



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Determinación de testosterona en muestras de orina
mediante análisis por Dilución Isotópica y
Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de
Masas en tándem**

Amaia Ereño Artabe

Julio 2016, Oviedo



Pablo Rodríguez González y Adriana González Gago, Profesores del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado **“Determinación de testosterona en muestras de orina mediante análisis por Dilución Isotópica y Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem”**

ha sido realizado por el alumno Amaia Ereño Artabe bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 13 de Julio de 2016

Fdo: Pablo Rodríguez González

Fdo: Adriana González Gago

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al grupo de investigación de José Ignacio García Alonso, y en especial a mis dos tutores por su dedicación, paciencia y aportación al desarrollo de mi conocimiento. También a la estudiante de Doctorado Amanda por estar a mi lado siempre que lo he necesitado, y a los compañeros de sala por hacer los días más a menos.

Gracias al Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón por impulsar la idea de este proyecto.

Y como no agradecer a los compañeros del master por compartir conmigo momentos de agonía pero también de celebraciones. A mis compañeros de piso por empezar y acabar conmigo tanto los buenos como los malos días.

Por último, y sobre todo, agradecer a mis padres, ya que sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

Gracias.

Eskerrik asko.

Índice

Introducción.....	1
1. Testosterona.....	1
2. Interés del análisis de la testosterona.....	2
2.1. Clínico.....	2
2.2. El dopaje.....	2
3. Métodos de análisis de la testosterona.....	3
3.1. Inmunoensayos.....	3
3.2. Cromatografía Líquida con detección ultravioleta.....	4
3.3. Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía de Gases.....	4
3.4. Espectrometría de Masas acoplado a Cromatografía Líquida.....	5
3.4.1. Fuente de ionización electrospray (ESI).....	5
3.4.2. Espectrometría de Masas en tándem	6
3.5. Dilución isotópica mediante Espectrometría de Masas.....	8
3.5.1. IDMS en esteroides y hormonas esteroides marcadas.....	13
3.5.2. Cuantificación mediante Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD).....	14
3.5.3. Trazabilidad.....	14
Objetivos.....	16
Experimental.....	17
1. Materiales y reactivos.....	17
1.1. Reactivos.....	17
1.2. Materiales.....	17
1.3. Muestras de orina.....	17
2. Instrumentación.....	18
2.1. Equipo HPLC-MSMS.....	18
2.2. Otra instrumentación.....	18
3. Procedimientos experimentales.....	19
3.1. Estudio del patrón de fragmentación de la testosterona mediante HPLC-ESI-MSMS....	19
3.2. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización y celda de colisión.....	20
3.3. Estudio de la pureza del clúster de testosterona.....	21
3.4. Caracterización de trazador ¹³ C ₂ -testosterona.....	21
3.5. Cuantificación de testosterona en muestras acuosas fortificadas.....	22
3.6. Cuantificación de testosterona en muestras de orina.....	22

3.7. Cuantificación de testosterona en muestras de orina fortificadas.....	22
4. Procedimientos de matemáticos y herramientas de cálculo.....	23
4.1. Software de cálculo en Excel.....	23
4.2. Programa IsoPatrn©.....	23
4.3. Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD).....	23
Resultados y discusión.....	26
1. Caracterización de testosterona.....	26
2. Optimización de los parámetros.....	27
3. Estudio de la pureza del clúster de testosterona.....	31
4. Caracterización de trazador ¹³ C ₂ -Testosterona.....	32
4.1. Calculo del enriquecimiento isotópico del trazador.....	33
4.2. Calculo de la concentración.....	33
5. Cuantificación de testosterona en muestras acuosas fortificadas.....	36
6. Cuantificación de testosterona en muestras de orina.....	38
7. Cuantificación de testosterona en muestras de orina fortificadas.....	41
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45

ABREVIATURAS

T - Testosterona

E - Epitestosterona

AAS - Esteroides anabólicos andrógenos

IOC – Comité Olímpico Internacional

WADA – Agencia Mundial de Anti Dopaje

DHEA - Dihidriepiandosterona

Adion - Androstenediona

Andro - Androtestosterona

Eio - Etiocloranolona

RIA – Radioinmunoensayo

ELISA – Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima

IRMS – Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas

GC/C – Cromatografía de Gases con horno de combustión

GC-MS – Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

HPLC-UV – Cromatografía Líquida de alta eficacia acoplada a detector ultravioleta visible

LC-MS – Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

HPLC-MS/MS – Cromatografía Líquida de alta eficacia acoplado a Espectrometría de Masas en tandem

