

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia-Espectrometría de Masas

Introducción

La Cromatografía y la Espectrometría de Masas son dos técnicas analíticas que permiten el estudio de compuestos de naturaleza muy diversa, con gran sensibilidad y especificidad.

Ambas técnicas existen desde hace más de un siglo, pero el mayor desarrollo de las mismas se ha producido a partir de la segunda mitad del siglo XX y, especialmente en las últimas décadas, se ha implementado su uso tanto en los laboratorios de investigación como en los laboratorios clínicos, considerándose actualmente la técnica de referencia para un gran número de analitos.

Cromatografía

Es una técnica analítica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja, mediante su distribución en dos fases inmiscibles:

1. Fase estacionaria (FE): se mantiene fija. En ella tiene lugar el proceso físico-químico de separación.
2. Fase móvil (FM): se desplaza en una dirección definida a través de la FE:
 - Líquido: cromatografía líquida (LC)
 - Gas: cromatografía de gases (GC)
 - Fluido supercrítico: cromatografía supercrítica (SC)

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

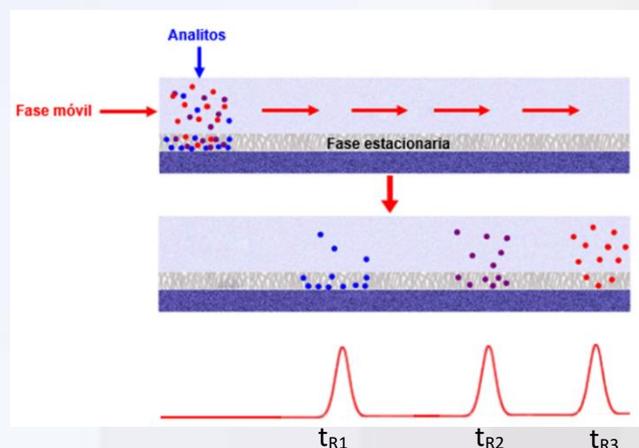
Se caracteriza por la utilización de elevadas presiones para impulsar la FM hacia una columna que contiene la FE, lo que mejora la resolución de los picos y aumenta la velocidad del proceso.

Fundamento de la HPLC

La mezcla de los componentes (muestra), diluida en la FM, se hace pasar a través de una columna en la que se localiza la fase estacionaria a elevada presión. Este proceso se denomina elución.

Debido a la diferente afinidad de cada uno de los analitos por la FE, quedarán más o menos retenidos y saldrán de la columna a distintos tiempos.

El tiempo de retención (t_R) es el tiempo que tarda un analito en eluir de la columna.



Catlab Informa

Cada analito, en unas determinadas condiciones cromatográficas, tiene un tiempo de retención característico, que permite diferenciarlo del resto de los componentes de la mezcla.

Tipos de cromatografía

El tipo de cromatografía se selecciona en función de las características físico-químicas (masa molar y polaridad) de los componentes de la mezcla que se quieren separar.

A continuación presentamos algunos ejemplos de los más utilizados en el laboratorio clínico.

Cromatografía de reparto o partición

La separación se basa en la solubilidad y afinidad de los componentes de una muestra entre las fases móvil y estacionaria. Se clasifican en función de la polaridad de las mismas en:

- Fase normal: FE polar y FM apolar
- Fase reversa: FE apolar y FM polar

Algunos ejemplos:

- Fármacos: antibióticos, antifúngicos, antiepilépticos, inmunosupresores, sedantes.
- Hormonas: esteroides, hormonas sexuales, catecolaminas, metanefrinas.
- Vitaminas: A, D, B₁, B₆.

Cromatografía de intercambio iónico

La separación se basa en la afinidad por el intercambio de iones de los componentes de una muestra.

Algunos ejemplos:

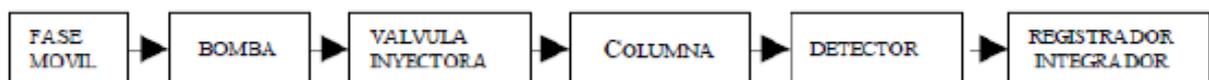
- Fracciones de hemoglobinas: HbA_{1c}, HbA₂, HbF.
- Aminoácidos.

Cromatografía de exclusión molecular

La separación se basa en las diferencias de peso molecular de los componentes de la muestra.

Por ejemplo: ácidos grasos.

Componentes de un equipo de HPLC



Mediante la bomba se hace pasar la FM a través de la columna. La válvula inyectora inyecta la muestra en el flujo de la FM para que los componentes se separen al pasar por la columna. Los componentes llegan al detector y, finalmente, el registrador integrador transforma la señal del detector en un cromatograma.

