the lipidome. These analytical problems have not been addressed previously using the proposed technique.

Analyses involve sample preparation, AMD separation in lipid-classes, semi-quantitative profiles of each class (ESI-MS), and subsequent structural identification of their individual molecular species by ESI-MSⁿ / HRMS.

A) Separation, profiling and individual identification of molecular species of neutral sphingolipids in human plasma, which are considered biomarkers of Lysosomal Storage Diseases (LSD), are described in Chapter 3.

LSD are characterized by accumulation of sphingolipids in body fluids and many tissues, and are caused by deficiency of several enzymes. They have acute neurological, cardiological and renal consequences. Original analytical techniques are required for diagnosis and treatment monitoring of LSD.

In this work, we have focused on sphingomyelins (SM), related to Niemann-Pick disorder, and on globotriaosylceramides (Gb₃) and globotriaosylsphingosines (lyso-Gb₃), which are both considered as biomarkers of Fabry's disease.

Neutral SL were isolated from plasma using a standardized sample preparation procedure which includes centrifugation, hydrolysis and extraction. Subsequently, samples were applied on a silica gel plate and submitted to AMD.

AMD separation into families was the basis for further profiling and band identification by MS directly from the plate, using the interface. A nine-step DCM-MeOH gradient was selected for a general separation of SL, according to their polarity and number of sugar units. Five of nine steps were used to obtain an adequate refocusing of Gb₃. Densitometry was carried out in UV mode at 190 nm.

Chromatogram of plasma sample from both a healthy individual and a Fabry patient shown, under the above conditions, two bands which were identified by tandem-MS.

SM molecular species

The band at md 16.7 mm corresponds to pure SM class. Its HPTLC-ESI⁺-MS spectrum shows no globosides, and displays the profile of sphingomyelins in human plasma. The most important SM molecular species detected were the sodium adducts of d18:1;C16:0 (m/z 725) and d18:1;C24:1 (m/z 835). The other sodium adducts found in the SM profile were those of d18:1;C18:0 (m/z 753), d18:1;C20:0 (m/z 781), d18:1;C22:0 (m/z 809) (**Figure 7.1 A**).

This pre-identification was confirmed by MS/MS. For example, the HPTLC-ESI⁺-MS/MS spectrum of the abundant precursor ion at m/z 725 [C₃₉H₇₉N₂O₆P+Na]⁺ showed ion products at m/z 666 [M-N(CH₃)₃+Na]⁺ and m/z 542 [M-phosphocholine+Na]⁺ (isolation width m/z 4 and voltage amplitude 0.4 V).

In a similar way, the HPTLC-ESI⁺-MS/MS spectrum of the precursor ion at m/z 835 [C₄₇H₉₃N₂O₆P+Na]⁺, showed ion-products at m/z 776 [M-N(CH₃)₃+Na]⁺ and m/z 652 [M-phosphocholine+Na]⁺ under the same conditions.

The stability of the sodium adducts of SM was so high that it allowed consecutive fragmentations to be achieved in IT-MS. The achievable kinetic energy of the precursor ion fell in the range of low energy collision-induced dissociation. This resulted in the cleavage of the most labile bonds when reaching a certain threshold energy. This explains the loss of the trimethylamine and phosphocholine groups in SM.

Gb₃ molecular species

Although the band 2 at md 28.4 mm was not a pure class, it was however possible to pre-identify molecular species of Gb₃ in the plasma of a Fabry patient through its HPTLC-ESI⁺-MS spectrum. The mass signals obtained corresponded to sodiated adducts d18:1;C24:0 (m/z 1158), d18:1;C22:0 (m/z

1130), d18:1;C20:1 (m/z 1100), d18:1;C18:0 (m/z 1074), and the most preponderant form d18:1;C16:0 (m/z 1046) (**Figure 7.1 B**).

The HPTLC-ESI⁺-MS/MS spectrum of the most abundant ion at m/z 1046 [$C_{52}H_{97}NO_{18}+Na$]⁺ showed a product ion at m/z 885 which corresponded to the loss of one hexose group [M -hexose+ Na]⁺. Under low-energy collision conditions using IT-MS, the product-ions of glycosphingolipids were generated by glycosidic bond cleavages. This confirms identity of Gb₃ species. Examples of consecutive fragmentation patterns: HPTLC-ESI⁺-MS/MS, -MS³ and -MS⁴ spectra) of Gb₃, Gb₄, lyso-Gb₃ standards are described in **Chapter 3**.

It is remarkable that molecular species of Gb₃ were detected in a Fabry's patient plasma. In a healthy plasma control, Gb₃ species were under LOD.

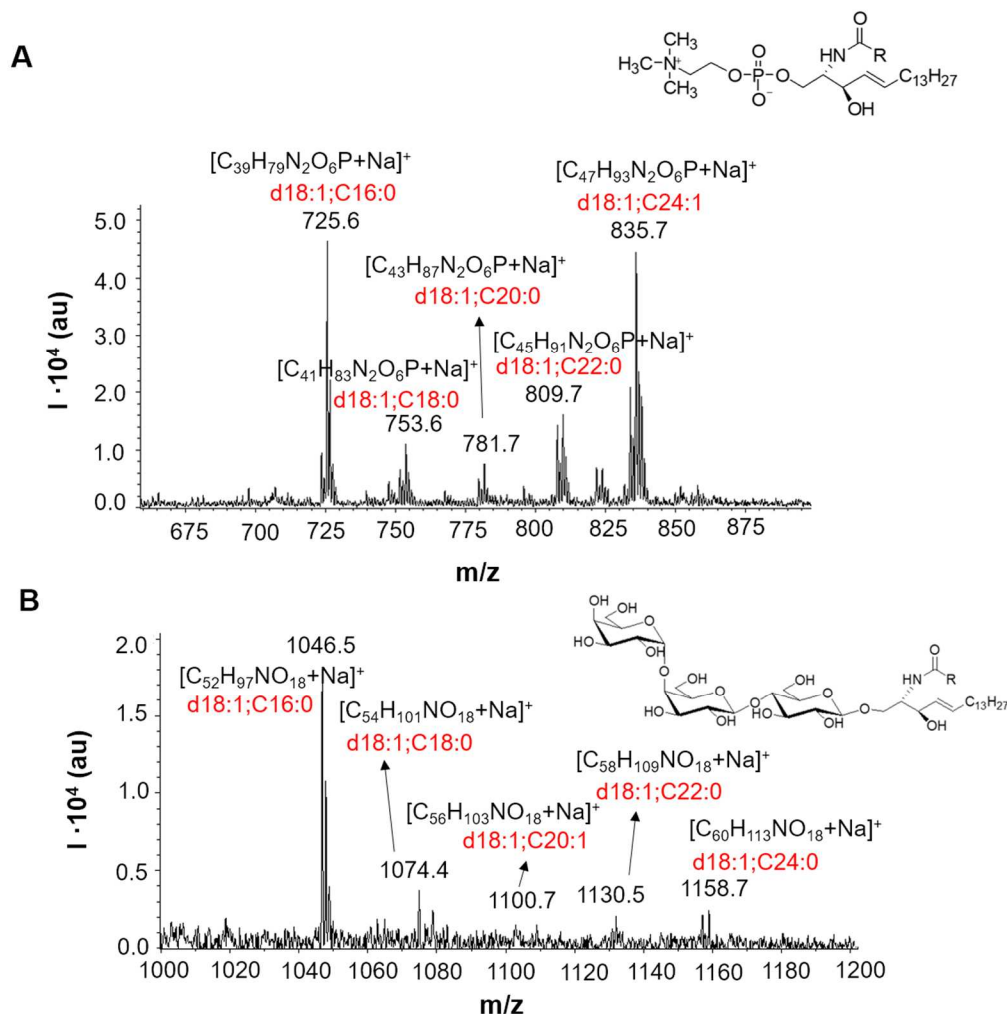


Figure 7.1 HPTLC-ESI-MS spectrum (in positive mode) of the **A**) SM's profile and **B**) Gb₃'s profile on the extract of human plasma.

Lyso-Gb₃

Lyso-Gb₃ was not detected in the organic phase extracted from the plasma. According to its size and polarity, it could be hypothesized that it would pass to the aqueous phase during sample preparation step. A variant of the Folch's method was developed for extracting the aqueous phase.

It was demonstrated that the plasma aqueous extract can be submitted to AMD reversed-phase separation on a RP-18W (C18) plate, using a gradient based on MeOH-AcOEt-H₂O, with previous acid-plate pre-conditioning (HAc 1N). Detection was carried out by videodensitometry at UV (254 y 366 nm) white light, primulin, and β -naphtol post-impregnations.

Lyso-Gb₃ was also not detected in aqueous phase.

Lyso-Gb₃ standard shows the same MS fragmentation pattern than that of the other studied sphingolipid standards, at a similar concentration range.

B) Separation, profiling and individual identification of individual molecular species of neutral lipids of different clases in biodiesel are detailed in Chapter 4.

FAME-derived biodiesel is made of renewable sources, mostly composed of mono-alkyl esters of fatty acids. A fatty-acid methyl ester contents lower than 98 wt% indicates inappropriate reaction conditions and the presence of impurities in the final product, including monoacylglycerides (MG), diacylglycerides (DG), and free fatty acids (FA), among others. It can be used in its pure form, referred to as FAME or B100, or blended with diesel fuel in different proportions (BX, with X being the volume percent of FAME in the mixture).

Composition and percentages of lipid impurities affect the performance of biodiesel, and are important for establishing their quality specifications. MG can lead to severe problems in the engine, such as formation of deposits on injection nozzles. MG maximum tolerated concentration in biodiesel is 0.8 wt%

In a previous study, MG were separated from the other constituents of a FAME-biodiesel sample using a 3-step gradient based on the use of *tert*-butyl methyl ether, DCM and *n*-heptane.

We show in this Thesis that the addition of a further step (DCM-*n*-heptane 9:1 v/v) and the modification of mds enabled the separation of several lipid classes, i.e. MG at md 15.4 mm, FA at md 24.2 mm, and DG at md 41.4 mm. The combination of incremental development, stepwise gradient and zone focusing led to narrow bands in a highly reproducible way (± 0.5 mm standard deviation of the lipids, md). The HPTLC chromatogram of FAME-derived biodiesel showed the lipid impurities (< 2 wt%) from md 10.0 to 80.0 mm. The main components corresponding to FAMES (> 98 wt%) as well as the diesel peak (in BX) migrated at md > 80.0 mm. Detection was performed after post-impregnation with primulin (0.02 wt%), which generated an intensified fluorescence measured at λ_{exc} 365 nm and emission collection at λ_{em} > 400 nm.

MG molecular species

The HPTLC-ESI⁺-MS spectrum of band 1, at md 15.4 mm, in FAME-derived biodiesel displayed a profile consisting of MG sodiated ions with different FA chains in their structures. They corresponded to C18:2 (m/z 377), C18:0 (m/z 381), and C20:0 (m/z 409), and their respectively oxidized forms based on C18:2 (m/z 393), C18:1 (m/z 395), and C20:1 (m/z 423) (**Figure 7.2 A**).

The most abundant ions at m/z 379 and m/z 395 corresponded to the monoglycerylolate sodium adduct $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4 + \text{Na}]^+$ and its oxidized form $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_5 + \text{Na}]^+$. The HPTLC-ESI⁺-MS spectrum of the monoglycerylolate standard and the HPTLC-ESI⁺-HRMS spectrum confirmed these assignments.

HPTLC-ESI⁺-MS^{*n*} with consecutive fragmentations also confirmed identity. The precursor ion at m/z 379 was isolated (width m/z 2; voltage amplitude 0.55V). The corresponding spectrum displayed ion-products at m/z 361 and predominantly at m/z 333, which corresponded to ions derived from the loss of H₂O or two CH₂ groups. The precursor ion at m/z 333 was isolated next (width m/z 2; voltage amplitude 0.65V). The HPTLC-ESI⁺-MS³ spectrum

of the product ion at m/z 333 showed the corresponding losses of mainly H_2O (m/z 315) or two CH_2 groups (m/z 305).

DG molecular species

The profiling and characterization of DG in the FAME-derived biodiesel (band 3 at md 41.4 mm) was performed in a similar way. The respective HPTLC-ESI⁺-MS spectrum displayed the sodiated molecules at m/z 643 [$C_{39}H_{72}O_5+Na$]⁺, m/z 659 [$C_{39}H_{72}O_6+Na$]⁺, m/z 673 [$C_{40}H_{74}O_6+Na$]⁺, and m/z 687 [$C_{41}H_{76}O_6+Na$]⁺, which corresponded to the profile of DG in FAME-derived biodiesel (**Figure 7.2 B**). For HPTLC-ESI⁺-MS/MS, the most abundant ion at m/z 643 was selected as precursor ion (width m/z 2; voltage amplitude 0.4 V), producing product ions at m/z 613, m/z 584, m/z 554 and m/z 526 that corresponded to the loss of H_2O and CH_2 groups.