UPLC – Cromatografía Líquida de ultra alta eficacia

API – Ionización a Presión Atmosférica

ESI – Ionización por Electrospray

APCI – Ionización Química a Presión Atmosférica

SIM – monitorización selectiva de iones

PI – iones producto

SRM – monitorización selectiva de iones producto

IDMS – Dilución Isotópica mediante Espectrometría de Masas

IPD – Deconvolución de Perfiles Isotópicos

QqQ – Detector triple cuadrupolo

IUPAC – Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

FIA – Análisis por Inyección en Flujo

SD – Desviación estándar

LOD – Limite de detección

LOQ – Limite de cuantificación

INTRODUCCIÓN

1. Testosterona

La testosterona (Fig. 1) es una hormona natural producida por diversos seres vivos, entre ellos los mamíferos y por lo tanto también el ser humano. En el ser humano principalmente es producida por los testículos de los hombres y en los ovarios de las mujeres, aunque pequeñas cantidades también son secretadas por las glándulas suprarrenales. Es una hormona esteroide

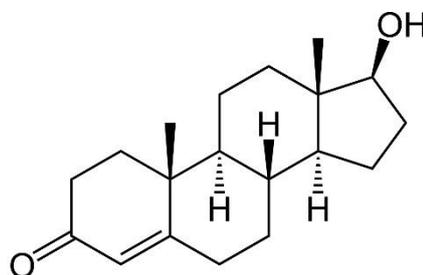


Fig. 1.- Molécula de testosterona

(compuesto orgánico derivado del esterano) anabólico del grupo andrógeno,¹ y es la principal hormona sexual masculina. En el cuerpo se encuentra en dos formas, enlazada o ligada y libre. La enlazada es la que esta combinada con moléculas de proteína que la inactiva o la vuelve metabólicamente inerte. En los hombres el 95% es de este tipo pero en mujeres la cifra es mayor 97-99%. La libre o la testosterona biodisponible es metabólicamente activa. Las funciones de la testosterona en el humano se recogen en la Tabla 1. La testosterona fue sintetizada y purificada por primera vez por Ruckzika y Butenandt en 1935² que les proporciono el premio Nobel de Química.

Tabla 1.- Funciones de la testosterona en hombres y mujeres.^{1,3}

Hombre	Mujer
En el feto permite la diferenciación sexual (formación de los órganos masculinos)	Mantiene el deseo sexual.
En el adolescente contribuye al desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (cambios en la voz, vello facial, púbico y axilar, crecimiento y maduración de huesos y crecimiento de genitales externos).	Es responsable de la sensibilidad del clítoris y pezones, vinculados con el placer sexual.
En el adulto controla las funciones sexuales (deseo sexual, calidad de erección y producción de espermatozoides).	Contribuye a la resistencia ósea, al desarrollo de la masa muscular y la fuerza.
Mantiene la apariencia y estructura típicas masculinas.	Ayuda a la sensación general de bienestar y al nivel de energía.
Es importante para la salud y funcionamiento físico teniendo una influencia decisiva en el estado de ánimo y la sensación de bienestar.	Mejora el ánimo y la experiencia sexual.

2. Interés del análisis de la testosterona

2.1. Clínico

El análisis de la testosterona en orina es esencial para detectar desordenes relacionados con andrógenos, como la alopecia en hombres, alopecia androgénica en mujeres y evaluar el riesgo de padecer cáncer de mama y el efecto de la crisis⁴ en niveles de testosterona. En el caso de los dos sexos existe relación entre la testosterona y la sensibilidad a la insulina, que en el caso de los hombres el hipoandrogenismo ha sido asociado con la resistencia a la insulina.⁵ En el caso de las mujeres esta se asocia también el hiperandrogenismo con el síndrome de ovario poliquístico.^{5,6} También juega un papel importante como biomarcador de cáncer de próstata. Por lo tanto, desde el punto de vista de la salud es interesante conocer el nivel de testosterona de una persona. Para ello, es común medir la relación entre la testosterona (T) y su isómero la epitestosterona (E).

2.2. El dopaje

Pero la testosterona es un compuesto que se ha utilizado mucho como sustancia dopante junto con otros esteroides anabólicos andrógenos (AAS)⁷ en deportes de alto nivel y rendimiento. La testosterona tiene efectos anabólicos como el crecimiento del tamaño y peso muscular y el crecimiento esbelto de la masa corporal.⁸ Además, basados en la estructura de la testosterona se han sintetizado, comercializado e introducido en el deporte varios esteroides sintéticos. El empleo de anabolizantes para aumentar las capacidades físicas de los atletas está prohibido desde 1970 en el caso de los esteroides anabólicos sintéticos y 1980 para la testosterona por algunas organizaciones internacionales de deporte como el Comité Internacional Olímpico (International Olympic Committee, IOC), la Federación Internacional del Deporte y la Agencia Mundial Anti Dopaje (World Anti Doping Agency, WADA),⁹ con el fin de fomentar el juego limpio y debido a los posibles efectos tóxicos y secundarios que estas sustancias pueden provocar en el organismo.^{10,2}

Para saber si se ha producido un abuso de dopaje, se analizan en la orina de los deportistas diferentes esteroides como la testosterona (T), epitestosterona (E), dihidroepiandosterona (DHEA), androstenediona (Adion), dihidrotestosterona (DHT), y sus metabolitos más destacados, como la androtestosterona (andro) etiocloranolona (Eio) etc. Mediante la medida de concentraciones de 10 esteroides y los ratios de interés se crea un perfil, cuando el perfil no entra dentro de los valores debe realizarse un análisis de confirmación de dopaje.²