Catlab Informa

El detector varía en función de las características de los analitos que se miden. Algunos ejemplos de los más utilizados son:

- Absorbancia UV-VIS: para sustancias que absorben en las longitudes de onda del ultravioleta-visible.

Ejemplos: hemoglobinas (se dispone de uno de estos analizadores en el área de Hematología de Catlab, para el estudio de la hemoglobina glicosilada y las hemoglobinas variantes), vitamina C (ascorbato), vitamina A (retinol), vitamina E (tocoferol).

- Fluorescencia: para sustancias que emiten fluorescencia.

Ejemplos: vitamina B6 (piridoxina), riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1), homocisteína.

- Electroquímico: para sustancias en las que se pueden dar procesos redox.

Ejemplos: catecolaminas, metanefrinas, purinas y pirimidinas.

- Espectrómetro de masas: identifica las sustancias en función de su relación masa/carga. Se puede detectar cualquier sustancia de la que se conozca su estructura química. Es capaz de diferenciar sustancias químicamente muy parecidas que otros detectores no serían capaces de diferenciar.

Ejemplos: fármacos, hormonas, vitaminas.

Espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry)

Método analítico que permite estudiar compuestos de diferente naturaleza (orgánica, inorgánica, biológica) y obtener información cualitativa y cuantitativa. Permite separar, aislar e identificar de manera inequívoca los componentes de una muestra mediante dos propiedades intrínsecas específicas: la masa (m) y la carga (z).

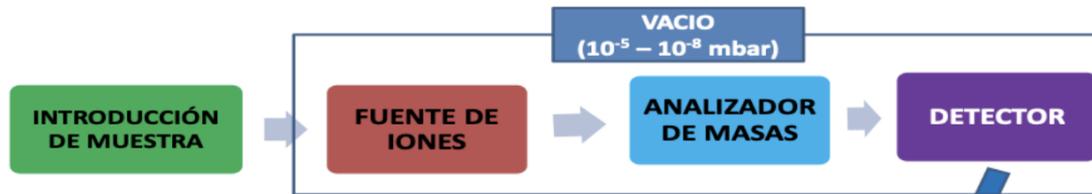
Sus cualidades principales son:

- Alta sensibilidad analítica.
- Alta especificidad analítica.
- Amplio intervalo de aplicabilidad: se puede medir cualquier sustancia de la que se conozca su estructura química.
- Posibilidad de obtener información cualitativa y cuantitativa.

Catlab Informa

Fundamento de la espectrometría de masas

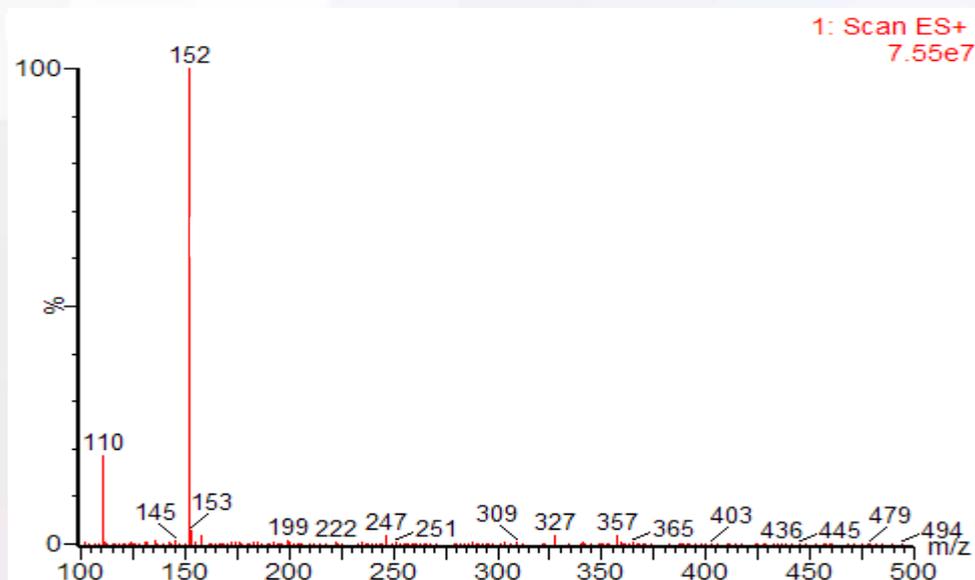
El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas, que se distribuyen entre los componentes del equipo:



1. Introducción de la muestra en un medio que permite la volatilización generando moléculas, fragmentos de moléculas o átomos en fase gaseosa. Las muestras pueden llegar hasta el espectrómetro de masas a través de un sistema de cromatografía (HPLC, GC) o directamente.
2. Fuente de iones: en ella se produce la ionización de los componentes de la muestra. El método de ionización empleado varía en función de las características de las moléculas a analizar.
3. Analizador de masas: se separan y analizan los iones moleculares y/o sus fragmentos, generados en la fuente de ionización, según su relación masa/carga (m/z). Los iones deben moverse rápidamente a través del sistema aplicando vacío.

