

Preparación de muestras con la estación MPS-DualHead-WorkStation de Gerstel

Fraccionamiento automatizado de líquidos mediante la extracción en fase sólida (SPE) en el marco de estudios de lipidómica

Estudios metabolómicos apuntan frecuentemente al análisis de un gran número de muestras, para facilitar una diferenciación estadística de diferentes tipos de muestras. Es importante la repetibilidad de los pasos del trabajo. La automatización de los pasos de la preparación de muestras ayuda en reducir las variaciones analíticas. Esta Parte 2 de nuestra serie enfocada en las investigaciones metabolómicas se destina al fraccionamiento mediante la SPE en el marco de estudios lipidómicos.

Introducción

Una secuencia operativa frecuente en la metabolómica incluye típicamente diferentes pasos de trabajo como la extracción, fraccionamiento o purificación, derivatización y el enriquecimiento de los analitos, especialmente de moléculas (peso molecular <2000) de matrices biológicas como microorganismos, plantas, animales y seres humanos, seguido por una separación cromatográfica, gaseosa o líquida (GC/LC), y una detección de los analitos por espectrometría de masas (MS). Es necesario de analizar grandes números de muestras para poder distinguir diferentes tipos de muestras. Es de gran



Figura 1: El GERSTEL-MPS-DualHead-WorkStation, en la configuración para la extracción en fase sólida SPE y enriquecimiento de los extractos de la muestra. El brazo izquierdo ha sido equipado con una jeringa de 500 µL y el derecho con una de 2,5 mL. La bandeja del portamuestras es apta para viales de 10 mL y para cartuchos para la SPE. Para cada muestra se ha utilizado un cartucho nuevo. La estación de lavado ha tenido la función del lavado de las jeringas. La unidad de automatización de la SPE, la estación ^mVAP para la reducción de los extractos bajo vacío, e incluso para disolver los residuos sólidos de la evaporación en soluciones. La estación de solventes "solvent-filling" tiene la función del almacenamiento de todos los solventes necesarios para el fraccionamiento de las clases de lípidos y los pasos de lavado.

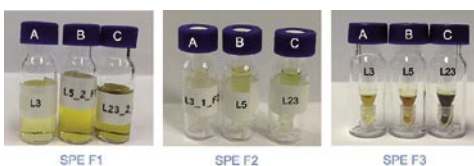


Figura 2: Extractos de plantas reconstituidas posterior al fraccionamiento y enriquecimiento por SPE y ^mVAP. A, B y C representan los tres tipos de plantas (F1: lípidos neutrales; F2: ácidos grasos libres; F3 lípidos polares).

importancia mantener la amplitud de las fluctuaciones analíticas en un mínimo, para que, en comparación, sea menor que la variabilidad biológica. La automatización de la preparación de las muestras puede ser útil para mejorar la repetibilidad del procedimiento analítico. En el primer aporte [1, 1a] hemos discutido la extracción líquida por ultrasonido automatizada y filtración mediante el MPS-WorkStation de Gerstel. En este presente trabajo, el segundo, elucidaremos un procedimiento de fraccionamiento automatizado sobre la base de SPE, que ha sido aplicado en un estudio lipidómico (vea el recuadro).

En este trabajo se trata la caracterización del material vegetal, respectivamente la determinación de las clases de lípidos contenidos en él, incluyendo los lípidos neutrales (NL = Neutral Lipids) como triglicéridos y esteroides, ácidos grasos libres (FF = Free Fatty acids) y lípidos polares (PL = Polar Lipids). También son de interés las relaciones entre las cuantías de los lípidos. Las clases de compuestos mencionadas se encuentran en el material vegetal en concentraciones muy diversas. Como se ha podido determinar en investigaciones anteriores, es ventajoso para su determinación el fraccionamiento y enriquecimiento selectivo de los diferentes lípidos antes de un análisis por LC/MS [2]. El primer paso se basa en el denominado método de Folch [3] mediante una extracción líquida-líquida (LLE)

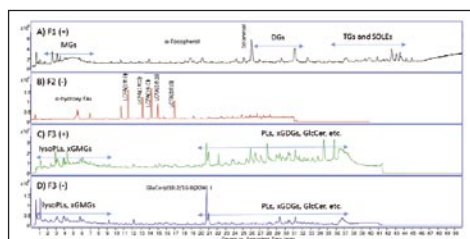


Figura 3: Cromatograma mostrando la totalidad de iones de la determinación LC/QTOF de las diferentes fracciones del SPE. Se han determinado las fracciones F1 lípidos neutrales en el modo ESI-POS (A); Fracción 2 F2 ácidos grasos libres en el modo ESI-NEG (B); Fracción 3 F3 lípidos polares en el modo ESI-POS y ESI-NEG.