La detección de niveles anormales de testosterona se lleva a cabo midiendo la relación T/E tanto para el control de casos de dopaje como para diagnóstico clínico. El problema en la detección de casos de dopaje es que esta relación se puede modificar también tomando epitestosterona, por lo que se suele medir también la cantidad de epitestosterona. La Agencia Mundial de Anti-Doping indica que en el caso de que la relación T/E fuera mayor o igual a 4 o la concentración de epitestosterona en orina superior a 200 ng/mL existiría la sospecha de dopaje, por lo que sería necesario llevar a cabo otros análisis que confirmen o no el dopaje.¹¹ Los valores normales de testosterona en orina en hombres es 20-60 ng/mL y en mujeres 7-15 ng/mL.^{2,11}

En España el Laboratorio Antidopaje de Barcelona es el que está acreditado por la Agencia Mundial de Antidopaje para el control de dopaje en atletas. Han realizado servicios en grandes eventos deportivos como los Juegos Olímpicos de 1992 (Barcelona), Juegos Pan-americanos de 1991 (La Habana, Cuba), 1995 (Mar de Plata, Argentina (laboratorio satélite en La Habana) y 2011 (Guadalajara, Mexico), World Junior Championships in Athletics 2012 (Barcelona) etc.¹²

3. Métodos de análisis de la testosterona

3.1. Inmunoensayos

En el control del dopaje se han utilizado y publicado diferentes métodos para la detección del abuso de testosterona. Se encuentran diversas publicaciones de métodos basados en inmunoensayos para la detección de testosterona o epitestosterona incluyendo radiounmunoensayos RIA¹³, ensayos ELISA¹⁴ e inmunosensores.¹⁵

Los inmunoensayos son métodos rápidos y simples pero las reacciones cruzadas pueden dar falsos positivos.¹⁶ En el caso de los esteroides como la estructura que presentan todos ellos es similar las reacciones cruzadas son más comunes, por lo tanto la especificidad de estos métodos no es muy buena. Muchas publicaciones describen aplicaciones para determinación total de testosterona en orina, pero no miden la testosterona libre. Por lo tanto se puede decir que los inmunoensayos no son muy buenos métodos para el análisis cuantitativo ya que existe un riesgo de reactividad cruzada entre diferentes esteroides, además presentan otras desventajas como tiempos largos de espera para la obtención de resultados, elevados costes y requisitos de trabajo.¹¹

3.2. Cromatografía Líquida con detección ultravioleta

El análisis de testosterona, sus metabolitos y otras drogas también se puede llevar a cabo mediante Cromatografía Líquida con detección ultravioleta (HPLC-UV).^{17,18} Mediante esta técnica se consigue separar los compuestos y así disminuir problemas de interferencias que encontramos en los inmunoensayos, pero la sensibilidad que ofrece es pobre, la línea base no es estable cuando se usan gradientes para la elución y en caso de que haya metabolitos con estructuras similares a la testosterona puede dificultar la separación dando lugar a interferencias.¹⁹

3.3. Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía de Gases

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas es otra alternativa para el análisis de T y E. Esta técnica es rápida, con mayor poder de resolución y sensibilidad que la Cromatografía Líquida con detección ultravioleta, pero su ejecución requiere más experiencia. La principal dificultad que se plantea en la separación de T y E mediante Cromatografía de Gases es que son sustancias no volátiles y por tanto es necesario llevar a cabo una derivatización previa al análisis, que muchas veces resulta un proceso complicado que conlleva mucho tiempo.^{13,20} Pero el desafío realmente importante en el control antidopaje es conseguir detectar la administración de andrógenos sintéticos, los cuales tienen exactamente la misma estructura química que los naturales producidos por el organismo.¹¹ Para conocer de forma inequívoca si se ha producido un caso de dopaje a través de la administración de andrógenos sintéticos se suele recurrir a la medida de relaciones isotópicas de carbono. Si se tiene en cuenta que la testosterona u otros esteroides producidos sintéticamente son de origen vegetal y que normalmente la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en el cuerpo humano es más baja que en plantas,⁸ la administración de andrógenos sintéticos podrá ser detectada a través de la medida de la relación isotópica de los isótopos estables del carbono. Desde los años 90 el uso de Espectrometría de Masas para la medición de relaciones isotópicas del carbono (Carbón Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS) acoplado a la Cromatografía de Gases con horno combustión (GC/C/IRMS) se ha ido desarrollando e implementando para la confirmación del abuso de testosterona y otros esteroides sintéticos en el deporte.⁸ El procedimiento habitual consiste en hacer un test inicial de screening en el que se lleva a cabo la cuantificación de testosterona y epitestosterona utilizando GC-MS. El problema es que el GC-MS no es siempre satisfactorio ya que los problemas de sensibilidad y el número limitado de iones cualificadores, según WADA (World Anti-Doping Agency), pueden dar identificaciones ambiguas, sobre todo en concentraciones pequeñas de T

y E.⁸ Por lo tanto en este método es necesario tener la molécula objetivo de análisis purificada, y esto supone llevar a cabo etapas de extracción y purificación de una matriz muy compleja, como es la orina.¹⁰ Después del screening, aquellas muestras que sobrepasan el límite del ratio T/E>4 son posteriormente analizadas mediante GC/C/IRMS.^{21,22}