Free FA molecular species

The band 2 at md 24.2 mm was assigned as FA in the FAME-derived biodiesel. Its HPTLC-ESI⁻-MS spectrum displayed the deprotonated $[M-H]^-$ ions that corresponded to a typical FA profile. The deprotonated oleic acid [$C_{18}H_{34}O_2-H$]⁻ at m/z 281 was the preponderant FA. Other FA, such as C16:0 (m/z 254), C18:2 (m/z 279), C20:0 (m/z 311), and C22:0 (m/z 339), were identified in the sample profile (**Figure 7.2 C**). The respective HPTLC-ESI⁻-HRMS spectrum of band 2 in FAME-derived biodiesel allowed to unequivocally identify oleic acid by exact mass. On the other hand, the HPTLC-ESI⁻-MS/MS spectrum of the precursor ion at m/z 281 in the biodiesel (width m/z 2; voltage amplitude 1.3 V) confirmed the identity and provided similar fragmentation as the oleic acid standard. The fragments obtained from m/z 281 corresponded to the loss of H_2O and CH_2 groups.

The use of HPTLC-fluorescence densitometry-MS under the described conditions may be useful to distinguish biodiesel from different origins (animal, vegetal). It may be used for a semi-quantitative characterization of the molecular species that constitute the lipid impurities of a biodiesel.

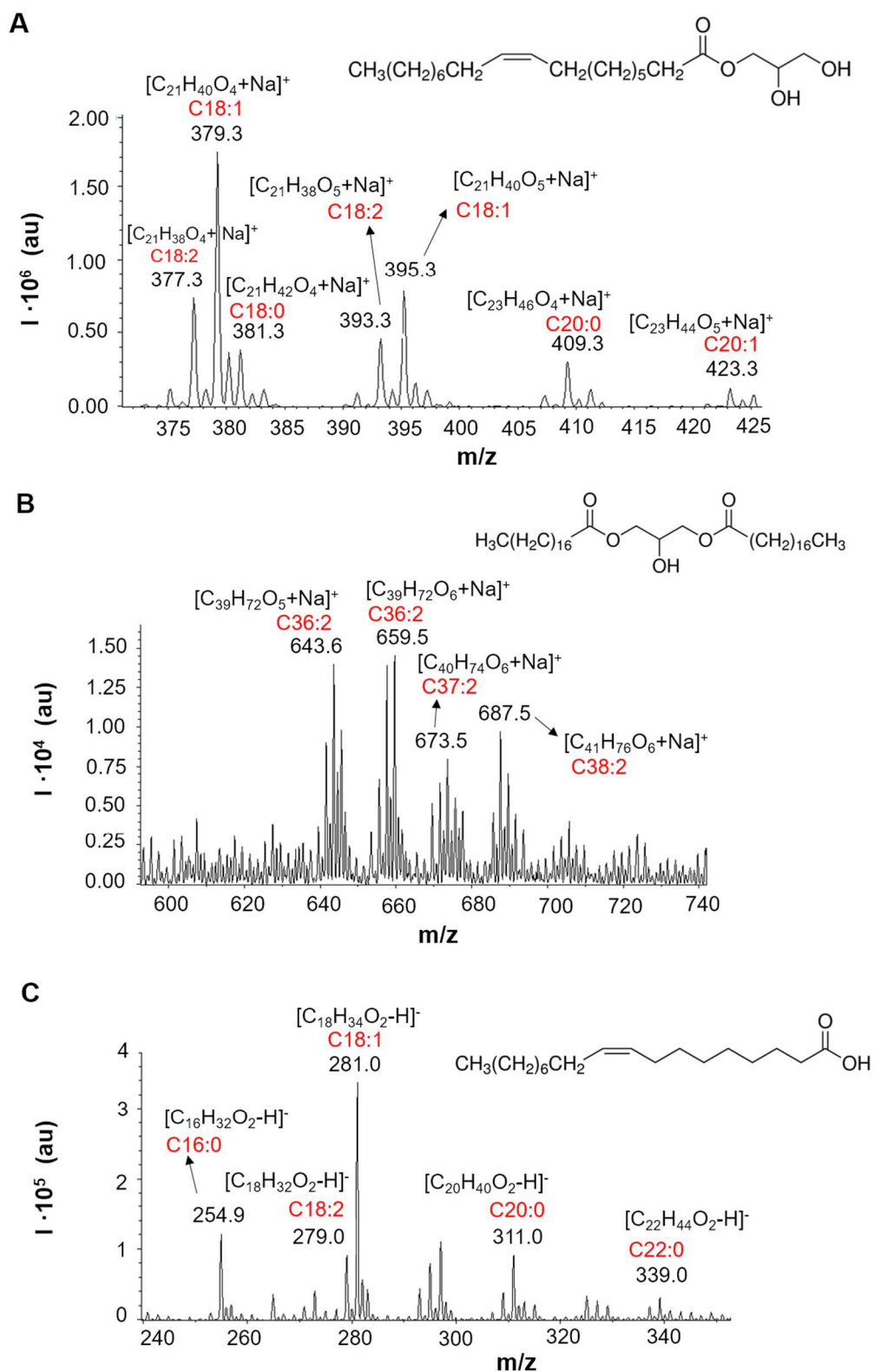


Figure 7.2 HPTLC-ESI-MS spectrum **A)** of the detail of MG's profile (in positive mode), **B)** of DG's profile (in positive mode) and **C)** of FA's profile (in negative mode), on FAME.

C) Identifications of phospholipids (PL) bound to membrane proteins in photosynthetic purple bacteria: *Rhodobacter (Rb.) blasticus*, *Rhodospirillum (Rd.) rubrum* and *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis*, as well as the purified photosynthetic complex (RC-LH1-pufX) of this last bacterium were described in Chapter 5.

HPTLC-MS can help to identify the PL individual molecular species of the following classes: PC (phosphatidylcholines), PG (phosphatidylglycerols), PE (phosphatidylethanolamines) and CL (cardiolipins), which may affect function and to improve crystallization of membrane proteins.

The lipids that surround MP in biological membranes play an important role in the activity of these proteins, directly influencing their stability. They can modify the compactness of the Protein-Detergent-Lipid complex and change the shape and resolution of MP-crystals.

Photosynthetic membranes from *Rd. rubrum*, *Rb. blasticus* y *Rbc. bogoriensis* were prepared, solubilized using dodecyl β -maltoside (DDM) and purified by standardized methods.

Rbc. bogoriensis was cultured in aerobic (A) and anaerobic (B) conditions. Likewise, RC-LH1-PufX complex was isolated from *Rbc. bogoriensis*.

Extracts were solved in CH₂Cl₂-MeOH (1:1, v/v), and samples and standards were applied in duplicate on HPTLC silica gel plates as 4 mm-bands, using the ATS4 system. Conditions using Automated Multiple Development (AMD) were studied to provide phospholipid-classes as separated bands. Thus, a 7-step gradient was selected based on MeOH-H₂O-AcOEt, with HAc (1N) plate pre-conditioning. Bands were detected at 190 nm by densitometry and videodensitometry (UV-366 nm). These conditions: allow an adequate separation of PL classes to be performed; provides a sodiated medium for ESI⁺; and favours the coupling with MS via interface.

Taking into account md of PL standards, the corresponding plate zones were perforated using a 2x4 mm-oval head interface, as in the other

applications studied in this Thesis. However, as chromatograms do not show adequate resolution and a matrix effect was noticed, a verification of the elution limits for each PL class in samples was inspected by MS. Selected zones were: PC (11-13 mm), PE (29-34 mm), CL (39-41 mm), PG (45-49 mm).

Concerning PL standards, HPTLC-ESI⁺ spectra of PC and CL showed sodium adducts ($[M+Na]^+$ and $[M-2H+3Na]^+$, respectively), and they were fragmented using tandem MS. PE and PG standards were preferably ionized in negative mode. CL standard can also be ionized in negative mode. Further identification of individual molecular species belonging to each PL class can be obtained by MS/MS. HPTLC-ESI-MS spectra of standards showed an adequate stability over time and correct ion intensities when compared with ionization in solution.

PL species found in membrane extracts of studied bacteria are summarized in **Table 7.1**.

The number of species found using HPTLC-MS was higher to those found in another experiment, based on LC-MS, performed under the same membrane extracts in another laboratory.

Formation of sodiated background clusters $[Na^+(CH_3-COONa)_{n1}, (HCOONa)_{n2}, (con\ n1, n2 \geq 0)]$, with $m/z\ \Delta=82$ for sodium acetate and $m/z\ \Delta=68$ for sodium formate], and sample ion clusters $[M+Na]^+(CH_3-COONa)/[M+Na]^+(HCOONa)$, were considered as artifacts for spectra interpretation.

The RC-LH1-PufX complex from *Rbc. bogoriensis* shows abundant PC species at m/z 822.6 [PC(37:2)]; m/z 808.6 [PC(36:2)]; m/z 850.5 [PC(39:2)], and m/z 700.5 [PC(28:0)]. Concerning PG, the most abundant species were PG(36:2), at m/z 773.3. Other molecular species with lower intensities were PG(34:4) at m/z 742.3, and PG(33:4) at m/z 727.3.

Some detected chains of fatty acids show an odd number of carbon atoms. This fact has already been described several times in the case of other non-sulfurous purple bacteria.

<i>Rb. blasticus</i>				
	m/z	Molecular species	Ionization forms	Molecular formula
PC	808.4	(36:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.4	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
PG	773.2	(36:2)	[M] ⁻	[C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P] ⁻
	747.1	(34:1)		[C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P] ⁻
	668.6	Lyso-PG (30:6)		[C ₃₆ H ₆₀ O ₉ P] ⁻

<i>Rd. rubrum</i>				
	m/z	Molecular species	Ionization forms	Molecular formula
PE	742.2	(36:2)	[M-H] ⁻	[C ₄₁ H ₇₈ O ₈ PN-H] ⁻
	688.2	(32:1)		[C ₃₇ H ₇₂ O ₈ PN-H] ⁻

<i>Rbc. bogoriensis A</i>				
	m/z	Molecular species	Ionization forms	Molecular formula
There are no identified species				

<i>Rbc. bogoriensis B</i>				
	m/z	Molecular species	Ionization forms	Molecular formula
PC	808.6	(36:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.6	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
	822.7	(37:2)		[C ₄₅ H ₈₆ O ₈ PN+Na] ⁺

RC-LH1-PufX complex				
	m/z	Molecular species	Ionization forms	Molecular formula
PC	822.6	(37:2)	[M+Na] ⁺	[C ₄₅ H ₈₆ O ₈ PN+Na] ⁺
	808.6	(36:2)		[C ₄₄ H ₈₄ O ₈ PN+Na] ⁺
	850.5	(39:2)		[C ₄₇ H ₉₀ O ₈ PN+Na] ⁺
	700.5	(28:0)		[C ₃₆ H ₇₂ O ₈ PN+Na] ⁺
	782.0	(34:1)		[C ₄₂ H ₈₂ O ₈ PN+Na] ⁺
PG	773.3	(36:2)	[M] ⁻	[C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P] ⁻
	742.3	(34:4)		[C ₄₀ H ₇₀ O ₁₀ P] ⁻
	727.3	(33:4)		[C ₃₉ H ₆₈ O ₁₀ P] ⁻

Table 7.1 Molecular PC, PE and PG identified species in bacterial extracts and purified complex.

Chromatographic identification of cardiolipin species is a complex problem. Experiments using LC-MS (ESI⁻) conducted by another research group did not lead to the identification of CL species in the membrane extracts of *Rb. blasticus*. We try to deepen this problem using HPTLC-MS, and found that:

- Chromatographic development on the plate does not involve oxidation of CL.

- CL standard and a sample of oxidated CL standard were ionized (ESI⁻) in an identical manner from a solution and from the chromatographic plate.
- No CL species were identified in ESI⁻ in any of the extracts studied or in the *Rbc. bogoriensis* complex.
- In the case of ESI⁺, two ions, at m/z 1347.7 and 1074.9, were identified in the *Rb. blasticus* extract, which could correspond to $\text{CL}[\text{C}_{69}\text{H}_{118}\text{O}_{17}\text{P}_2-2\text{H}+3\text{Na}]^+$ and $\text{CL}[\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_{17}\text{P}_2-2\text{H}+3\text{Na}]^+$ structures, respectively. Both ions, also observed both in the spectra of the CL standard in solution and in those obtained from the plate, do not seem to come from "cluster" artifacts, nor from the chromatographic plate itself. However, its MS/MS fragmentation could not be explained.

7.5 COMMENTS ON THE PROPOSED TECHNIQUE

Separation using HPTLC (AMD) provides lipid-classes as narrow peaks enough to ensure a direct elution and transfer of the plate zones. This technique may have a special practical interest in certain circumstances, as in the rapid, targeted characterization of hot bands in the desired zone of the plate. Therefore, the spatial selectivity provided by HPTLC-MS made it a useful complementary technique to LC-MS for lipid analysis.

Moreover, HPTLC-MS may help to overcome certain limitations of column-based LC-MS methods. LC-MS systems are designed to process large amount of data, and get all the information in a single experiment. Once a manipulation starts, it cannot be stopped. Likewise, runs are expensive in time and solvent. Thus, expensive mass spectrometric recording of unknown samples with negative findings may be reduced to a minimum using HPTLC-MS.

