APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY AL ANÁLISIS SIMULTANEO DE INSULINA E IGF-II

Tor, M.; Villalba, D.; Cubiló, M.D.; Molina, E.; Vilaró, F. [1] y Estany, J.

Departament de Producció Animal. UdL. Rovira Roure, 177. 25198 Lleida.
[1]Departament de Química. UdL. Rovira Roure, 177. 25198 Lleida.

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son hormonas peptídicas con propiedades metabólicas multifuncionales (McMurtry et al., 1997). Juntamente con la hormona del crecimiento son el principal punto de integración entre el control endocrino del crecimiento y el estado nutricional del animal, al tiempo que existen evidencias de variaciones genéticas en los IGFs relacionadas con la velocidad de crecimiento (Clutter et al., 1995). En la actualidad la técnica analítica mas frecuente en la determinación de los niveles plasmáticos de estas hormonas proteicas es el radioinmunoensayo. Para realizar correctamente estas determinaciones es necesaria la eliminación previa de las interacciones que sobre los IGFs ejercen sus proteínas portadoras (IGFBPs), por las que presentan una alta afinidad. Para ello, la solución mas eficaz (Lee y Henricks, 1990) es separar los IGFs de las IGFBPs mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). En la actualidad, la existencia de sistemas que combinan la espectrometría de masas (MS) con equipos RP-HPLC permite plantear la posibilidad de cuantificar directamente los niveles plasmáticos de IGFs a la salida de la columna. Con esta técnica, se pueden identificar complejos proteicos (Pandey y Mann, 2000) y se alcanzan altas sensibilidades de detección si se restringe el intervalo de masas de lectura. Además presenta dos ventajas adicionales: poder realizar determinaciones simultáneas de diferentes hormonas y facilidad de adaptación al plasma de diferentes especies animales. En este estudio, mediante la utilización de patrones, se tratará de optimizar las condiciones del trabajo del sistema RP-HPLC/MS, establecer cuales son las masas que confieren mayor sensibilidad y selectividad para la insulina y el IGF-II y calcular su curva de respuesta, en solución acuosa, a concentraciones similares a las del plasma sanguíneo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La insulina utilizada es de páncreas porcino suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim. Germany). El IGF-II utilizado es humano recombinante producido en *E.coli* y suministrado por GroPep (North Adelaide, Australia). Los patrones fueron reconstituidos en ácido fórmico 0,1M. El sistema utilizado es un módulo de separación Waters Alliance 2690 con un MS acoplado Micromass ZMD 2000MS. Para determinar el espectrograma de masas completo de los patrones se realizó la inyección por infusión directa registrando a distintos voltajes de cono (10V, 30V, 50V, 70V y 100V). Una vez determinadas las masas y voltajes óptimos de registro, se realizó la separación de mezclas de patrones mediante una columna Symmetry C_4 (2,1×150 mm, 300 Å, 5 μm; Waters Corporation, Milford, USA). Dicha separación permite una cuantificación efectiva de las hormonas. Se registraron 2 canales en modo Select Ion Recording (SIR): uno con las 2 masas seleccionadas para la

insulina (964amu a 30V y 1156amu a 50V) y otro con las masas seleccionadas para el IGF-II (934amu a 30V y 1068amu a 50V). El ajuste de las curvas lineales se realizó mediante el procedimiento REG y el ajuste de las curvas logarítmicas mediante el procedimiento NLIN, ambos del programa SAS, 1999.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se puede observar el espectrograma de masas para la insulina. No se presentan las lecturas realizadas a voltajes superiores a 50V debido a que no aparecieron masas claramente más abundantes o presentaron abundancias similares a las realizadas a 50V pero con mayor ruido de fondo. La lectura realizada a 10V se desestimó y tampoco se presenta, debido a que las masas más abundantes son sensiblemente inferiores a las que se obtuvieron en las lecturas realizadas a 30V y 50V. Para obtener un equilibrio entre sensibilidad y selectividad se decidió leer la insulina con un SIR de 2 masas : 964amu a 30V y 1156amu a 50V. Para el IGF-II se desarrolló un proceso paralelo escogiéndose también un SIR de 2 masas: 934 amu a 30V y 1068amu a 50V.