3.4. Espectrometría de Masas acoplado a Cromatografía Líquida (LC-MS).

Como se ha visto hasta ahora las técnicas utilizadas habitualmente para el análisis de testosterona tenían alguna desventaja. Por esta razón se empezaron a desarrollar métodos mediante Cromatografía Líquida acoplada al espectrómetro de masas en tándem²³ (HPLC-MS/MS), ya que mediante ésta se pueden separar los esteroides, la sensibilidad aumenta respecto al detector ultravioleta, los iones cualificadores son más y así se da una identificación más segura y se evita la etapa laboriosa de derivatización.^{8,10} Además en los últimos años se han hecho avances interesantes en la Cromatografía de Líquidos que consisten en utilizar mayores presiones hacen velocidad lineal sea mayor utilizando diámetros de partículas menores y columnas más estrechas, consiguiendo así una mejor eficiencia en las separaciones. Los sistemas de cromatografía líquida ultra eficaz (UPLC), los cuales tienen partículas empaquetadas con diámetros menores a 1,8 µm, acoplados a Espectrometría de Masas en tándem son métodos potentes para conseguir buenas resoluciones de pico, sensibilidad y rapidez en el análisis.¹⁹

3.4.1. Fuente de ionización electrospray (ESI)

Para realizar el acoplamiento entre la técnica de separación y analizador de masas es necesaria una fuente de ionización que transforme los compuestos que llegan separados a la salida de la columna cromatográfica en especies iónicas y que pase los iones de la fase líquida a gaseosa, este proceso suele tener lugar a presión atmosférica (API, Atmospheric Pressure Ionization), siendo las fuentes más habituales la de tipo electrospray (ESI) y la de ionización química a presión atmosférica (APCI). En este trabajo la fuente que se ha utilizado ha sido el electrospray.

En la fuente de ESI^{24,25} (Fig.2), desarrollada a mediados de los 80, la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un elevado potencial negativo ($\pm 3-5$ kV), lo que produce junto con la alta presión ejercida por el sistema cromatográfico, un spray de microgotas cargadas. Mediante un flujo de N₂ el disolvente se evapora creando gotas cargadas cada vez más pequeñas. Estas gotas debido a repulsiones electrostáticas se dividen hasta provocar la desolvatación y creación de iones en fase gaseosa, proceso que se conoce como expulsión de Coulomb. De esta manera los iones generados son finalmente dirigidos hacia el analizador

mediante una diferencia de potencial y la presión del sistema. Como la ionización se da a presión atmosférica antes de llegar al analizador de masas, que tiene vacío, los iones pasan por una interfase de pre-vacío. La fuente ESI puede trabajar a flujos bajos, entre 0,5 y 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. Esta técnica de ionización se considera una técnica suave, así los iones producidos son principalmente los derivados de la incorporación o cesión de uno o varios protones a las moléculas, y también se pueden originar iones correspondientes a aductos con otras especies presentes en la fase móvil, como aductos de sodio y amónico, sin que tenga lugar la fragmentación de la molécula. Las moléculas grandes pueden tener varias posiciones básicas por lo que pueden dar lugar iones con cargas múltiples. El grado ionización que alcanzan las moléculas se ve afectado por el pH de la fase móvil, la matriz, la naturaleza de los analitos...

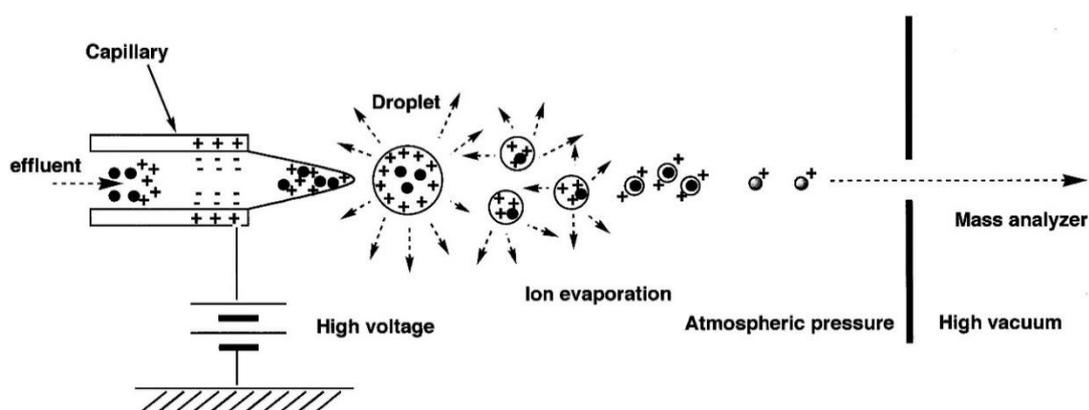


Fig. 2.- Modo de trabajo de la fuente de ionización electrospray.

