

Preparación de muestras para su análisis metabólico

Muestras

- Meconio (muestra obtenida a las 10 h del nacimiento/diferente bebé)
- Meconio (muestra obtenida a las 72 h del nacimiento/diferente bebé)
- Copro adulto (mujer 41 años)
- Muestra #254 (Leche materna pasteurizada)
- Muestra #41 (Leche materna pasteurizada)

Metodología 1 (M1) de preparación de muestras de meconio (Ver diagrama adjunto Metodología 1)

- 1.- Homogenizar la muestra en su contenedor original, utilizando un palillo o abatelenguas delgado de madera.
 - 2.- Bajar la muestra (microcentrífuga – 10 segundos).
 - 3.- Pesar 200 mg de muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
 - 4.- Adicionar 800 µl de PBS 1X (pH 6.5). Relación 1:5 (p/v).
 - 5.- Homogenizar con vortex (2 min, velocidad media).
 - 6.- Toma de pH en las muestras.
 - 7.- Ajustar pH (pH 7.4 y pH 9.1, aprox.).
 - Se utilizó 2 gotas de NaOH 1M (pH 14) para ajustar a pH 7.4
 - Se utilizó 3 gotas de NaOH 1M (pH 14) para ajustar a pH 9.1
 - 8.- Homogenizar con vortex (2 min, velocidad media).
 - 9.- Centrifugar durante 30 min, 4°C, 17,460 g (13,800 rpm).
 - 10.- Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo (desechar el pellet formado).
 - 11.- Filtrar el sobrenadante utilizando filtros de 0.45 µm.
 - 12.- Filtrar nuevamente, pero con filtro de 0.22 µm.
 - 13.- Toma de pH final
 - 14.- NOTA: Si se desea sonicar (20 seg, amplitud de 20, pulso continuo, punta S&M1003 - SONICS Vibra cell), se realiza después del paso 8.
- NOTA: Mantener las muestras en congelación hasta su análisis.

Metodología 2 (M2) de preparación de muestras de leche materna ultrapasteurizada (Ver diagrama adjunto Metodología 2)

- 1.- Homogenizar la muestra en su contenedor original, durante 10 min en vortex a velocidad media.
- 2.- Tomar una alícuota de 200 μ L de muestra en un tubo eppendorf nuevo de 2 mL.
- 3.- Adicionar 700 μ L de metanol grado HPLC (Fermont).
- 4.- Adicionar 700 μ L de terbutil metil éter anhydrous 99.8% (Sigma)
- 5.- Homogenizar con vortex durante 1 min, velocidad media.
- 6.- Centrifugar 15 min, 7000 rpm (4500 xg), 4°C
- 7.- Recuperar sobrenadante
- 8.- Filtrar el sobrenadante (filtros 0.22 μ m).
- 9.- Verificar pH final.
- 10.- NOTA: Si se desea sonicar (20 seg, amplitud de 20, pulso continuo, punta S&M1003 - SONICS Vibra cell) se realiza después de agregar el terbutil metil éter.

NOTA: Mantener las muestras en congelación hasta su análisis.

Metodología 3 (M3) de preparación de muestras de leche materna ultrapasteurizada (Ver diagrama adjunto Metodología 3)

- 1.- Homogenizar la muestra (vortex 20 seg, velocidad media).
- 2.- Tomar una alícuota de 200 μ L
- 3.- Centrifugar 30 min, 13,800 rpm (17,460 xg), 4°C.
- 4.- Recuperar el sobrenadante
- 5.- Toma de pH
- 6.- Filtrar el sobrenadante

Valores de pH de las soluciones al momento de ser utilizadas en la técnica.

Solución	pH
Acetato de amonio	5.0
HCl 1M	4.0
Ácido acético	2.0

PBS 1X (Karina)	6.5
NaOH 1M	14
Tiras reactivas HYDRION (0.0 – 14.0)	

Nota1: a todas las muestras en base PBS se les realizó una dilución 1:6 (100 mcl + 500 de agua mili Q), para ser inyectadas en el equipo

Nota2: a las muestras LP41* y LP254* se les realizó una dilución 1:6 (100 mcl + 500 de agua mili Q) para ser inyectadas en el equipo.