Lipidómica

La lipidómica se ocupa de la investigación de todos aquellos productos naturales mayoritariamente o totalmente hidrófobos en una célula u organismo, específicamente los lípidos, que son un componente esencial de la membrana celular. En comparación con la investigación de la proteómica, la que enfoca en la totalidad de las proteínas de un organismo, la lipidómica utiliza procedimientos analíticos instrumentales para abarcar la totalidad de los lípidos de un organismo y determinar sus funciones. Se han evidenciado como especialmente útiles en este contexto los métodos de la espectrometría de masas. La meta de la investigación lipidómica es, entre otras, de elucidar cuál es el rol de los lípidos en el contexto de desordenes en el metabolismo como en la adipositas, arteriosclerosis, ataque cardíaco, hipertensión o diabetes [5, 6].

con la cual se obtiene una fracción enriquecida de lípidos. A este paso le sigue una extracción en fase sólida (SPE) mediante el uso de un cartucho de aminopropil (NH₂), y mediante esta aplicación se han obtenido tres fracciones de lípidos con una polaridad diferente. Los extractos coleccionados se han reducidos y enriquecidos automáticamente, y analizados por LC/QTOF.

Una vista a los detalles técnicos

Todos los pasos descritos brevemente más arriba, en concreto los pasos de preparación de muestras, han sido realizados automáticamente con el GERSTEL-MPS-WorkStation, y asistidos por computadora. Para evitar retrasos en el procedimiento, causados por un intercambio de herramientas potencialmente necesario, y para poder realizar el procedimiento también sin la vigilancia del personal del laboratorio, el MPS-WorkStation dispone de dos brazos móviles en las tres direcciones del espacio. Estos brazos se han equipado en este caso con diferentes jeringas que manipulan líquidos diferentes y en diferentes volúmenes.

Esta instalación, es decir las dos torres y dos brazos en combinación con algunas características técnicas relevantes, elimina la necesidad de un cambio de herramientas en el transcurso del procedimiento, y se ha evidenciado como muy útil para un análisis productivo y temporalmente muy eficiente. El puesto de trabajo MPS-WorkStation incluye entre otras una estación de múltiples posiciones de evaporación de muestras, la GERSTEL-MultiPosition-Evaporation-Station ^mVAP, con la cual se pueden secar en vacío los extractos líquidos, para posteriormente añadir al residuo seco una solución apta para la cromatografía. De esta forma se ha automatizado el paso de enriquecimiento. La extracción de los lípidos se ha realizado de la siguiente manera: Un gramo del material vegetal se ha macerado en 6 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 [v/v]). A la solución se añadió 4 mL de agua. De la fase cloroformo se han separado 1,5 mL, y después de filtrarlos se los han introducido en un vial. En el siguiente paso se ha evaporado el solvente en la estación ^mVAP. Los extractos se han disueltos en 300 µL cloroformo, y sometidos a una SPE en una fase de NH₂, para fraccionar las diferentes clases de lípidos, contenidos en la solución y analizarlos por LC/MS. Con 3 mL de una solución de cloroformo e isopropanol (2:1 [v/v]) se eluyeron los lípidos neutrales (NL) de la fase NH₂. Para fraccionar los ácidos grasos libres (FF) se han separado cada vez 4 mL de una solución, compuesta de 2 % ácido acético en dietiléter. La extracción de los lípidos polares (PL) se realizó con 3 mL metanol. Solamente los pasos SPE para separar las diferentes fracciones de lípidos tardarían, si se los realizaran manualmente, una enorme cantidad de tiempo. La automatización llega a ser la clave para un aumento de la productividad, y permite realizarla sin el personal del laboratorio, también durante la noche o el fin de semana.

Las tres fracciones se han coleccionadas en viales de 10 mL y evaporadas en la estación ^mVAP hasta secarlos. Los residuos se han disueltos en una solu-

Tabla 1: Precisión del método lipidómico que incluye los pasos de la preparación de muestras.

Fracción de lípido		Masa [Da]	t _R [min]	RSD [%]
F1 (+)	MG (18:3)	369,2879	6,389	9,6
	Solanesol	647,6005	29,097	8,6
	LANE (18:3)	703,6267	38,749	5,5
	SOLE (18:3)	907,8145	44,918	7,7
F2 (-)	LCFA-OH (18:3)	294,2210	7,540	11,7
	LCFA (18:3)	278,2259	14,497	5,4
	LCFA (16:0)	256,2414	17,245	6,2
F3 (+)	MGMG (18:3)	531,3407	8,137	22,1
	LysoPC (18:1)	521,3481	9,783	21,6
	GlcCer (d18:2/16:0)	697,5493	25,470	23,4
	PC (36:2)	785,5935	30,794	18,7
	MGDG (36:0)	803,6486	34,540	8,2
F3 (-)	MGMG(18:3)	560,3197	8,186	0,1
	LysoPC(18:1)	567,3550	9,868	19,4
	GlcCer(d18:2/16:0)	713,5471	24,494	15,2
	PC(36:2)	831,5980	30,745	10,3
	MGDG (36:0)	832,6212	32,410	5,8

ción de cloroformo e isopropanol para después analizarlos por LC/MS. La cantidad de la solución se ha adaptada, optimizando el enriquecimiento de los lípidos en los extractos [2]. Para el análisis de los extractos se ha utilizado un sistema Agilent-1290-UHPLC, acoplado a un 6540-QTOF. La separación por LC de los analitos se realizó mediante una columna de fase inversa C18-Reversed Phase con 20 mM formiato de amonio en agua y metanol como fase móvil [4]. En total, se ha trabajado con cuatro métodos LC/MS, que solamente se han diferenciado en los gradientes de soluciones y las condiciones del MS: Los analitos de la Fracción 1 (F1) se han determinado mediante una ionización por electrospray (ESI-POS), la Fracción 2 (F2) en el modo negativo (ESI-NEG) y la Fracción 3 (F3) en ambos modos (ESI-POS y ESI-NEG).