En la Figura 2 se presentan los cromatogramas de la insulina y el IGF-II a una concentración de 500 ng/ml. En estas condiciones de trabajo, el IGF-II presentó un tiempo de retención 1,17' inferior al de la insulina. Fue posible la integración correcta de ambos picos a partir de una concentración de 250 ng/ml. En ambos SIRs la señal registrada del compuesto para el que las masas no estaban optimizadas, no superó el 2% de la señal obtenida cuando si lo estaban. Por tanto este método de registro presenta una elevada selectividad para estos dos compuestos.

Como se observa en la Figura 3, para el intervalo estudiado, el ajuste lineal para la respuesta de la insulina fue aceptable, mientras que para el IGF-II el mejor ajuste es a una función logarítmica. Como resumen de este trabajo preliminar puede decirse que con la metodología utilizada se puede cuantificar simultáneamente la insulina y el IGF-II en soluciones acuosas, en el mismo rango de concentraciones que tiene el IGF-II en el plasma sanguíneo. Para poder cuantificar la insulina a sus niveles plasmáticos deberá mejorarse la sensibilidad. Los cromatogramas, cuando la matriz fue el plasma sanguíneo, mostraron un elevado ruido de fondo en el tiempo de retención de ambos compuestos. Por ello, para desarrollar un método de análisis en plasma, que permita mantener el mismo nivel de sensibilidad, probablemente será necesario realizar un fraccionamiento previo del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clutter, A. C.; Spicer, L. J.; Woltmann, M. D.; Grimes, R. W.; Hammond, J. M.; Buchanan, D. S.(1995). **Journal of Animal Science** *73*, 1776-1783

Lee, C. Y. ; Henricks, D. M. (1990). **Journal of Endocrinology**, 127, 139-148.

McMurtry, J.P.; Francis, G.L.; Upton, Z. (1997). **Domestic Animal Endocrinology** 14, 199-229.

Pandey, A.; Mann, M. (2000). **Nature** 405: 837-846.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la CICYT (proyecto AGF99-1221)

Figura 1. Espectrogramas de masas de la insulina a diferentes voltajes de cono.(← masas de registro seleccionadas)

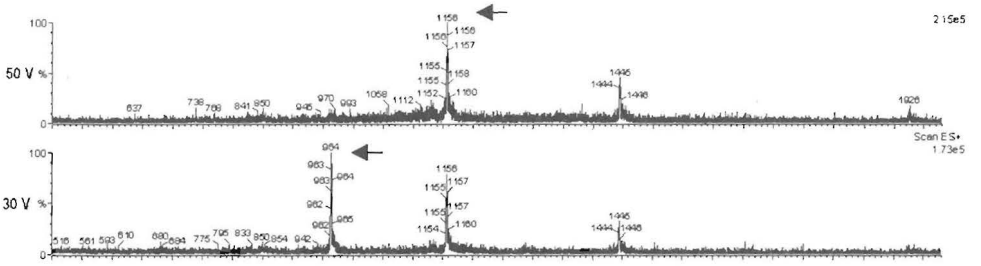


Figura 2. Cromatogramas simultáneos de IGF-II (SIR a 934amu a 30V y 1068amu a 50V) e insulina (SIR a 964amu a 30V y 1156amu a 50V) a una concentración de 500ng/ml

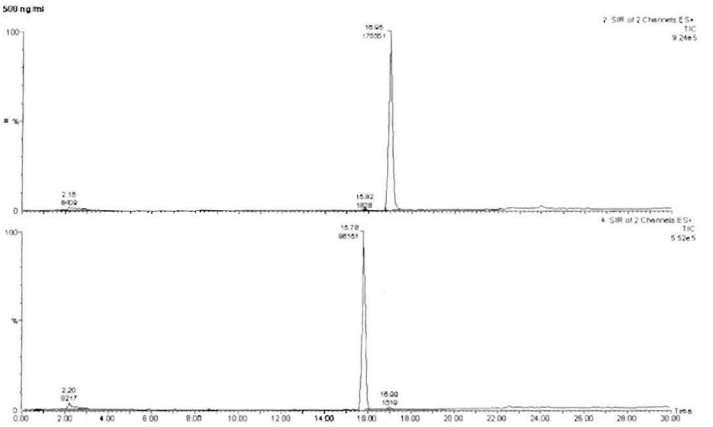


Figura 3. Curva de respuesta del IGF-II (SIR a 934 amu a 30V y 1068amu a 50V) e insulina (SIR a 964amu a 30V y 1156amu a 50V)