Existen distintos tipos de analizadores de masas, y uno de los más utilizados es el MALDI-TOF para la identificación de bacterias en Microbiología. Se dispone de uno de estos analizadores en el área de Microbiología de Catlab.

4. Detector: recibe el flujo de iones desde el analizador de masas y genera una señal eléctrica que posteriormente es amplificada y almacenada. Los datos almacenados, mediante un software, son transformados en un espectro de masas. El espectro de masas representa la abundancia relativa de los iones, en función de su relación m/z . Cada sustancia tiene su espectro característico.



Catlab Informa

Aplicaciones en el Laboratorio Clínico

Debido a su gran versatilidad y a sus características de sensibilidad y especificidad estas técnicas son ampliamente utilizadas tanto para el análisis cualitativo como el cuantitativo de sustancias en gran variedad de muestras (suero, plasma, sangre total, orina, saliva, pelo, colonias bacterianas...).

| Principales aplicaciones por área de conocimiento | Analitos | Tipo de muestra | Sistema |
|---|---|---|--------------------|
| Monitorización de fármacos: estudio de la concentración de los medicamentos para valorar su efectividad y prevenir los efectos adversos. | Inmunosupresores: ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, everolimus | Sangre total | LC/MS/MS |
| | Antibióticos, antifúngicos, imatinib, bisulfan, infliximab | Suero, plasma | LC/MS/MS |
| Toxicología: screening y cuantificación de drogas de abuso en diferentes tipos de muestra. | Anfetaminas, barbitúricos, benzodiacepinas, cannabis, cocaína, opiáceos | Orina, sangre, saliva, sudor, cabello | GC/MS LC/MS/MS |
| Endocrinología: es un método más sensible y específico que los inmunoensayos. | Testosterona, androstendiona, DHEA, estrógenos, vitamina D | Plasma | GC/MS LC/MS/MS |
| | 17-OH-progesterona | Sangre seca, plasma | LC/MS/MS |
| | Cortisol | Plasma, orina | GC/MS LC/MS/MS |
| | Homocisteina | Plasma | LC/MS/MS |
| Pediatría: enfermedades metabólicas hereditarias, cribado neonatal. | Aminoácidos, acilcarnitinas, ácidos orgánicos | Sangre seca, plasma, fibroblastos, LCR, orina | GC/MS LC/MS/MS |
| Microbiología | Identificación de microorganismos | Cultivos de fluidos biológicos | MS/MS MALDI-TOF |

Catlab Informa

Ventajas e inconvenientes respecto a otras técnicas como el inmunoensayo

| Ventajas | Inconvenientes |
|---|---|
| <p>Elevada sensibilidad: permite cuantificar analitos en concentraciones muy bajas.</p> <p>Elevada especificidad: permite la detección inequívoca de los analitos. Se evita la reactividad cruzada entre sustancias.</p> <p>Posibilidad de detectar en un mismo método diferentes sustancias (aminoácidos, hormonas, tóxicos...).</p> <p>Gran versatilidad: permite la detección de un elevado número de sustancias en diferentes tipos de muestras.</p> <p>Se puede trabajar con volumen de muestra pequeño.</p> | <p>Elevado coste.</p> <p>Necesidad de formación específica del personal.</p> <p>Necesidad de procesado manual de las muestras antes de analizarlas.</p> |

La espectrometría de masas en Catlab

Recientemente, y en colaboración con el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Mútua Terrassa, hemos incorporado esta técnica en el laboratorio.

Comenzaremos con la internalización de los inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus, everolimus y sirolimus), con la previsión de incorporar nuevas técnicas en el futuro, como por ejemplo las vitaminas del grupo B, esteroides y la monitorización de otro tipo de fármacos.

Catlab Informa

Bibliografía

1. Rigo R. *Cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de laboratorio clínico*. Barcelona: Comité de Comunicación de la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio; 2019.
2. López RM, Pajares S. *La espectrometría de masas. Aplicaciones en el laboratorio clínico*. Educación Continuada en el Laboratorio Clínico. SEQC 2019-2020 (47: 85-97).

Amaia Fernández Uriarte

Facultativa Bioquímica
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35040 / 681342975
afuriarte@catlab.cat

Dra. Catrina Colomé

Facultativa Bioquímica
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35039 / 628.19.28.41
ccolome@catlab.cat

Elsa Escuder Azuara

Facultativa Bioquímica
CATLAB
Tel. 937485600 / 650850749
eescuder@catlab.cat

Dra. Eva Guillén

Coordinadora Bioquímica-Immunología
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35040 / 660676790
eguillen@catlab.cat