Likewise, in LC-MS technology, ionization is carried out directly from the gradient-based mobile phase whose composition varies with retention time. In the case of HPTLC-MS, the post-chromatographic elimination of the mobile phase and the subsequent extraction of the interface with a single solvent

guarantee the same starting conditions for the ionization of all the molecular species in a lipid class.

The described technique also benefits from the general advantages of the HPTLC, such as high sample throughput and parallel screening. Likewise, the flexibility, the low relative cost and the particular features through the planar format of the described technique may contribute to renew interest in a technique as popular in the field of lipids as HPTLC.

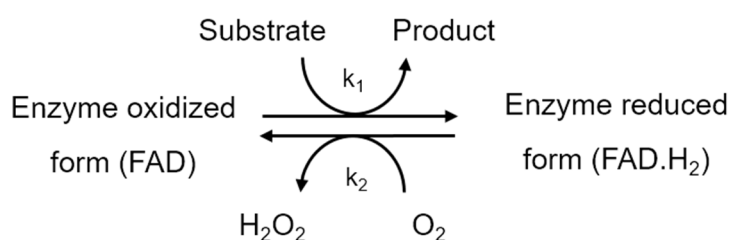
7.6 ANOTHER POINT OF VIEW: ENZYMATIC SELECTIVE METHODS

An alternative to separation methods to determine a single analyte (or family of analytes) is the development of selective analytical methods for the corresponding target.

These methods are based on the choice of receptor molecules which react in a selective way with the analyte and therefore generate a signal.

Enzymes having FAD as cofactor (flavoenzymes) are very interesting receptors since they present optical properties that are modified during the reaction with the corresponding substrate. The mechanism by which flavoenzymes catalyze the oxidation of substrates can be summarized in

Scheme 7.1:



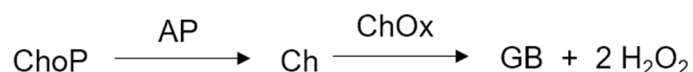
Scheme 7.1 Mechanism by which the flavoenzymes catalyze the oxidation of substrates.

As indicated, the flavin group of the enzyme oxidizes the substrate to the product while it is reduced to FAD.H₂; then, the oxygen regenerates the FAD, and simultaneously H₂O₂ is formed. This reaction can be monitored using the following alternatives:

1. Variation of fluorescence at the FAD wavelengths.
2. Variation of fluorescence at the tryptophan (trp) wavelengths.
3. Variation of fluorescence at the wavelengths of a fluorescent probe coupled with the enzyme.

The use of enzymatic methodology based on flavoenzymes provides two important advantages: it does not require the addition of more reagents than the enzyme involved in the reaction, which acts as an indicator of the reaction it catalyzes (self-indicating systems). On the other hand, the enzyme is regenerated during the process so it can be used several times. Consequently, it is very interesting to be implemented in optical biosensors.

The analytical possibilities of this methodology in the determination of phospholipids having a choline residuo/rest/group (Ch-PL) in their structure were studied, focusing on the choline phosphate (ChoP, metabolite derived from phosphatidylcholine). The reaction scheme is as follows (**Scheme 7.2**):



Scheme 7.2 Enzymatic reactions carried out for the determination of ChoP. Enzymes involved in the process: AP and ChOx. (GB: glycine betaine).

Choline fosfate (ChoP) reacts with alkaline phosphatase enzyme (AP) to produce choline (Ch) which, in turn, reacts with choline oxidase flavoenzyme (ChOx), producing changes in fluorescence wich are related to the analyte concentration.

This methodology was used for the determination of Ch or for the combined determination of both analytes (Ch and ChoP), either jointly or sequentially. An example of determination in infant milk formula is shown.

Since both enzymes are regenerated, the possibility of developing a self-indicating sensor is also explored.

7.6.1 Ch and ChoP determination in solution

The method was developed using a plate reader. ChOx and ChOx-FS spectra should be considered to select excitation and fluorescence filters. 420 nm and 530 nm were selected as λ_{exc} and λ_{em} , respectively for ChOx, and 440 nm λ_{exc} / 530 nm λ_{em} , for ChOx-FS.

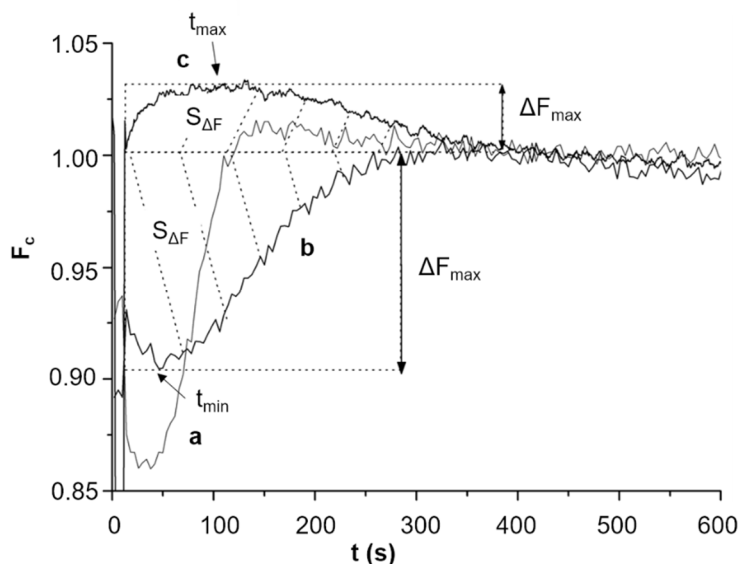
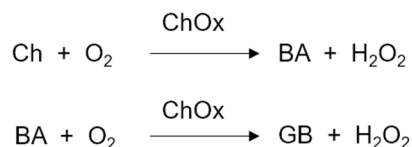


Figure 7.3 Variation in fluorescence intensity over time during the enzymatic reaction.

Figure 7.3 (a) shows the corrected fluorescence intensity variation (F_c) during choline/choline oxidase (Ch/ChOx) reaction, using the plate reader. The initial fluorescence decay is mainly due to the oxidation of Ch to BA. The later increase appears when the whole BA is oxidized to GB (**Scheme 7.3**).



Scheme 7.3 Reaction steps in the Ch oxidation (BA: betaine aldehyde, GB: glycine betaine).

Since the kinetic of the FAD.H₂ formation is faster than that of the FAD regeneration, while substrate is present in the solution, the reduced form is the preponderant species and the fluorescence intensity remains low. When the

whole substrate (Ch and BA) has been oxidized, then the FAD becomes the predominant species and the initial fluorescence intensity is recovered.

When ChoP is the analyte, both enzymatic reactions are carried out simultaneously. Initially, Ch is not present in the solution. It is slowly liberated during the previous enzymatic hydrolysis with alkaline phosphatase (AP), so the fluorescence variation vs. time shows the profile indicated in **Figure 7.3 (b)**. A comparison between **(a)** and **(b)** reveals that the ChoP hydrolysis is slower than the Ch to BA oxidation (the fluorescence decay at the beginning of the reaction is much faster in **(a)**). As **Figure 7.3 (b)** shows, several parameters could be used as the analytical parameters for ChoP determination, namely the area of the signal ($S_{\Delta F}$), the maximum variation of fluorescence intensity (ΔF_{\max}) and the reaction time necessary for the minimum value of the signal to appear (t_{\min}).

When ChOx was chemically modified with fluorescein (FS), and fluorescence was measured at the FS wavelengths, the fluorescence vs. time representation was nearly a mirror image but with positive fluorescence values (**Figure 7.3 c**) with regard to that shown in **Figure 7.3 (b)**. This behavior was previously explained. Briefly, ChOx flavin group absorbs at the same wavelength as FS. Then, flavin produces an inner filter effect on the FS fluorescence. As FAD has a higher molar absorptivity than that of FAD.H₂, when flavin is in the oxidized form, the inner filter effect is higher than in the reduced form; this means that the ChOx-FS fluorescence intensity at FS wavelengths is higher when flavin is in the reduced form.

An optimization of AP and ChOx concentrations, and pH was carried out. Likewise, ChoP and Ch calibrations were performed into selected FAD and FS wavelengths. The results are shown in **Table 7.2**.

	Calibration line [ChoP] or [Ch] (mol·L ⁻¹)	Range (mol·L ⁻¹)	RSD (%)
ChOx	$S_{\Delta F} = 0.13_{(\pm 3.5)} + 1.27_{(\pm 2.0)} \cdot 10^6 [\text{ChoP}]$ $r=0.999$	$5.2 \cdot 10^{-7}$ a $1.0 \cdot 10^{-5}$ (a)	3.7% (n=4)
	$\Delta F_{\text{máx}} = 0.003_{(\pm 3.5)} + 1.34_{(\pm 2.0)} \cdot 10^4 [\text{ChoP}]$ $r=0.993$	$5.2 \cdot 10^{-7}$ a $5.2 \cdot 10^{-6}$	4.8% (n=4)
ChOx-FS	$S_{\Delta F} = 0.47_{(\pm 3.5)} + 2.41_{(\pm 2.0)} \cdot 10^5 [\text{ChoP}]$ $r=0.999$	$5.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-4}$ (a)	4.2% (n=4)
	$\Delta F_{\text{máx}} = 0.004_{(\pm 3.5)} + 8.60_{(\pm 2.0)} \cdot 10^2 [\text{ChoP}]$ $r=0.989$	$5.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-5}$	5.0% (n=4)
	$S_{\Delta F} = 1.96_{(\pm 3.5)} + 1.57_{(\pm 2.0)} \cdot 10^5 [\text{Ch}]$ $r=0.998$	$9.2 \cdot 10^{-6}$ a $1.0 \cdot 10^{-4}$ (a)	4.1% (n=4)

(a) Maximum concentrations tested

Table 7.2 Figures of merit for ChoP and Ch determination using ChOx and/or ChOx-FS fluorescence in the ChoP optimal conditions.

In many samples containing ChoP, Ch is also present as a constituent. Since Ch also reacts with ChOx, the method described can be adapted for a combined determination of both analytes. **Figure 7.4** shows a $F_c=f(t)$ profile obtained when ChOx-FS and AP are sequentially added to a solution containing a Ch+ChoP mixture. After ChOx-FS addition, only the Ch present in the solution reacts (first maximum). When the ChOx-FS fluorescence returns to the initial value (which means that the Ch reaction is over), the subsequent addition of AP starts the ChoP reaction, giving the second maximum.

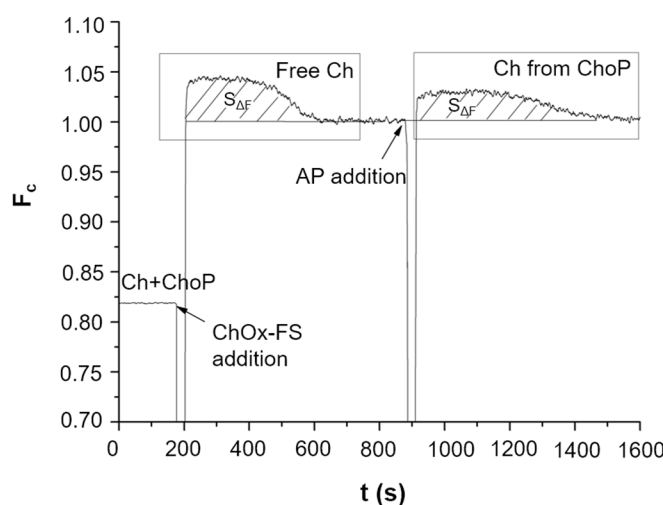


Figure 7.4 Fluorescence intensity variation over time during the sequential enzyme reaction of a sample containing Ch and ChoP measured at FS wavelengths.

To carry out the determination in infant milk formula, the standard addition method was used. The sample is prepared following a simple method, by adding both standards before the separation treatment and correcting the spectral interference by measuring at label wavelengths. The results obtained were $0.157 \pm 0.013 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of free Ch and $0.022 \pm 0.002 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of ChoP in milk ($n = 3$), in agreement with results from the literature.

A recovery study was also performed. Concentrations of Ch and ChoP were added to the solution obtained before centrifugation, which were submitted to the described procedure. Recovery of 93% for Ch and 95% for ChoP were obtained.

7.6.2 Biosensor results

When developing a biosensor, enzymes must be immobilized in a support that allows the analyte to enter to produce the reaction. The support will be based on an acrylamide/bis-acrylamide gel which absorbs in the ultraviolet region. Therefore, this study will be carried out in the visible region of the spectrum, working with the enzyme modified with a fluorescent label.

It was necessary to choose another label whose excitation spectrum is overlapped to excitation spectrum of FAD in ChOx at pH 9.0. This is because, at pH 9.0, the excitation maximum of FAD experiences a hypsochromic shift of about 50 nm (to 400 nm) compared to its absorption spectrum. This is not observed at other pH. At this pH there is not an overlap between the excitation spectra of FAD and fluorescein (FS) so there is not an inner filter.