3.4.2. Espectrometría de Masas en tándem

En la Espectrometría de Masas con un único analizador de masas se detecta el ion molecular del analito de interés y así como los fragmentos que se generan en la fuente de ionización o durante el trayecto hasta el analizador de masas. Existen dos modos de medida cuando se trabaja con un solo analizador. En el modo scan o barrido de iones el analizador realiza un barrido de todas las relaciones m/z dentro de un rango seleccionado y por lo tanto se detectan todos los iones que se hayan generado en la fuente. Con el modo SIM (Selected Ion Monitoring) ²⁶ en cambio sólo se miden los iones de m/z concretos que se hayan seleccionado. Mientras que el modo scan resulta adecuado para la identificación de sustancias a través de la medida del espectro de masas completo de la molécula, el modo SIM resulta más útil para la cuantificación ya que al medir solamente relaciones m/z seleccionadas en lugar del espectro de masas completo, habrá más tiempo para la medición de las masas de interés por lo que proporcionara una mayor sensibilidad. Además el modo SIM permite también obtener mejores límites de detección ya

que al medir un menor número de relaciones m/z los fondos espectrales serán mucho más bajos proporcionando así una mejor señal/ruido.

La Espectrometría de Masas en tándem consiste en el acoplamiento de más de un analizador de masas en serie. Un equipo que se utiliza comúnmente para hacer Espectrometría de Masas en tándem es el denominado triple cuadrupolo (QqQ). Como el nombre indica contiene tres analizadores de tipo cuadrupolo. El primero se utiliza para seleccionar el ion precursor de interés, el segundo funciona como celda de colisión donde se presuriza la muestra con un gas inerte (N_2 o Ar) con una energía para que fragmente el ion precursor, y así los fragmentos que se crean se analizan en el tercer cuadrupolo (Fig. 3).

Aparte de los dos modos de medida ya descritos, que se pueden llevar a cabo utilizando solamente uno de los analizadores de masas del instrumento, la Espectrometría de Masas en tándem permite nuevos modos de medida al combinar el uso de más de un analizador de masas.

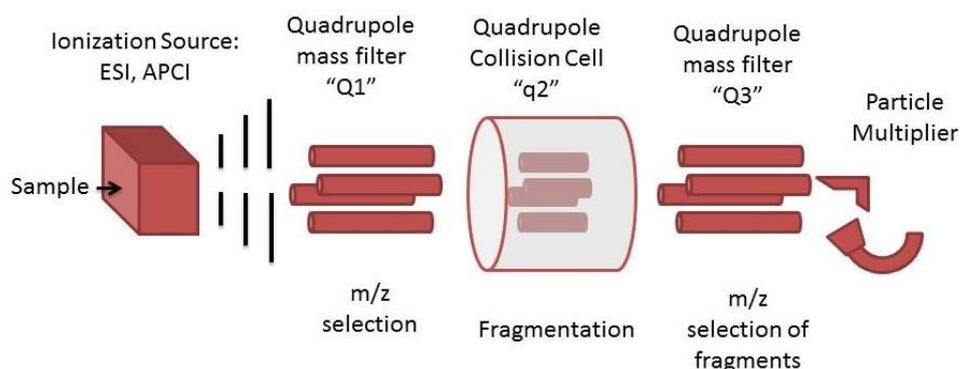


Fig. 3.- Esquema de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

Cuando se trabaja con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo existen cuatro modos adicionales de medida teniendo en cuenta la capacidad de cada uno de los analizadores de medir en modo barrido o seleccionar las relaciones m/z de interés:

Barrido iones producto (PI): Se selecciona el ion precursor en el primer analizador y en el segundo se miden todos los fragmentos que se generan en la celda de colisión haciendo un barrido. Este modo de trabajo proporciona información sobre cómo se rompe la molécula original, permitiendo así poder conocer su estructura.

Barrido iones precursores: en este caso se hace en el primer cuadrupolo un barrido de todas las relaciones m/z dentro de un determinado rango de interés, en la celda se fragmentan todos los iones precursores y en el segundo analizador se selecciona una/s m/z concreta/s. Esto se utiliza

para determinar la presencia de un ion producto en concreto, puede ser útil para detectar grupos funcionales.

Perdidas neutras: en este modo se sincronizan los analizadores para detectar los iones producto que han perdido una masa en concreto de su ion precursor. De este modo se puede conocer que moléculas sufren la pérdida de un fragmento neutro.