Exitosa aplicación de la automatización

Para un estudio de en el marco de la lipidómica con vegetales, se han analizado en total 84 muestras con los métodos descritos más arriba. El material de las muestras constituían 22 plantas individuales, las cuales se pueden clasificar en tres categorías principales. Se han preparado y analizado estas muestras tres veces. Además se han analizado 18 muestras de control de calidad (QC), para evaluar la repetibilidad de la preparación de muestras y del protocolo de LC/MS. Se han detectado, como se nota en la figura 3, en el trazado A la monoglicérida (MG) diglicéridos (DG's) triglicéridos (TG's) y esteroleos vegetales. El trazado B muestra el análisis de la fracción 2, que contiene los ácidos grasos libres de cadenas largas

(LCFA's) en el modo ESI-NEG. Los trazados C y D reflejan la detección de los fosfolípidos (PL's), esfingolípido y otros lípidos polares en los modos ESI-POS y ESI-NEG. Para poder evaluar la exactitud de las mediciones, se han calculado la desviación estándar en porcentajes (RSD) % de las superficies con una selección de compuestos. En los estudios de la lipidómica por lo general se acepta un valor umbral de ensayo (Cut-off-Value) para las superficies RSD por lo general en 30 % [5]. Es remarcable, que en aquellas muestras estudiadas por nosotros, para 18 muestras de control de calidad QC la RSD es menor a 25 %, y para la mitad de los analitos aún menos de 12 %.

Conclusiones

Como se ha demostrado con estas investigaciones, el GERSTEL-MPS-WorkStation con sus dos brazos (versión DualHead) es especialmente apto para la automatización de la preparación de muestras en el marco de los estudios metabolómicos, como en el caso aquí descrito para la determinación de las clases de lípidos en el material vegetal. Un método de fraccionamiento de lípidos sobre la base de SPE ha sido automatizado completamente con una configuración especialmente enfocada a la tarea, incluyendo el enriquecimiento de las fracciones de SPE mediante la vaporización de las soluciones. Los análisis por LC/QTOF de las fracciones han arrojado excelentes valores de repetibilidad en las determinaciones.

Referencias:

- [1] K. Sandra, M. Dunkle, C. Devos, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, GERSTEL Aktuell 49 (2015) 18-19

- [1] M. Dunkle, C. Devos, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, K. Sandra; LabCiencia (2015) Nr. 2, P 8-9
 [2] M. N. Dunkle, Y. Yoshimura, R. t'Kindt, A. Ortiz, E. Masugi, K. Mitsui, F. David, P. Sandra, and K. Sandra, in preparation
 [3] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497-509
 [4] K. Sandra, A. D. S. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, J. Chromatography A, 1217 (2010) 4087-4099
 [5] Wikipedia [https://de.wikipedia.org/wiki/Lipide#Lipidomik] (16.11.2015)
 [6] Max-Planck-Institut [www.mpg.de/6959315/ncbs_bangalore] (16.11.2015)

Nota: En la tercera y última parte de esta serie sobre la analítica de la metabolómica se publicará en la próxima edición, 51 del "GERSTEL Aktuell", se pronunciarán K.Sandra et al. sobre la automatización de un protocolo de derivatizaciones en el marco de los estudios de metabolómica mediante el uso del sistema "MPS-WorkStation-GC-QTOF".

Koen Sandra, Frank David, Christophe Devos, Bart Tienpont, Pat Sandra, Research Institute for Chromatography (RIC), 8500 Kortrijk, Bélgica

Gerstel, Alemania

Anote el 216-303



El nuevo TDU 2

Desorción Térmica, Headspace, SPME y mucho más – todo en un único sistema!

- Extracción Térmica / Desorción Térmica (TDS & TDU)
- Pirólisis Automatizada (PYRO)
- Inyección Líquida y Extracción Térmica de Líquidos en μ -Viales (ATEX)
- Headspace Dinámico (DHS), DHS Large y Headspace
- Twister (SBSE) y SPME
- Productividad con MAESTRO PrepAhead

El TDU 2 modular de GERSTEL le permite extraer más información de su muestra y obtener más datos de interés.

- ✓ Múltiples técnicas en un único sistema GC/MS
- ✓ Automatización eficiente y flexible
- ✓ Operación fácil y práctica
- ✓ Compatible con todos los sistemas estándar GC/MS
- ✓ Servicio de soporte y aplicaciones

Miles de usuarios en las empresas líderes en el mundo confían en nuestras soluciones de Desorción Térmica para hacer más

¿Qué podemos hacer para Ud?

GERSTEL

www.gerstel.es