The selected label was CFTM 405S, succinimidyl ester (SE). In its 3D excitation spectrum in solution, the maximum of emission is 430 nm. Likewise, it has four maxima of excitation: 250, 280, 380 and 410 nm. Two of them, 380 and 410 nm, are overlapped to FAD excitation spectrum at pH 9.0.

For continuous measurements, the flow cell (which includes the biosensor film inside) was placed in the fluorimeter. At pH 9.0, a carbonate solution was flowed to $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and fluorescence intensity was monitored to 430 nm (λ_{exc} 380 nm). When signal stabilization was reached, a prefixed volume of analyte

solution was injected and variations of signal were monitored. After the run was completed, carbonate solution was flowed again.

Exclusive immobilization of ChOx-SE provides a choline biosensor. A joint immobilization of ChOx-SE and AP provides a ChoP biosensor (**Figure 7.5**).

In order to improve the obtained signal, influence of the AP concentration, injection time, DMSO effect, preparation of film or Stop-Flow measuring mode was studied.

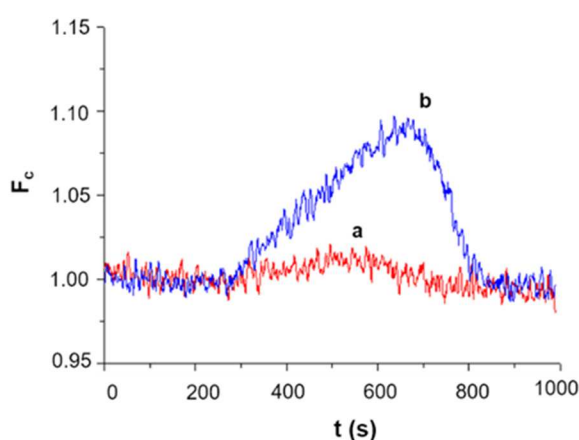


Figure 7.5 Study of the reaction without Stop-Flow, with Chox-SE and AP enzymatic immobilization in the sensor film, measured at the wavelengths of the CF™ 405 S. **a.** [ChoP]= $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, **b.** [Ch]= $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Calibration using slopes is recommended because it extends the response range and reduces the time of analysis.

The obtained results are satisfactory; in the best conditions the calibrations were:

- For Ch, linear relationship, $y=1.3632x-0.0002$, linear response range from $2.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, with a RSD of 4.8% ($n = 4$) (for [Ch]= $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
- For ChoP, linear relationship, $y=0.2489x-3 \cdot 10^{-6}$, linear response range from $2.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, with a RSD of 5.2% ($n=3$) (for [ChoP]= $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

CHAPTER 8

GENERAL CONCLUSIONS

GENERAL CONCLUSIONS

- HPTLC of lipid complex mixtures (e.g. biodiesel) and lipidome-related samples (e.g. human plasma, bacterial membranes), using gradient-based AMD and on-line sequential coupling to densitometry (UV, Fluorescence) and to MS (IT-MS/QTOF) allow to obtain:

- A separation into lipid-classes or subclasses.
- A semi-quantitative lipid profiling within each class by ESI-MS.
- A direct structural determination of individual lipids and their molecular species by Tandem-MS/HRMS, on a single chromatographic plate.

- Separation using HPTLC (AMD) provides lipid-classes as narrow peaks enough to ensure a direct elution and transfer of the plate zones to obtain both semi-quantitative composition profiles of each class by ESI-MS, and identification of individual lipids and molecular species belonging to each separated lipid class by MS/MS (MS^n) and/or HRMS. As the zones of interest on the plate can be selectively transferred to the ESI-MS instrument via an elution-based interface, a rapid, relevant structural information about molecular species can be obtained. The interface allowing the connection of the separated zones on the plate with the IT-MS/QTOF equipment is portable. Operation is completed within a minute or even seconds.

- Identification of molecular species of different neutral lipid-, sphingolipid- and phospholipid-derived classes in the samples can be achieved by ESI in positive mode and by MS^n or HRMS, owing to the stability of sodiated ion adducts formed, or in negative mode.

- ESI⁺-MS of the species of a given class of lipids from the HPTLC plate provides stable sodium adducts and a homogeneous ionization since, after elimination of the chromatographic mobile phase, they are extracted by the interface with a single solvent.

- The respective sodium adducts of the above-mentioned ESI-MS spectra can be fragmented in the positive ion mode using IT-MS technology. The sodium remained the charge of their fragment ions, thus being useful for their structural identification by MS/MS (MS^n) through further fragmentation. Thus, it is feasible to obtain exploitable MS^n (and HRMS-QTOF) spectra, quickly, reliably and simply, from the bands separated on the plate. The spectra obtained showed good intensity and quality.

- Fragmentation patterns of lipids from standards and real samples in both ESI (positive and negative) modes, from silica gel chromatographic plate are similar to those described in solution. Likewise, useful information on fragmentation pathway of lipids in lipidomic samples can be obtained. The stability of the sodium adducts was so high that it allowed consecutive fragmentations to be achieved by low-energy CID, with cleavage of the most labile bonds when reaching a certain threshold energy.

- This platform was applied and methods were developed to three analytical problems of interest:

1. Separation, profiling and individual identification of molecular species of neutral sphingolipids in human plasma.

- Thus, sphingomyelins (SM) and globotriaosylceramides (Gb₃) were separated using a 9-step DCM-MeOH AMD-gradient and detected by UV densitometry at 190 nm.

- Five SM molecular species were detected as sodium adducts, of which d18:1;C16:0 (m/z 725, $[C_{39}H_{79}N_2O_6P+Na]^+$) and d18:1;C24:1 (m/z 835, $[C_{47}H_{93}N_2O_6P+Na]^+$) were the most abundant. Identification was confirmed by MS/MS by the loss of trimethylamine and phosphocholine groups in ion-CID fragmentation.

- Likewise, five Gb₃ molecular species were detected as sodium adducts in the plasma of a Fabry's patient, of which d18:1;C16:0 (m/z 1046, $[C_{52}H_{97}NO_{18}+Na]^+$) was the most preponderant one. In a healthy plasma control, Gb₃ species were under LOD. The identity of Gb₃ species were

confirmed by MS/MS, where the product-ions of glycosphingolipids were generated by glycosidic-bond cleavages.

2. Separation, profiling and individual identification of individual molecular species of neutral lipid impurities in Fatty Acid-Methyl Ester (FAME-biodiesel).

- Monoacylglycerides (MG), diacylglycerides (DG) and free fatty acids (FA) were separated between them and from FAME and diesel peaks, using a 4-step gradient based on *tert*-butyl methyl ether (TBME), DCM and *n*-heptane, and detection by primulin-induced fluorescence (λ_{exc} 365 nm / λ_{em} >400 nm).

- MG profile displays seven sodiated ions, of which, the most abundant correspond to monoglycerylolate sodium adduct (m/z 379, $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4+\text{Na}]^+$) and its oxidized form (m/z 395, $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_5+\text{Na}]^+$). HPTLC-ESI⁺-MS² and MS³ and HRMS spectra confirmed MG assignments.

- In a similar way, four sodiated DG species were detected and identified, of which C36:2 (m/z 643, $[\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{O}_5+\text{Na}]^+$) was the most abundant.

- Five free FA were detected as deprotonated $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions by HPTLC-ESI⁻, and their identity confirmed by MS/MS and HRMS. The deprotonated oleic acid $[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2-\text{H}]^-$ at m/z 281 was the preponderant FA.

- The use of HPTLC-fluorescence densitometry-MS under the described conditions may be useful to distinguish biodiesel from different origins (animal, vegetal). It may be used for a semi-quantitative characterization of the molecular species that constitute the lipid impurities of a biodiesel.

3. Identifications of phospholipid-molecular species (PL) bound to membrane proteins in photosynthetic purple bacteria were carried out on membrane extracts from *Rhodobacter (Rb.) blasticus*, *Rhodospirillum (Rd.) rubrum* and *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis*, as well as the purified photosynthetic complex (RC-LH1-pufX) of this last bacterium.

- Phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylglycerols (PG) and cardiolipins (CL) were separated using a 7-step

AMD-gradient based on MeOH-H₂O-AcOEt, with HAc (1N) plate pre-conditioning. Bands were detected at 190 nm by densitometry and videodensitometry (UV-366 nm).

- In *Rb. blasticus*, two molecular species of PC (36:2 and 34:1) and PG (36:2 and 34:1) were mostly found by HPTLC-ESI⁺, as sodium adducts, and ESI⁻, as [M]⁻, respectively. In *Rd. rubrum*, two PE molecular species (36:2 and 32:1) were found by HPTLC-ESI⁻, as deprotonated ions.

- Some PC molecular species were mostly found by HPTLC-ESI⁺ in the *Rbc. bogoriensis* membrane extract and, more concentrated, in its purified RC-LH1-PufX complex. The most abundant ones were the sodiated adducts at m/z 822.6 [PC(37:2)] and m/z 808.6 [PC(36:2)]. Concerning PG, the preponderant species was [M]⁻ at m/z 773.3, which corresponds to PG(36:2).

- HPTLC-densitometry-Tandem MS provides either a chromatogram (densitometry) or image (videodensitometry) and an online transfer to MS that offers the selective advantage of accessing to the desired areas of the plate in a fast and selective manner. Therefore, this technique provides a spatial dimension complementary to the temporal dimension provided by LC-MS. As only the zones of interest are transferred to MS, the presence or absence of a given lipid class can be confirmed, or relevant information about the sample can be rapidly obtained, with considerable savings in solvents and in analysis time, since the interface operates in seconds.

ANOTHER POINT OF VIEW: ENZYMATIC SELECTIVE METHODS

- Enzymatic reactions of flavoenzymes are a choice for the development of self-indicating selective methods to determine specific lipids or lipid families.

- Developed methods are quick and simple because:

- Selectivity is provided by the enzymatic reaction, thus avoiding long sample treatments and separation stages. When the lipid cannot react directly with the flavoenzyme, the strategy to achieve it is to release any part of it through other enzymatic reactions.

- On the other hand, as flavoenzymes are self-indicators, therefore detection stages can be avoided.

A) Measurements in solution

- The previous statements were shown in this report with regard to choline phosphate (ChoP) determination. ChoP is a by-product of phosphatidylcholine (PC) which is released after its reaction with a lipase (PLC).

- ChoP reacts with alkaline phosphatase (AP) releasing choline (Ch) which in turn reacts with choline oxidase (ChOx). Reaction conditions were optimized to avoid the need for incubation stages. In this case, both reactions occur simultaneously.

- Changes in ChOx fluorescence during the reaction, either intrinsic (from FAD wavelengths) or extrinsic (from fluorescein (FS)-label wavelengths), allowed ChoP to be determined without adding any other reagents than those involved in the reaction.

- After method optimization, linear response interval is wider and repeatability is higher in the case of the Area is used as an analytical signal. Likewise, method is less time-consuming whether fluorescence variation is used. Thus, Area or fluorescence variation can be selected depending on the analytical purpose.

- This method is sensitive to Ch and therefore allows the joint determination of Ch and ChoP. Both analytes can be sequentially determined in a single assay by modifying the order of addition of the reagents.

- Since ChoP and Ch are water soluble, their determination in infant milk formula only required a simple sample treatment which involved sample dissolution in aqueous solution, centrifugation and filtration. Existing spectral interferences mostly came from riboflavin and tryptofan in milk, and were resolved working at pH 9.0 and measuring at Chox-FS excitation/emission wavelengths. Quantification was performed after calibration by the standard addition method.

- Measurements were carried out using an equipment designed for reading in well plates, which proved to be useful for performing enzymatic measurements given the small volumes used and the considerable savings in reagents.

B) Sensors

- As ChOx and AP are regenerated after enzymatic reaction, several measurement cycles can be carried out. This allowed the analytical method to be implemented in the form of a sensor. Viability of developed sensors were studied using Ch and ChoP standards. Immobilization of ChOx in acrylamide/bis-acrylamide allowed manufacturing a Ch sensor.

- To accomplish this, ChOx has to be labeled to avoid spectral interferences. The label selected was CFTM 405S succinimidyl ester, which has, when immobilized, a fluorescence spectrum overlapped with that of FAD at pH 9.0.

- ChOx was directly linked to acrylate to improve the immobilization of the enzyme in the film. In this way, ChOx is part of its structure. The optimal ratio is 1:10 enzyme-acrylate.

- Signal Area depends on the injection time. Adequate signals are obtained using an injection time of 3 min. Stop Flow method may be used when necessary to improve sensitivity.

- Calibration was done by representing slope (fluorescence variation vs. time) vs. Ch concentration. This involves faster measurements with regard to those from Area determination.

- Additional manufacturing of a ChoP sensor was also carried out, after optimizing experimental conditions, through the joint immobilization of AP and ChOx-SE in an acrylamide/bis-acrylamide film.