Monitorización de iones seleccionados (SRM):²⁶ en este caso se selecciona el ion precursor deseado mediante el primer analizador de masas, se fragmenta en una celda de colisión y seguidamente se miden el/los ion/es producto de interés en el segundo analizador. Este modo de trabajo se utiliza principalmente para la cuantificación de analitos que se encuentren a bajos niveles de concentración en muestras con matrices complejas ya que mediante este modo de medida se consigue mejorar los límites de detección pero sobre todo se mejora sustancialmente la selectividad de método, ya que es bastante improbable que aunque dos moléculas tengan el mismo peso molecular al fragmentarse en la celda de colisión den lugar a iones producto de igual masa. Así se eliminan interferencias espectrales que no podrían discriminarse trabajando con un único cuadrupolo y que son muy comunes en muestras reales con matrices complejas como la orina. Por otra parte también se gana sensibilidad, ya que el segundo analizador tiene que medir un número reducido de masas concretas generadas a partir de ciertos iones concretos seleccionados en el primer analizador. Mediante este modo se consigue mayor selectividad y mejora la relación señal/ruido por lo que es muy útil para la cuantificación de analitos en muestras reales.

3.5. Dilución Isotópica mediante Espectrometría de masas, IDMS.

Para la cuantificación de un analito en una muestra, es necesario por lo general construir un curva de calibrado que representa el cambio de la señal analítica respecto a la concentración de analito. En muchos casos para corregir efectos de matriz se realizan adiciones de estándar sobre las muestras. Para corregir fluctuaciones en las medidas así como la deriva instrumental se suelen utilizar estándares o patrones internos. Es muy común el uso de moléculas que están marcadas en uno o varios átomos con un isótopo estable de un elemento que no es el más abundante en la naturaleza como estándares internos,^{13,20,27} este método se denomina Dilución Isotópica y se ha aplicado durante décadas en la determinación de todo tipo de moléculas orgánicas.²⁸⁻³¹ Por tener propiedades físico-químicas idénticas a la molécula que se quiere cuantificar los análogos marcados isotópicamente se consideran estándares internos perfectos.³²

La Dilución Isotópica es un modo de cuantificación que se basa en modificar intencionadamente la composición isotópica del compuesto o elemento que se quiere determinar añadiéndole la forma enriquecida isotópicamente del mismo compuesto o elemento. Se desarrolló inicialmente para la cuantificación elemental y unos años más tarde para la determinación de algunas moléculas orgánicas como aminoácidos o ácidos grasos utilizando para ello análogos a los analitos de interés marcados isotópicamente, típicamente en ^2H , ^{13}C pero también en algunos casos en ^{18}O o ^{15}N . Para aplicar este método se añadía sobre la muestra el análogo marcado analito y tras aislar una fracción de la muestra, se llevaba a cabo el análisis mediante métodos ópticos.³³ Hoy en día el cambio de la composición isotópica de la mezcla se mide mediante la Espectrometría de Masas por ello se conoce comúnmente mediante las siglas IDMS.

Existen dos modos de cuantificación mediante IDMS, dependiendo del tipo de trazador que se utilice y en qué momento se añada a la muestra. En el modo específico (Species-Specific) el trazador se añade al comienzo del análisis y tiene la misma estructura química que el analito pero está enriquecido isotópicamente en alguno de los átomos que forman parte de la molécula. Mediante este modo de trabajo es posible corregir todos los errores derivados del procedimiento de preparación de muestra y la detección. Por otro lado, cuando se trabaja en el modo inespecífico (Species-Unspecific) el trazador se añade de forma continua sobre el extracto de la muestra una vez que ya se ha sometido a la separación cromatográfica, y antes de que los analitos alcancen la fuente de ionización. En este caso el trazador puede presentar una estructura química diferente a la del analito, lo que resulta de gran utilidad cuando no se dispone del trazador específico, pero solamente permite corregir los errores derivados de la etapa de detección. Por ello se tiende a trabajar en el modo específico siempre que sea posible.

En el modo de cuantificación específico es necesario utilizar un trazador que tenga las mismas propiedades que el analito, por ello lo más adecuado es que éste tenga el mínimo marcaje posible para evitar o minimizar los posibles efectos isotópicos^{34,35}, que son pequeñas diferencias en el comportamiento del analito y el trazador que pueden tener lugar debido a pequeños cambios en las propiedades fisicoquímicas de ambas³⁶. Lo más importante para hacer una correcta cuantificación es que se produzca una homogeneización completa entre la muestra y el trazador de modo que se cree una mezcla equilibrada del analito y su análogo enriquecido. También es necesario que ese trazador este bien caracterizado, tanto en concentración como en abundancias isotópicas (ya que es casi imposible conseguir un grado de enriquecimiento del 100%).