Muestra	Clave	pH inicial	pH ajustado	pH final	Sonicación	Metodología Buffer o solvente	Observaciones
Meconio 10 h	A+	6.0	7.5	---	SI	M1 - Buffer PBS	Sin filtrar
Meconio 10 h	A ¹	6.0	9.5	9.0	SI	M1 – Buffer PBS	
Meconio 72 h	B	5.0	7.5	7.5	SI	M1 - Buffer PBS	
Meconio 72 h	B ¹	5.0	9.5	9.5	SI	M1 - Buffer PBS	
Copro adulto	C ¹	6.0	7.5	8.5	SI	M1 - Buffer PBS	
Copro adulto	C ²	6.0	9.5	7.5	SI	M1 - Buffer PBS	
Copro adulto	C ³	6.0	7.5	8.5	NO	M1 - Buffer PBS	
Copro adulto	C ⁴	6.0	9.5	7.5	NO	M1 - Buffer PBS	
Leche pasteurizada	41	---	---	5.0	NO	M2 - MetTerButEt e	
Leche pasteurizada	254	---	---	5.0	NO	M2 – MetTerButEt e	
Leche pasteurizada	254s	---	---	5.0	SI	M2 – MetTerButEt e	
Meconio 72 h	B sup	---	---	5.5	NO	M2 – MetTerButEt e	Sin filtrar Fase superior
Meconio 72 h	B int	---	---	7.0	NO	M2 - MetTerButEt e	Fase intermedia Filtrada con 0.45 y 0.22
Leche pasteurizada	LP41*	---	---	7.3	NO	M3 – ningún solvente o buffer	Sin buffer o solventes, solo separación física
Leche pasteurizada	LP254*	---	---	7.5	NO	M3 - ningún solvente o buffer	Sin buffer o solventes, solo separación física

Determinación de las condiciones de análisis en el MRMS

Las condiciones óptimas de análisis en el instrumento fueron determinadas en ionización positiva. La naturaleza de las moléculas presentes presentan un comportamiento más estable y presentan una tasa de ionización 90-95% en condiciones de electrospray (ESI). Las matrices en las que se realizaron las extracciones son promotoras de ionización positiva.

Las muestras fueron infundidas a una velocidad de 120 $\mu\text{L/h}$, manteniendo una presión de gas nebulizante (N_2) de 1 bar y un flujo de gas de secado de 2 L/min a una temperatura de 100°C. La ionización dentro del sistema ESI fue promovida mediante la aplicación de un voltaje de capilar de 4500 V y un desplazamiento de -500 V.

En la figura 1 se muestran los parámetros introducidos en el instrumento para efectuar el análisis de las muestras.

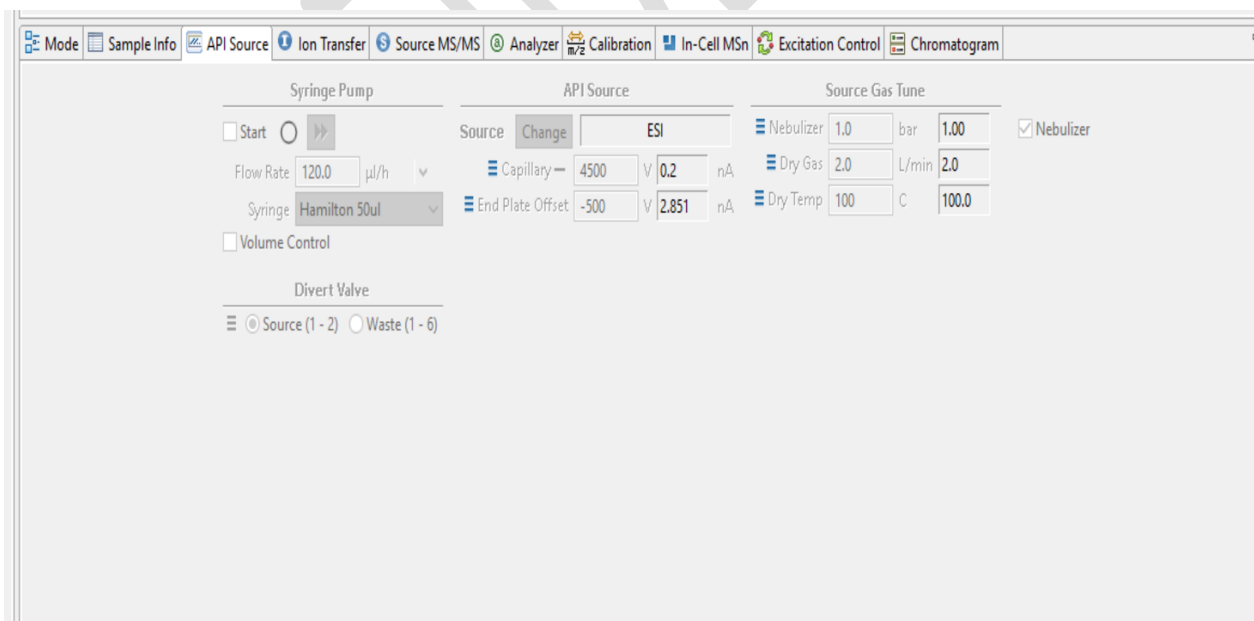


Figura 1.- Parámetros determinados en el equipo de MRMS para el análisis de las muestras sometidas a cada uno de los tratamientos evaluados.