ANEXOS

A1. SECUENCIAS DE DESARROLLO CROMATOGRÁFICO ESTUDIADAS

1) Identificación de especies moleculares de SL en plasma humano; el problema de la liso-Gb₃ (Sección 3.3.8.1)

DESARROLLO	t_{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL - FASE REVERSA (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)		md (mm)	t_{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
CUBETA VERTICAL	20 min	20x10	NO	8.0	1	MeOH	EtOAc	50.0	4	NO	CUBETA VERTICAL: NO HAY SUFICIENTE EFICACIA EN LA SEPARACIÓN.
AMD 2	1 h 17 min	20x10	SI	8.0	8	MeOH		H ₂ O		NO	DESARROLLO CROMATOGRÁFICO EN AMD2 SÓLO CON MeOH-H ₂ O. No hay buena separación de bandas.
						100.0		0.0	11.0		
						91.4		8.6	16.0		
						82.9		17.1	21.0		
						74.3		25.7	26.0		
						65.7		34.3	31.0		
						57.1		42.9	36.0		
						48.6		51.4	41.0		
						40.0		60.0	46.0		
AMD 2	1 h 31 min	20x10	SI	8.0	9	MeOH		H ₂ O		NO	ADICIÓN DE UNA ETAPA 100% MeOH. No facilita el movimiento de SL.
						100.0		0.0	12.0		
						100.0		0.0	15.0		
						91.4		8.6	20.0		
						82.9		17.1	25.0		
						74.3		25.7	30.0		
						65.7		34.3	35.0		
						57.1		42.9	40.0		
						48.6		51.4	45.0		
						40.0		60.0	50.0		

DESARROLLO	t_{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL - FASE REVERSA (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)			md (mm)	t_{seco} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 43 min	20x10	NO	8.0	8		MeOH	H ₂ O			NH ₃	AUMENTO DE H ₂ O EN 2ª ETAPA. Liso-Gb ₃ soluble en H ₂ O. Acondicionamiento entre etapas en CONDICIONES BÁSICAS.
AMD 2	1 h 12 min	20x10	NO	8.0	7	n- hexano	MeOH	EtOAc	H ₂ O		NH ₃	HEXANO NO facilita la MIGRACIÓN DE LAS BANDAS.

DESARROLLO	t _{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL – FASE REVERSA (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)				md (mm)	t _{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 18 min	20x10	NO	8.0	7	MeOH	EtOAc	H ₂ O				NH ₃	DISMINUCIÓN ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES BÁSICAS. La banda que corresponde a Gb ₃ se desplaza hasta el final de la placa.
						40.0	0.0	60.0	50.0	10			
						60.0	40.0	0.0	11.0	2			
						80.0	20.0	0.0	16.0	3			
						100.0	0.0	0.0	21.0	4			
AMD 2	1 h 33 min	20x10	NO	8.0	8	MeOH	EtOAc	H ₂ O				NH ₃	AUMENTO ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES BÁSICAS. El tiempo de secado de la etapa 60% de H ₂ O baja a 8 min. Será necesario aumentarlo hasta 10 min.
						40.0	0.0	60.0	50.0	10			
						50.0	50.0	0.0	11.0	2			
						60.0	40.0	0.0	16.0	3			
						70.0	30.0	0.0	21.0	3			
AMD 2	1 h 33 min	20x10	NO	8.0	8	MeOH	EtOAc	H ₂ O				NH ₃	AUMENTO ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES BÁSICAS. El tiempo de secado de la etapa 60% de H ₂ O baja a 8 min. Será necesario aumentarlo hasta 10 min.
						80.0	20.0	0.0	26.0	3			
						90.0	10.0	0.0	31.0	4			
						100.0	0.0	0.0	36.0	4			
						90.0	0.0	10.0	31.0	4			
AMD 2	1 h 33 min	20x10	NO	8.0	8	MeOH	EtOAc	H ₂ O				NH ₃	AUMENTO ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES BÁSICAS. El tiempo de secado de la etapa 60% de H ₂ O baja a 8 min. Será necesario aumentarlo hasta 10 min.
						40.0	0.0	60.0	55.0	8			
						50.0	50.0	0.0	14.0	2			
						56.7	43.3	0.0	20.0	3			
						63.3	36.7	0.0	26.0	3			
AMD 2	1 h 33 min	20x10	NO	8.0	8	MeOH	EtOAc	H ₂ O				NH ₃	AUMENTO ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES BÁSICAS. El tiempo de secado de la etapa 60% de H ₂ O baja a 8 min. Será necesario aumentarlo hasta 10 min.
						70.0	30.0	0.0	32.0	3			
						76.7	23.3	0.0	38.0	4			
						83.3	16.7	0.0	44.0	4			
						90.0	10.0	0.0	50.0	4			

DESARROLLO	t_{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL - FASE REVERSA (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	N° ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)			md (mm)	t_{seco} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 27 min	20x10	NO	8.0	8		MeOH	EtOAc	H ₂ O	10	NH ₃	ACONDICIONAMIENTO entre etapas en CONDICIONES BÁSICAS. Gb ₃ y liso-Gb ₃ bien separado del punto de aplicación.
							40.0	0.0	60.0			
							50.0	50.0	0.0			
							60.0	40.0	0.0			
							70.0	30.0	0.0			
							80.0	20.0	0.0			
							90.0	10.0	0.0			
							100.0	0.0	0.0			
							90.0	0.0	10.0			
							50.0	0.0	50.0			
AMD 2	1 h 26 min	20x10	NO	8.0	8		MeOH	EtOAc	H ₂ O	10	HAc	ACONDICIONAMIENTO entre etapas en CONDICIONES ÁCIDAS. Gb ₃ y liso-Gb ₃ bien separado del punto de aplicación.
							40.0	0.0	60.0			
							50.0	50.0	0.0			
							60.0	40.0	0.0			
							70.0	30.0	0.0			
							80.0	20.0	0.0			
							90.0	10.0	0.0			
							100.0	0.0	0.0			
							90.0	0.0	10.0			
							50.0	0.0	50.0			
AMD 2	1 h 14 min	20x10	NO	8.0	7		MeOH	EtOAc	H ₂ O		HAc	ELIMINACIÓN ETAPA DEL DESARROLLO ANTERIOR. ACONDICIONAMIENTO entre etapas en CONDICIONES ÁCIDAS. Se consigue el mayor recorrido de las bandas de Gb ₃ y liso-Gb ₃ . Obtención de la SECUENCIA DEFINITIVA.
							40.0	0.0	60.0			
							45.0	55.0	0.0			
							58.8	41.2	0.0			
							72.5	27.5	0.0			
							86.3	13.7	0.0			
							100.0	0.0	0.0			
							90.0	0.0	10.0			
							50.0	0.0	50.0			
							45.0	55.0	0.0			

Tablas A1.1 Secuencias de desarrollo cromatográfico estudiadas para la identificación de liso-Gb₃ mediante separación HPTLC en fase reversa (**Sección 3.3.8.1**).

2) Identificación de PL unidos a proteínas de membrana en bacterias púrpuras fotosintéticas (Sección 5.3.3)

DESARROLLO	t_{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)				md (mm)	t_{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
CUBETA VERTICAL	20 min	20x10	NO	4.0	1	CHCl ₃	MeOH	HAc	H ₂ O	70.0	4	NO	CUBETA VERTICAL: NO HAY SUFICIENTE EFICACIA EN LA SEPARACIÓN.
CUBETA HORIZONTAL	20 min	10x10	NO	4.0	1	CHCl ₃	MeOH	HAc	H ₂ O	70.0	4	NO	CUBETA HORIZONTAL: NO HAY BUENA SEPARACIÓN. Picos anchos.

DESARROLLO	t _{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA ETAPAS (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)			md (mm)	t _{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 11 min	20x10	NO	4.0	6	MeOH	EtOAc	H ₂ O	7.0	4	NO	DESARROLLO CROMATOGRÁFICO AMD2. VARIACIÓN ETAPAS / DISOLVENTES en el desarrollo. En general sin acidular no hay buenas condiciones para ionización positiva.
						90.0	0.0	10.0				
						80.0	20.0	0.0				
						60.0	40.0	0.0				
						40.0	60.0	0.0				
						20.0	80.0	0.0				
AMD 2	1 h 15 min	20x10	NO	4.0	6	MeOH	DCM		10.0	4	NO	
						90.0	10.0					
						80.0	20.0					
						60.0	40.0					
						40.0	60.0					
						20.0	80.0					
AMD 2	1 h 37 min	20x10	NO	4.0	8	MeOH	DCM		10.0	4	NO	
						90.0	10.0					
						80.0	20.0					
						60.0	40.0					
						50.0	50.0					
						40.0	60.0					
AMD 2	1 h 37 min	20x10	NO	4.0	8	30.0	70.0		60.0	2	NO	
						20.0	80.0					
						0.0	100.0					

DESARROLLO	t _{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)			md (mm)	t _{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 11 min	20x10	NO	4.0	6	MeOH	EtOAc	H ₂ O	10.0	4	HAc	ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES ÁCIDAS. Buenas condiciones ionización positiva. VARIACIÓN del número de ETAPAS EN EL DESARROLLO. Mucha señal de fondo.
						90.0	0.0	10.0				
						80.0	20.0	0.0				
						60.0	40.0	0.0				
						40.0	60.0	0.0				
						20.0	80.0	0.0				
0.0	100.0	0.0										
AMD 2	1 h 18 min	20x10	NO	4.0	7	MeOH	EtOAc	H ₂ O	10.0	4	HAc	
						90.0	0.0	10.0				
						60.0	40.0	0.0				
						50.0	50.0	0.0				
						40.0	60.0	0.0				
						30.0	70.0	0.0				
20.0	80.0	0.0										
0.0	100.0	0.0										

DESARROLLO	t_{total} (h, min)	PLACA SÍLICA GEL (cm)	PRE- ACONDICIONAMIENTO PLACA THF	ANCHURA DE BANDA (mm)	Nº ETAPAS	DISOLVENTES (%v/v)				md (mm)	t_{secado} (min)	ACONDICIONAMIENTO ENTRE ETAPAS	OBSERVACIONES
AMD 2	1 h 32 min	20x10	SI	4.0	8		MeOH	EtOAc	H ₂ O			HAC	ETAPAS DE ACONDICIONAMIENTO en CONDICIONES ÁCIDAS. PREACONDICIONAMIENTO THF elimina posibles sustancias que puedan generar señales de fondo tras la elución. ELIMINACIÓN de la 2ª etapa del DESARROLLO que no interviene en la separación. Obtención de la SECUENCIA DEFINITIVA
							90.0	0.0	10.0	10.0	4		
							80.0	20.0	0.0	20.0	4		
							60.0	40.0	0.0	30.0	2		
							50.0	50.0	0.0	40.0	2		
							40.0	60.0	0.0	50.0	2		
							30.0	70.0	0.0	60.0	2		
							20.0	80.0	0.0	70.0	2		
							0.0	100.0	0.0	80.0	2		
							MeOH	EtOAc	H ₂ O				
AMD 2	1 h 18 min	20x10	SI	4.0	7		90.0	0.0	10.0	10.0	4	HAC	
							60.0	40.0	0.0	21.6	2		
							50.0	50.0	0.0	33.2	2		
							40.0	60.0	0.0	44.8	2		
							30.0	70.0	0.0	56.4	2		
							20.0	80.0	0.0	68.0	2		
							0.0	100.0	0.0	79.6	2		

Tablas A1.2 Secuencias de desarrollo cromatográfico estudiadas para la identificación de PL unidos a proteínas de membrana mediante separación HPTLC (**Sección 5.3.3**).

A2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kishimoto K, Urade R, Ogawa T, and Moriyama T. *Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: Suitable methods for "lipidome" analysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2001**. 281(3): p. 657-662.
- [2] Wenk MR. *Lipidomics: New Tools and Applications*. Cell, **2010**. 143(6): p. 888-895.
- [3] Yang K, Cheng H, Gross RW, and Han XL. *Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics*. Analytical Chemistry, **2009**. 81(11): p. 4356-4368.
- [4] Han XL and Jiang XT. *A review of lipidomic technologies applicable to sphingolipidomics and their relevant applications*. European Journal of Lipid Science and Technology, **2009**. 111(1): p. 39-52.
- [5] Han X. *Lipidomics: Comprehensive mass spectrometry of lipids*. Wiley & Sons, Inc. New Jersey, **2016**.
- [6] Christie WW and Han X. *Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. Oily Press, Bridgewater (UK), **2010**.
- [7] Murphy RC. *Tandem mass spectrometry of lipids: Molecular analysis of complex lipids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), **2014**.
- [8] Merrill AH and Sullards MC. *Opinion article on lipidomics: Inherent challenges of lipidomic analysis of sphingolipids*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, **2017**. 1862(8): p. 774-776.
- [9] Banerjee S and Mazumdar S. *Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte*. International Journal of Analytical Chemistry, **2012**.
- [10] Siuzdak G. *An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology*. 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. J Assoc Lab Autom, **2004**. 9(2): p. 50-63.
- [11] Oosterink JE and Schierbeek H. *Quadrupole versus linear iontrap for determination of tracers with LC/MS*. J. Appl. Bioanal., **2015**. p. 108-111.