Existen dos tipos de cuantificación mediante IDMS según sean los analitos de interés sustancias orgánicas o inorgánicas. Las primeras ecuaciones propuestas estaban enfocadas al análisis elemental y se pueden encontrar en el libro titulado “*Electromagnetically enriched isotopes and Mass Spectrometry*”. En éste se describen dos alternativas de cálculo basadas utilización de abundancias isotópicas o de relaciones isotópicas que fueron descritas por R. T. Jamieson y H. Hinterberger respectivamente. El desarrollo de la ecuación que propuso Hinterberger se inicia teniendo en cuenta que los moles de la mezcla (N_m) serán la suma de los moles del elemento de la muestra que se quiere analizar (N_n) y los moles del isotopo trazador (N_t).

$$N_m = N_n + N_t \quad (1)$$

Si se establecen balances de masas de los isotopos a y b.

$$N_m^a = N_n^a + N_t^a \quad N_m^b = N_n^b + N_t^b \quad (2)$$

Si se dividen las dos ecuaciones anteriores se obtienen la relación isotópica de los isotopos (a/b) en la mezcla (R_m), teniendo en cuenta las abundancias de los isotopos a y b en la muestra y en el trazador se consigue la siguiente expresión:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_n^a + N_t^a}{N_n^b + N_t^b} = \frac{N_n \frac{A_n^a}{A_n^b} + N_t \frac{A_t^a}{A_t^b}}{N_n \frac{A_n^b}{A_n^b} + N_t \frac{A_t^b}{A_t^b}} \quad (3)$$

Si se despeja N_n y se define R_n y R_t como la relación de abundancias isotópicas del isotopo b/a y a/b respectivamente para la muestra y el trazador se obtiene

$$N_n = N_t \frac{A_t^b}{A_n^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_n} \right) \quad (4)$$

Si esta ecuación se transforma en función de la concentración teniendo en cuenta las masas de la muestra y trazador (m_n y m_t) y los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador (M_n y M_t) se consigue la ecuación final en la que todos los parámetros son conocidos excepto la relación isotópica, la cual se puede medir mediante Espectrometría de Masas y así determinar la concentración del elemento en la muestra (C_s):

$$C_n = C_t \frac{m_t \cdot M_s \cdot A_t^b}{m_s \cdot M_t \cdot A_n^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_n} \right) \quad (5)$$

Las principales ventajas que proporciona este método respecto a la cuantificación mediante la preparación de un calibrado son que el resultado final no se verá afectado por la sensibilidad del instrumento de medida, ya que en la ecuación no existe ningún parámetro que tenga que ver

con la sensibilidad instrumental, ni por los efectos de matriz, ya que en caso de que existieran afectarían de igual manera al analito y al trazador.

En 1956 Pickup y McPherson³⁷ adaptaron la ecuación utilizada en el análisis elemental para el análisis de moléculas orgánicas,

$$R_m = \frac{\frac{N_n A_n^a + A_t^a}{N_t}}{\frac{N_n A_n^b + A_t^b}{N_t}} \quad (6)$$

Pero en el caso de las moléculas orgánicas los perfiles isotópicos o clúster que se obtienen en la fuente de ionización son por lo general más complejos ya que aparte de la masa monoisotópica del fragmento (M) también incluyen masas M+1, M+2... Esto se debe a la presencia de varios átomos en la molécula y distintos isotopos de cada uno de ellos.

Los elementos que forman parte de la mayoría de las moléculas orgánicas tienen diferentes isotopos con distinto número de neutrones en su núcleo, pero no todos de ellos son estables ni tienen la misma abundancia³⁸. Por ejemplo el carbono tiene tres isotopos, ¹²C es el más abundante (99%), ¹³C es mucho menos abundante (1%) y ¹⁴C, que es un isotopo radiactivo que decae a ¹⁴N, tiene una abundancia tan pequeña que no se suele tener en cuenta. Al igual que el carbono el hidrogeno (¹H, ²H), oxigeno (¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O), nitrógeno (¹⁴N, ¹⁵N), azufre (³²S, ³³S, ³⁴S, ³⁵S) y otros muchos elementos que componen las moléculas orgánicas tienen más de un isotopo. Por ello el cálculo de las abundancias isotópicas de los fragmentos generados en la fuente de ionización resultan mucho más complejos que en el análisis elemental.

Así, la masa molecular exacta de las moléculas orgánicas como la testosterona se consigue teniendo en cuenta las abundancias de cada isotopo y numero de átomos de cada uno. De esta manera la masa exacta de la testosterona es de 289,42. Debido a la presencia de distintos isótopos de cada elemento en la molécula en el espectro de masas se observa más de un pico para la masa de la molécula de la testosterona. El perfil isotópico de la testosterona se muestra en la Fig. 4.