- [12] Massey KA and Nicolaou A. *Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids*. Free Radical Biology and Medicine, **2013**. 59: p. 45-55.
- [13] Khalil MB, Hou WM, Zhou H, Elisma F, Swayne LA, Blanchard AP, et al. *Lipidomics era: Accomplishments and challenges*. Mass Spectrometry Reviews, **2010**. 29(6): p. 877-929.
- [14] Stahlman M, Ejlsing CS, Tarasov K, Perman J, Boren J, and Ekroos K. *High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **2009**. 877(26): p. 2664-2672.
- [15] Tatituri RVV, Brenner MB, Turk J, and Hsu FF. *Structural elucidation of diglycosyl diacylglycerol and monoglycosyl diacylglycerol from Streptococcus pneumoniae by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. Journal of Mass Spectrometry, **2012**. 47(1): p. 115-123.
- [16] Zubarev RA and Makarov A. *Orbitrap mass spectrometry*. Analytical Chemistry, **2013**. 85(11): p. 5288-5296.
- [17] Köfeler HC, Fauland A, Rechberger GN, and Trötzlmüller M. *Mass spectrometry based lipidomics: An overview of technological platforms*. Metabolites, **2012**. 2(1): p. 19-38.
- [18] Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. Journal of Lipid Research, **2010**. 51(11): p. 3299-3305.
- [19] Granafèi S, Losito I, Trotta M, Agostiano A, Palmisano F, and Cataldi TR. *Unveiling the compositional variety of cardiolipins in Rhodobacter sphaeroides by liquid chromatography with electrospray ionization and multistage collision-induced dissociation mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2017**. 409(21): p. 5007-5018.
- [20] Paglia G, Kliman M, Claude E, Geromanos S, and Astarita G. *Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2015**. 407(17): p. 4995-5007.
- [21] Schwudke D, Schuhmann K, Herzog R, Bornstein SR, and Shevchenko A. *Shotgun lipidomics on high resolution mass spectrometers*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, **2011**. 3(9).
- [22] Almeida R, Pauling JK, Sokol E, Hannibal-Bach HK, and Ejlsing CS. *Comprehensive lipidome analysis by shotgun lipidomics on a hybrid quadrupole-orbitrap-linear ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2015**. 26(1): p. 133-148.
- [23] Surma MA, Herzog R, Vasilj A, Klose C, Christinat N, Morin-Rivron D, et al. *An automated shotgun lipidomics platform for high throughput, comprehensive, and quantitative analysis of blood plasma intact lipids*.

- European Journal of Lipid Science and Technology, **2015**. 117(10): p. 1540-1549.
- [24] Wang M, Huang YY, and Han XL. *Accurate mass searching of individual lipid species candidates from high-resolution mass spectra for shotgun lipidomics*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2014**. 28(20): p. 2201-2210.
- [25] Tang C-H. *Lipid molecular profiling of nowadays and future*. Austin Chromatogr., **2015**. 2(1): p. 1025.
- [26] Ivanova PT, Milne SB, Byrne MO, Xiang Y, and Brown HA. *Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry*. Lipidomics and Bioactive Lipids: Mass-Spectrometry-Based Lipid Analysis, **2007**. 432: p. 21-57.
- [27] Brouwers JF. *Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phospholipids. Chromatography, ionization and quantification*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, **2011**. 1811(11): p. 763-775.
- [28] Guo XH and Lankmayr E. *Multidimensional approaches in LC and MS for phospholipid bioanalysis*. Bioanalysis, **2010**. 2(6): p. 1109-1123.
- [29] Okazaki Y, Kamide Y, Hirai MY, and Saito K. *Plant lipidomics based on hydrophilic interaction chromatography coupled to ion trap time-of-flight mass spectrometry*. Metabolomics, **2013**. 9(1): p. 121-131.
- [30] Rainville PD, Stumpf CL, Shockcor JP, Plumb RS, and Nicholson JK. *Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics*. Journal of Proteome Research, **2007**. 6(2): p. 552-558.
- [31] Liebisch G, Drobnik W, Reil M, Trumbach B, Arnecke R, Olgemoller B, et al. *Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Journal of Lipid Research, **1999**. 40(8): p. 1539-1546.
- [32] Cappiello A, Famiglini G, Palma P, Pierini E, Termopoli V, and Trufelli H. *Overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical Chemistry, **2008**. 80(23): p. 9343-9348.
- [33] DeLong CJ, Baker PRS, Samuel M, Cui Z, and Thomas MJ. *Molecular species composition of rat liver phospholipids by ESI-MS/MS: the effect of chromatography*. Journal of Lipid Research, **2001**. 42(12): p. 1959-1968.
- [34] Morlock G and Schwack W. *Coupling of planar chromatography to mass spectrometry*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, **2010**. 29(10): p. 1157-1171.

- [35] Cai SS, Short LC, Syage JA, Potvin M, and Curtis JM. *Liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry analysis of triacylglycerol lipids - Effects of mobile phases on sensitivity*. Journal of Chromatography A, **2007**. 1173(1-2): p. 88-97.
- [36] Annesley TM. *Ion suppression in mass spectrometry*. Clinical Chemistry, **2003**. 49(7): p. 1041-1044.
- [37] Merrill AH, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, and Wang E. *Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Methods, **2005**. 36(2): p. 207-224.
- [38] Ekroos K, Chernushevich IV, Simons K, and Shevchenko A. *Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer*. Analytical Chemistry, **2002**. 74(5): p. 941-949.
- [39] Han XL and Gross RW. *Electrospray-ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma-membrane phospholipids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1994**. 91(22): p. 10635-10639.
- [40] Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostianen R, and Somerharju P. *Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response*. Journal of Lipid Research, **2001**. 42(4): p. 663-672.
- [41] Han XL and Gross RW. *Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes*. Expert Review of Proteomics, **2005**. 2(2): p. 253-264.
- [42] Hermansson M, Uphoff A, Kakela R, and Somerharju P. *Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry*. Analytical Chemistry, **2005**. 77(7): p. 2166-2175.
- [43] Reich E and Schibli A. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. New York: Thieme, **2007**.
- [44] Fuchs B, Suess R, Teuber K, Eibisch M, and Schiller J. *Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state*. Journal of Chromatography A, **2011**. 1218(19): p. 2754-2774.
- [45] Cebolla VL, Membrado L, Jarne C, and Garriga R. *High-performance thin-layer chromatography*. Analytical Separation Science, First Edition, vol 4 "Related Chromatographic Techniques". Publisher: Wiley-VCH, Berlin. Editors: Anderson J, Berthod A, Pino Estévez V, Stalcup A., **2015**. Ch 1: p. 1093-1141.

-
- [46] Membrado L, Cebolla VL, Jarne C, Garriga R, Bernard-Savary P, and Vela J. *Automated multiple development*, in *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. **2014**. p. 73-105.
- [47] Cebolla VL, Jarne C, Domingo P, Domínguez A, Delgado-Camón A, Garriga R, et al. *Fluorescence detection by intensity changes for high-performance thin-layer chromatography separation of lipids using automated multiple development*. *Journal of Chromatography A*, **2011**. 1218(19): p. 2668-2675.
- [48] Kloppel A, Grasse W, Bruemmer F, and Morlock GE. *HPTLC coupled with bioluminescence and mass spectrometry for bioactivity-based analysis of secondary metabolites in marine sponges*. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc*, **2008**. 21(6): p. 431-436.
- [49] Choma IM and Grzelak EM. *Bioautography detection in thin-layer chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **2011**. 1218(19): p. 2684-2691.
- [50] Morlock G and Schwack W. *Hyphenations in planar chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **2010**. 1217(43): p. 6600-6609.
- [51] Seng JA, Ellis SR, Hughes JR, Maccarone AT, Truscott RJW, Blanksby SJ, et al. *Characterisation of sphingolipids in the human lens by thin layer chromatography-desorption electrospray ionisation mass spectrometry*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2014**. 1841(9): p. 1285-1291.
- [52] Cheng S-C, Huang M-Z, and Shiea J. *Thin layer chromatography/mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **2011**. 1218(19): p. 2700-2711.
- [53] Alpmann A and Morlock G. *Improved online coupling of planar chromatography with electrospray mass spectrometry: extraction of zones from glass plates*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**. 386(5): p. 1543-1551.
- [54] Luftmann H. *A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**. 378(4): p. 964-968.
- [55] Luftmann H, Aranda M, and Morlock GE. *Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2007**. 21(23): p. 3772-3776.
- [56] Aranda M and Morlock G. *New method for caffeine quantification by planar chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry using stable isotope dilution analysis*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2007**. 21(7): p. 1297-1303.
- [57] Morlock GE and Jautz U. *Comparison of two different plunger geometries for HPTLC-MS coupling via an extractor-based interface*.

- Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, **2008**. 21(5): p. 367-371.
- [58] Gaugler S, Rykl J, Grill M, and Cebolla VL. *Fully automated drug screening of dried blood spots using online LC-MS/MS analysis*. J. Appl. Bioanal., **2018**. 4(1): p. 7-15.
- [59] Cebolla VL, Domínguez A, Galbán J, Garriga R, Jarne C, Lapieza MP, et al. *A hyphenated technique based on high-performance thin layer chromatography for determining neutral sphingolipids: A proof of concept*. Chromatography, **2015**. 2: p. 167-187.
- [60] Park H, Zhou Y, and Costello CE. *Direct analysis of sialylated or sulfated glycosphingolipids and other polar and neutral lipids using TLC-MS interfaces*. Journal of Lipid Research, **2014**. 55(4): p. 773-781.
- [61] Wachs T and Henion J. *Electrospray device for coupling microscale separations and other miniaturized devices with electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, **2001**. 73(3): p. 632-638.
- [62] Eikel D and Henion J. *Liquid extraction surface analysis (LESA) of food surfaces employing chip-based nano-electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2011**. 25(16): p. 2345-2354.
- [63] Kertesz V, Ford MJ, and Van Berkel GJ. *Automation of a surface sampling probe/electrospray mass spectrometry system*. Analytical Chemistry, **2005**. 77(22): p. 7183-7189.
- [64] Kertesz V and Van Berkel GJ. *Fully automated liquid extraction-based surface sampling and ionization using a chip-based robotic nanoelectrospray platform*. Journal of Mass Spectrometry, **2010**. 45(3): p. 252-260.
- [65] Walworth MJ, Stankovich JJ, Van Berkel GJ, Schulz M, Minarik S, Nichols J, et al. *Hydrophobic treatment enabling analysis of wettable surfaces using a liquid microjunction surface sampling probe/electrospray ionization-mass spectrometry system*. Analytical Chemistry, **2011**. 83(2): p. 591-597.
- [66] Peter-Katalinić J and Hillenkamp F. *MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications*. 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim. **2003**. 1-345.
- [67] Muthing J and Distler U. *Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, **2010**. 29(3): p. 425-479.
- [68] Suzuki A, Miyazaki M, Matsuda J, and Yoneshige A. *High-performance thin-layer chromatography/mass spectrometry for the analysis of neutral glycosphingolipids*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, **2011**. 1811(11): p. 861-874.

- [69] Schiller J, Suss R, Arnhold J, Fuchs B, Lessig J, Muller M, et al. *Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research*. Progress in Lipid Research, **2004**. 43(5): p. 449-488.
- [70] *High resolution lipid profiling and identification by hyphenated HPTLC-MALDI-TOF/TOF*. Application Note # MT-101, Bruker Daltonics, Bremen, Germany, **2010**.
- [71] Fuchs B, Schiller J, Suess R, Zscharnack M, Bader A, Mueller P, et al. *Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2008**. 392(5): p. 849-860.
- [72] Rohlfing A, Muthing J, Pohlentz G, Distler U, Peter-Katalinic J, Berkenkamp S, et al. *IR-MALDI-MS analysis of HPTLC - Separated phospholipid mixtures directly from the TLC plate*. Analytical Chemistry, **2007**. 79(15): p. 5793-5808.
- [73] Stubiger G, Pittenauer E, Belgacem O, Rehulka P, Widhalm K, and Allmaier G. *Analysis of human plasma lipids and soybean lecithin by means of high-performance thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2009**. 23(17): p. 2711-2723.
- [74] Goto-Inoue N, Hayasaka T, Taki T, Gonzalez TV, and Setou M. *A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species*. Journal of Chromatography A, **2009**. 1216(42): p. 7096-7101.
- [75] Cody RB, Laramée JA, and Durst HD. *Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions*. Analytical Chemistry, **2005**. 77(8): p. 2297-2302.
- [76] Dytkiewicz E and Morlock GE. *Analytical strategy for rapid identification and quantification of lubricant additives in mineral oil by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption and fluorescence detection combined with mass spectrometry and infrared spectroscopy*. Journal of Aoac International, **2008**. 91(5): p. 1237-1243.
- [77] Morlock G and Schwack W. *Determination of isopropylthioxanthone (ITX) in milk, yoghurt and fat by HPTLC-FLD, HPTLC-ESI/MS and HPTLC-DART/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2006**. 385(3): p. 586-595.
- [78] Smith NJ, Domin MA, and Scott LT. *HRMS directly from TLC slides. A powerful tool for rapid analysis of organic mixtures*. Organic Letters, **2008**. 10(16): p. 3493-3496.
- [79] Chernetsova ES, Revelsky AI, and Morlock GE. *Some new features of Direct Analysis in Real Time mass spectrometry utilizing the desorption*

- at an angle option*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2011**. 25(16): p. 2275-2282.
- [80] Howlett SE and Steiner RR. *Validation of thin layer chromatography with accuTOF-DARTTM detection for forensic drug analysis*. Journal of Forensic Sciences, **2011**. 56(5): p. 1261-1267.
- [81] Feng L and Prestwich GD. *Functional Lipidomics*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, **2006**.
- [82] Fossati P and Prencipe L. *Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide*. Clinical Chemistry, **1982**. 28(10): p. 2077-2080.
- [83] Kao YT, Saxena C, He TF, Guo LJ, Wang LJ, Sancar A, *et al*. *Ultrafast dynamics of flavins in five redox states*. Journal of the American Chemical Society, **2008**. 130(39): p. 13132-13139.
- [84] Islam SDM, Susdorf T, Penzkofer A, and Hegemann P. *Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer*. Chemical Physics, **2003**. 295(2): p. 137-149.
- [85] Rhee HW, Choi HY, Han K, and Hong JI. *Selective fluorescent detection of flavin adenine dinucleotide in human eosinophils by using bis(Zn²⁺-dipicolylamine) complex*. Journal of the American Chemical Society, **2007**. 129(15): p. 4524-5.
- [86] Galbán J, Sanz-Vicente I, Ortega E, del Barrio M, and de Marcos S. *Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2012**. 402(10): p. 3039-3054.
- [87] Galban J, Sanz-Vicente I, Navarro J, and de Marcos S. *The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review*. Methods and Applications in Fluorescence, **2016**. 4(4).
- [88] Ortega E, de Marcos S, and Galbán J. *Fluorometric enzymatic autoindicating biosensor for H₂O₂ determination based on modified catalase*. Biosensors & Bioelectronics, **2013**. 41: p. 150-156.
- [89] Galbán J, Sánchez-Monreal O, Andreu Y, de Marcos S, and Castillo JR. *Choline determination based on the intrinsic and the extrinsic (chemically modified) fluorescence of choline oxidase*. Analytical Biochemistry, **2004**. 334(2): p. 207-215.
- [90] Sanz-Vicente I, Romero JJ, de Marcos S, Ostra M, Ubide C, and Galbán J. *Simultaneous determination of glucose and choline based on the intrinsic fluorescence of the enzymes*. Journal of Fluorescence, **2009**. 19(4): p. 583-591.

-
- [91] Sierra JF, Galban J, De Marcos S, and Castillo JR. *Direct determination of glucose in serum by fluorimetry using a labeled enzyme*. Analytica Chimica Acta, **2000**. 414(1-2): p. 33-41.
- [92] Sanz V, Galban J, de Marcos S, and Castillo JR. *Fluorometric sensors based on chemically modified enzymes - Glucose determination in drinks*. Talanta, **2003**. 60(2-3): p. 415-423.
- [93] Galbán J, Andreu Y, Sierra JF, de Marcos S, and Castillo JR. *Intrinsic fluorescence of enzymes and fluorescence of chemically modified enzymes for analytical purposes: a review*. Luminescence, **2001**. 16(2): p. 199-210.
- [94] De Luca P, Lepore M, Portaccio M, Esposito R, Rossi S, Bencivenga U, et al. *Glucose determination by means of steady-state and time-course UV fluorescence in free or immobilized glucose oxidase*. Sensors, **2007**. 7(11): p. 2612-2625.
- [95] Ortega E, de Marcos S, Sanz-Vicente I, Ubide C, Ostra M, Vidal M, et al. *Fluorescence of the Flavin group in choline oxidase. Insights and analytical applications for the determination of choline and betaine aldehyde*. Talanta, **2016**. 147: p. 253-260.
- [96] Galban J, Delgado-Camon A, Cebolla VL, de Marcos S, Polo V, and Mateos E. *Fluorescence detection by intensity change based sensors: A theoretical model*. Journal of Fluorescence, **2012**. 22(1): p. 381-389.
- [97] Aerts J, Kallemeijn WW, Wegdam W, Ferraz MJ, van Breemen MJ, Dekker N, et al. *Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies*. Journal of Inherited Metabolic Disease, **2011**. 34(3): p. 605-619.
- [98] Elstein D, Altarescu G, and Beck M. *Fabry disease*. Springer, Dordrecht, **2010**.
- [99] Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. *Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2008**. 105(8): p. 2812-2817.
- [100] Manwaring V, Boutin M, and Auray-Blais C. *A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients*. Analytical Chemistry, **2013**. 85(19): p. 9039-9048.
- [101] Boutin M and Auray-Blais C. *Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-Related Analogues in Fabry Disease*. Analytical Chemistry, **2014**. 86(7): p. 3476-3483.
- [102] Rolfs A, Giese AK, Grittner U, Mascher D, Elstein D, Zimran A, et al. *Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a*

- non-jewish, caucasian cohort of Gaucher disease patients*. Plos One, **2013**. 8(11).
- [103] Schiffmann R, Forni S, Swift C, Brignol N, Wu XY, Lockhart DJ, *et al*. *Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide*. Journal of the American Heart Association, **2014**. 3(1).
- [104] Gold H, Mirzaian M, Dekker N, Ferraz MJ, Lugtenburg J, Codee JDC, *et al*. *Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of Fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry*. Clinical Chemistry, **2013**. 59(3): p. 547-556.
- [105] Ochalek M, Heissler S, Wohlrab J, and Neubert RHH. *Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2012**. 81(1): p. 113-120.
- [106] Kabrodt K, Lüttich J, Dittler I, and Schellenberg I. *Improved HPTLC separation of lipids using automated multiple development (AMD) and identification with the TLC-MS-Interface*. Proceedings of the HPTLC International Symposium, **2011**. Basel, Switzerland, p. 63.
- [107] Opitz A, Wirtz M, Melchior D, Mehling A, Kling H-W, and Neubert RHH. *Improved method for stratum corneum lipid analysis by automated multiple development HPTLC*. Chromatographia, **2011**. 73(5-6): p. 559-565.
- [108] Farwanah H, Raith K, Neubert RHH, and Wohlrab J. *Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin*. Archives of Dermatological Research, **2005**. 296(11): p. 514-521.
- [109] Raith K, Zellmer S, Lasch J, and Neubert RHH. *Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **2000**. 418(2): p. 167-173.
- [110] Zellmer S and Lasch J. *Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates*. Journal of Chromatography B, **1997**. 691(2): p. 321-329.
- [111] Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, and Raith K. *Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **2002**. 780(2): p. 443-450.
- [112] Gildenast T and Lasch J. *Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid*

- chromatography*. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, **1997**. 1346(1): p. 69-74.
- [113] Bonte F, Saunois A, Pinguet P, and Meybeck A. *Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance*. Archives of Dermatological Research, **1997**. 289(2): p. 78-82.
- [114] Muthing J. *Improved thin-layer chromatographic-separation of gangliosides by automated multiple development*. Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, **1994**. 657(1): p. 75-81.
- [115] Muthing J and Ziehr H. *Enhanced thin-layer chromatographic separation of G(M1b)-type gangliosides by automated multiple development*. Journal of Chromatography B, **1996**. 687(2): p. 357-362.
- [116] Hildebrandt H, Jonas U, Ohashi M, Klaiber I, and Rahmann H. *Direct electrospray-ionization mass spectrometric analysis of the major ganglioside from crucian carp liver after thin layer chromatography*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, **1999**. 122(1): p. 83-88.
- [117] Dreisewerd K, Muthing J, Rohlfing A, Meisen I, Vukelic Z, Peter-Katalinic J, et al. *Analysis of gangliosides directly from thin-layer chromatography plates by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix*. Analytical Chemistry, **2005**. 77(13): p. 4098-4107.
- [118] Nakamura K, Suzuki Y, Goto-Inoue N, Yoshida-Noro C, and Suzuki A. *Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS*. Analytical Chemistry, **2006**. 78(16): p. 5736-5743.
- [119] Meisen I, Peter-Katalinic J, and Muthing J. *Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Analytical Chemistry, **2004**. 76(8): p. 2248-2255.
- [120] Cansell M, Gouygou JP, Jozefonvicz J, and Letourneur D. *Lipid composition of cultured endothelial cells in relation to their growth*. Lipids, **1997**. 32(1): p. 39-44.
- [121] Cebolla VL, Mateos E, Garriga R, Jarne C, Membrado L, Cossío FP, et al. *Changes in fluorescent emission due to non-covalent interactions as a general detection procedure for thin-layer chromatography*. Chemphyschem, **2012**. 13(1): p. 291-299.
- [122] Mateos E, Cebolla VL, Membrado L, Vela J, Gálvez EM, Matt M, et al. *Coralyne cation, a fluorescent probe for general detection in planar chromatography*. Journal of Chromatography A, **2007**. 1146(2): p. 251-257.

- [123] Cossío FP, Arrieta A, Cebolla VL, Membrado L, Domingo MP, Henrion P, *et al.* *Enhancement of fluorescence in thin-layer chromatography induced by the interaction between n-alkanes and an organic cation.* Analytical Chemistry, **2000**. 72(8): p. 1759-1766.
- [124] Gálvez EM, Matt M, Cebolla VL, Fernandes F, Membrado L, Cossío FP, *et al.* *General contribution of nonspecific interactions to fluorescence intensity enhancements.* Analytical Chemistry, **2006**. 78(11): p. 3699-3705.
- [125] Cebolla VL, Membrado L, Domingo MP, Henrion P, Garriga R, Gonzalez P, *et al.* *Quantitative applications of fluorescence and ultraviolet scanning densitometry for compositional analysis of petroleum products in thin-layer chromatography.* Journal of Chromatographic Science, **1999**. 37(6): p. 219-226.
- [126] Farwanah H, Wirtz J, Kolter T, Raith K, Neubert RHH, and Sandhoff K. *Normal phase liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for separation, detection and mass spectrometric profiling of neutral sphingolipids and cholesterol.* Journal of Chromatography B, **2009**. 877(27): p. 2976-2982.
- [127] Lemoine J, Fournet B, Despeyroux D, Jennings KR, Rosenberg R, and Dehoffmann E. *Collision-induced dissociation of alkali-metal cationized and permethylated oligosaccharides - Influence of the collision energy and of the collision gas for the assignment of linkage position.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **1993**. 4(3): p. 197-203.
- [128] Ruh H, Sandhoff R, Meyer B, Gretz N, and Hopf C. *Quantitative characterization of tissue globotetraosylceramides in a rat model of polycystic kidney disease by primadrop sample preparation and indirect high-performance thin layer chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry with automated data acquisition.* Analytical Chemistry, **2013**. 85(13): p. 6233-6240.
- [129] Agarwal AK. *Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines.* Progress in Energy and Combustion Science, **2007**. 33(3): p. 233-271.
- [130] Knothe G. *The history of vegetable oil-based diesel fuels. The biodiesel handbook.* Urbana, IL (USA): AOCS Press, **2005**: p. 4-16.
- [131] Van Gerpen J. *Biodiesel processing and production.* Fuel Processing Technology, **2005**. 86(10): p. 1097-1107.
- [132] Moser BR. *Biodiesel production, properties, and feedstocks.* In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, **2009**. 45(3): p. 229-266.
- [133] Wawrzyniak R, Wasiak W, and Frackowiak M. *Determination of methyl esters in diesel oils by gas chromatography - Validation of the method.* Chemical Papers, **2005**. 59(6B): p. 449-452.

- [134] Monteiro MR, Ambrozin ARP, Liao LM, and Ferreira AG. *Critical review on analytical methods for biodiesel characterization*. Talanta, **2008**. 77(2): p. 593-605.
- [135] *Automotive fuels - Diesel - Requirements and test methods*. UNE-EN 509:2009+A1, **2010**.
- [136] *Liquid petroleum - Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications - Requirements and test methods*. UNE-EN 14214, **2013**.
- [137] Fedosov SN, Brask J, and Xu XB. *Analysis of biodiesel conversion using thin layer chromatography and nonlinear calibration curves*. Journal of Chromatography A, **2011**. 1218(19): p. 2785-2792.
- [138] Eberlin LS, Abdelnur PV, Passero A, de Sa GF, Daroda RJ, de Souza V, et al. *Analysis of biodiesel and biodiesel-petrodiesel blends by high performance thin layer chromatography combined with easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*. Analyst, **2009**. 134(8): p. 1652-1657.
- [139] Chattopadhyay S, Das S, and Sen R. *Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography*. Applied Energy, **2011**. 88(12): p. 5188-5192.
- [140] Bansal K, McCrady J, Hansen A, and Bhalerao K. *Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel*. Fuel, **2008**. 87(15-16): p. 3369-3372.
- [141] Jarne C, Cebolla VL, Membrado L, Galban J, Saviron M, Orduna J, et al. *Separation and profiling of monoglycerides in biodiesel using a hyphenated technique based on high-performance thin-layer chromatography*. Fuel, **2016**. 177: p. 244-250.
- [142] Cebolla VL, Jarne C, Membrado L, and Lapieza MP. *Determination of monoacylglycerides in biodiesel / Bestimmung von Monoacylglyceriden in Biodiesel*. CBS CAMAG, **2015**. 114: p. 5-7.
- [143] Yang K, Jenkins CM, Dilthey B, and Gross RW. *Multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics analysis of vinyl ether diglycerides*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2015**. 407(17): p. 5199-5210.
- [144] Duffin KL, Henion JD, and Shieh JJ. *Electrospray and tandem mass-spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar-solvents* Analytical Chemistry, **1991**. 63(17): p. 1781-1788.
- [145] Hsu FF and Turk J. *Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage*

- quadrupole instrument*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **1999**. 10(7): p. 587-599.
- [146] Callender HL, Forrester JS, Ivanova P, Preininger A, Milne S, and Brown HA. *Quantification of diacylglycerol species from cellular extracts by electrospray ionization mass spectrometry using a linear regression algorithm*. Analytical Chemistry, **2007**. 79(20): p. 263-272.
- [147] Arnaud CH. *Lipids affect the function of membrane proteins*. Chemical & Engineering News, **2017**. 95(9): p. 18-20.
- [148] Barret LA. *Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de Rhodobacter blasticus*. Tesis de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse. **2013**.
- [149] Wallin E and von Heijne G. *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. Protein Science, **1998**. 7(4): p. 1029-1038.
- [150] Barret LA, Barrot-Ivolot C, Raynal S, Jungas C, Polidori A, and Bonnete F. *Influence of hydrophobic micelle structure on crystallization of the photosynthetic RC-LH1-PufX complex from Rhodobacter blasticus*. Journal of Physical Chemistry B, **2013**. 117(29): p. 8770-8781.
- [151] Deisenhofer J and Michel H. *The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodospseudomonas viridis*. Nobel lecture. Embo Journal, **1989**. 8(8): p. 2149-2170.
- [152] Jungas C, Ranck JL, Rigaud JL, Joliot P, and Vermeglio A. *Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides*. Embo Journal, **1999**. 18(3): p. 534-542.
- [153] Semchonok DA, Chauvin JP, Frese RN, Jungas C, and Boekema EJ. *Structure of the dimeric RC-LH1-PufX complex from Rhodobaca bogoriensis investigated by electron microscopy*. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, **2012**. 367(1608): p. 3412-3419.
- [154] Nussberger S, Dorr K, Wang DN, and Kuhlbrandt W. *Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex*. Journal of Molecular Biology, **1993**. 234(2): p. 347-356.
- [155] Lemieux MJ, Reithmeier RAF, and Wang DN. *Importance of detergent and phospholipid in the crystallization of the human erythrocyte anion-exchanger membrane domain*. Journal of Structural Biology, **2002**. 137(3): p. 322-332.
- [156] Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, and Ogawa H. *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution*. Nature, **2000**. 405(6787): p. 647-655.

- [157] Jidenko M, Nielsen RC, Sorensen TLM, Moller JV, le Maire M, Nissen P, *et al.* *Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2005**. 102(33): p. 11687-11691.
- [158] Guan L, Smirnova IN, Verner G, Nagamoni S, and Kaback HR. *Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2006**. 103(6): p. 1723-1726.
- [159] Luckey M. *Membrane structural biology. With biochemical and biophysical foundations*. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **2014**.
- [160] Russell NJ and Harwood JL. *Changes in the acyl lipid-composition of photosynthetic bacteria grown under photosynthetic and non-photosynthetic conditions*. Biochemical Journal, **1979**. 181(2): p. 339-345.
- [161] Seddon AM, Curnow P, and Booth PJ. *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, **2004**. 1666(1-2): p. 105-117.
- [162] Yeagle PL. *Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, **2014**. 1838(6): p. 1548-1559.
- [163] Fang ML, Ivanisevic J, Benton HP, Johnson CH, Patti GJ, Hoang LT, *et al.* *Thermal degradation of small molecules: A global metabolomic investigation*. Analytical Chemistry, **2015**. 87(21): p. 10935-10941.
- [164] Barret LA, Polidori A, Bonnete F, Bernard-Savary P, and Jungas C. *A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies*. Journal of Chromatography A, **2013**. 1281: p. 135-141.
- [165] Granafei S, Losito I, Trotta M, Italiano F, de Leo V, Agostiano A, *et al.* *Profiling of ornithine lipids in bacterial extracts of Rhodobacter sphaeroides by reversed-phase liquid chromatography with electrospray ionization and multistage mass spectrometry (RPLC-ESI-MSn)*. Analytica Chimica Acta, **2016**. 903: p. 110-120.
- [166] Granafei S, Losito I, Salivo S, Tranchida PQ, Mondello L, Palmisano F, *et al.* *Occurrence of oleic and 18:1 methyl-branched acyl chains in lipids of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. Analytica Chimica Acta, **2015**. 885: p. 191-198.
- [167] Imhoff JF and Bias-Imhoff U. *Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria*. In Blankenship, Madigan and Bauer (Editors), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht. **1995**. p. 179-205.

- [168] Comayras R, Jungas C, and Lavergne J. *Functional consequences of the organization of the photosynthetic apparatus in Rhodobacter sphaeroides - I. Quinone domains and excitation transfer in chromatophores and reaction center center dot antenna complexes*. Journal of Biological Chemistry, **2005**. 280(12): p. 11203-11213.
- [169] Hsu FF and Turk J. *Characterization of cardiolipin as the sodiated ions by positive-ion electrospray ionization with multiple stage quadrupole ion-trap mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2006**. 17(8): p. 1146-1157.
- [170] Hsu FF, Turk J, Rhoades ER, Russell DG, Shi YX, and Groisman EA. *Structural characterization of cardiolipin by tandem quadrupole and multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2005**. 16(4): p. 491-504.
- [171] Zhou SL and Hamburger M. *Formation of sodium cluster ions in electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **1996**. 10(7): p. 797-800.
- [172] Keller BO, Suj J, Young AB, and Whittall RM. *Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, **2008**. 627(1): p. 71-81.
- [173] Russell NJ, Coleman JK, Howard TD, Johnston E, and Cogdell RJ. *Rhodopseudomonas acidophila strain 10050 contains photosynthetic LH2 antenna complexes that are not enriched with phosphatidylglycerol, and the phospholipids have a fatty acyl composition that is unusual for purple non-sulfur bacteria*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, **2002**. 1556(2-3): p. 247-253.
- [174] Rezanka T and Sigler K. *Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms*. Progress in Lipid Research, **2009**. 48(3-4): p. 206-238.
- [175] Kurotani K, Sato M, Yasuda K, Kashima K, Tanaka S, Hayashi T, et al. *Even- and odd-chain saturated fatty acids in serum phospholipids are differentially associated with adipokines*. Plos One, **2017**. 12(5).
- [176] Akinwale PO, Lefevre E, Powell MJ, and Findlay RH. *Unique odd-chain polyenoic phospholipid fatty acids present in chytrid fungi*. Lipids, **2014**. 49(9): p. 933-942.
- [177] Jenkins B, West JA, and Koulman A. *A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease*. Molecules, **2015**. 20(2): p. 2425-2444.
- [178] Maciel E, Domingues P, Marques D, Simoes C, Reis A, Oliveira MM, et al. *Cardiolipin and oxidative stress: Identification of new short chain oxidation products of cardiolipin in in vitro analysis and in nephrotoxic*

- drug-induced disturbances in rat kidney tissue*. International Journal of Mass Spectrometry, **2011**. 301(1-3): p. 62-73.
- [179] Jendrasiak GL and Smith RL. *The effect of the choline head group on phospholipid hydration*. Chemistry and Physics of Lipids, **2001**. 113(1-2): p. 55-66.
- [180] Hidaka H, Yamauchi K, Ohta H, Akamatsu T, Honda T, and Katsuyama T. *Specific, rapid, and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in serum and lipid extracts*. Clinical Biochemistry, **2008**. 41(14-15): p. 1211-1217.
- [181] Hodson L, Skeaff CM, and Fielding BA. *Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake*. Progress in Lipid Research, **2008**. 47(5): p. 348-380.
- [182] Wuthier RE. *Lipid-composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles*. Biochimica Et Biophysica Acta, **1975**. 409(1): p. 128-143.
- [183] Huang KP and Huang FL. *Differential sensitivity of protein kinase-c isozymes to phospholipid-induced inactivation*. Journal of Biological Chemistry, **1990**. 265(2): p. 738-744.
- [184] Kolesnick R and Golde DW. *The sphingomyelin pathway in tumor-necrosis-factor and interleukin-1 signaling*. Cell, **1994**. 77(3): p. 325-328.
- [185] Willis SL, Court JL, Redman RP, Wang JH, Leppard SW, O'Byrne VJ, et al. *A novel phosphorylcholine-coated contact lens for extended wear use*. Biomaterials, **2001**. 22(24): p. 3261-3272.
- [186] Selan L, Palma S, Scoarughi GL, Papa R, Veeh R, Di Clemente D, et al. *Phosphorylcholine impairs susceptibility to biofilm formation of hydrogel contact lenses*. American Journal of Ophthalmology, **2009**. 147(1): p. 134-139.
- [187] Whelan DM, van der Giessen WJ, Krabbendam SC, van Vliet EA, Verdouw PD, Serruys PW, et al. *Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries*. Heart, **2000**. 83(3): p. 338-345.
- [188] Lewis AL. *Phosphorylcholine-based polymers and their use in the prevention of biofouling*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, **2000**. 18(3-4): p. 261-275.
- [189] Hayward JA and Chapman D. *Biomembrane surfaces as models for polymer design - The potential for hemocompatibility*. Biomaterials, **1984**. 5(3): p. 135-142.

- [190] Lewis AL, Vick TA, Collias ACM, Hughes LG, Palmer RR, Leppard SW, *et al.* *Phosphorylcholine-based polymer coatings for stent drug delivery.* Journal of Materials Science-Materials in Medicine, **2001**. 12(10-12): p. 865-870.
- [191] Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, and Holden JM. *Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods.* Journal of Nutrition, **2003**. 133(5): p. 1302-1307.
- [192] Zeisel SH. *Nutritional importance of choline for brain development.* Journal of the American College of Nutrition, **2004**. 23(6): p. 621S-626S.
- [193] Ilcol YO, Ozbek R, Hamurtekin E, and Ulus IH. *Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk.* Journal of Nutritional Biochemistry, **2005**. 16(8): p. 489-499.
- [194] Schneider PB. *Permanent sensitive stain for choline-containing phospholipids on thin-layer chromatograms.* Journal of Lipid Research, **1966**. 7(1): p. 169-170.
- [195] Jungalwala FB, Evans JE, and McCluer RH. *High-performance liquid-chromatography of phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in region of 200 nm.* Biochemical Journal, **1976**. 155(1): p. 55-60.
- [196] Hidaka H, Hanyu N, Sugano M, Kawasaki K, Yamauchi K, and Katsuyama T. *Analysis of human serum lipoprotein lipid composition using MALDI-TOF mass spectrometry.* Annals of Clinical and Laboratory Science, **2007**. 37(3): p. 213-221.
- [197] Ichi I, Nakahara K, Miyashita Y, Hidaka A, Kutsukake S, Inoue K, *et al.* *Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis.* Lipids, **2006**. 41(9): p. 859-863.
- [198] Nzai JM and Proctor A. *Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry.* Food Chemistry, **1998**. 63(4): p. 571-576.
- [199] Hatzakis E, Koidis A, Boskou D, and Dais P. *Determination of phospholipids in olive oil by P-31 NMR Spectroscopy.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2008**. 56(15): p. 6232-6240.
- [200] Hojjati MR and Jiang XC. *Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine.* Journal of Lipid Research, **2006**. 47(3): p. 673-676.
- [201] Yaqoob M, Nabi A, Siddiqui MA, Waseem A, Achakzai AKK, Saeed A, *et al.* *Enzymatic procedures for the determination of phospholipids.* Journal of the Chemical Society of Pakistan, **2001**. 23(3): p. 171-175.

-
- [202] Blaton V, Debuyzere M, Spincemaille J, and Declercq B. *Enzymic assay for phosphatidylcholine and sphingomyelin in serum*. Clinical Chemistry, **1983**. 29(5): p. 806-809.
- [203] Nanjee MN, Gebre AK, and Miller NE. *Enzymatic fluorometric procedure for phospholipid quantification with an automated microtiter plate fluorometer*. Clinical Chemistry, **1991**. 37(6): p. 868-874.
- [204] Pedruzzi E, Hakim J, Giroud JP, and Perianin A. *Analysis of choline and phosphorylcholine content in human neutrophils stimulated by f-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate: Contribution of phospholipase D and C*. Cellular Signalling, **1998**. 10(7): p. 481-489.
- [205] Barak AJ and Tuma DJ. *Determination of choline, phosphorylcholine, and betaine*, in *Methods in Enzymology*. **1981**. p. 287-292.
- [206] Sanz-Vicente I, Lapieza MP, Cebolla VL, and Galbán J. *Rapid enzymatic method for the determination of phosphoryl choline using the fluorescence of the enzyme choline oxidase. Sequential determination of choline and phosphorylcholine in milk powder for children*. Microchemical Journal, **2015**. 123: p. 259-266.