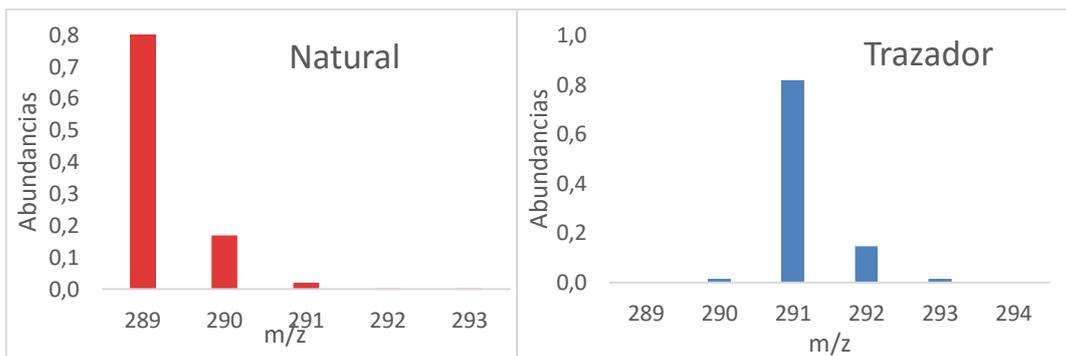


Fig. 4.- Perfil isotópico o clúster de la testosterona.

Al igual que en la testosterona natural, la molécula de testosterona marcada isotópicamente, mediante ^2H o ^{13}C , tendrá su propio clúster isotópico (Fig.4), que presentará el mismo perfil pero se encontrará desplazado en tantas unidades de masa como isotopos marcados contenga la molécula.

Debido a las dificultades que encontraron Pickup y McPherson³⁷ para obtener experimentalmente las abundancias isotópicas del trazador, las ecuaciones de la Dilución Isotópica orgánica fueron modificadas ajustándose a una aproximación empírica basada en la preparación de un calibrado que representa la relación de intensidad de las señales medidas para el analito y el trazador frente a su relación de moles (I_n/I_t vs N_n/N_t)³⁹.

Sin embargo, uno de los problemas que pueden surgir al aplicar esta metodología es la posibilidad de que este calibrado no sea lineal, debido al posible solapamiento espectral de la señal del analito y el trazador como se puede observar en la Fig. 5. La única manera de evitar o minimizar este solapamiento y obtener así un calibrado lineal es mediante la utilización de trazadores marcados isotópicamente en un mayor número de átomos, de modo que la diferencia de masa entre el analito y el trazador sea mayor.

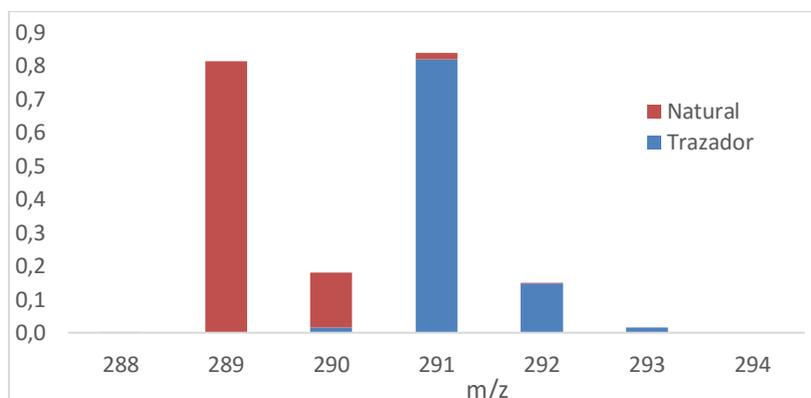


Fig. 5.- Solapamiento espectral del clúster de testosterona natural y $^{13}\text{C}_2$ -Testosterona.

El problema que puede presentar el uso de trazadores con un mayor número de átomos marcados es que pueden dar lugar a efectos isotópicos sobre todo cuando éstos se encuentran marcados en deuterio.⁴⁰ En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos en los que se utilizan trazadores marcados con varios átomos de ^{13}C en lugar de ^2H siempre que estos estén disponibles comercialmente para evitar por un lado el solapamiento espectral e intentar minimizar en la medida de lo posible los efectos isotópicos³⁴⁻³⁶.

3.5.1. IDMS en esteroides y hormonas esteroides marcadas

La determinación de esteroides y hormonas esteroides como la testosterona en fluidos biológicos se emplea en química clínica para diagnosticar patologías relacionadas con desórdenes cardiovasculares o del sistema endocrino como ya se ha mencionado anteriormente. Además los esteroides se pueden utilizar para el dopaje y por ello su determinación en fluidos de atletas tiene también un gran interés. La cuantificación de esta hormona mediante IDMS resulta muy apropiada ya que proporciona gran fiabilidad de los resultados, lo que resulta fundamental tanto para un buen diagnóstico clínico como para una detección adecuada de potenciales casos de dopaje en el deporte.

En análisis clínico de rutina, los métodos más utilizados para la determinación de distintos analitos en muestras de suero u orina se suelen basar en métodos espectroscópicos o inmunoquímicos. Sin embargo, en estos casos es necesario validar el método frente a un método de referencia. Los métodos de referencia para el colesterol, otros esteroides y hormonas esteroides están basados en IDMS. Por ejemplo para la determinación de colesterol en sangre y suero existen dos métodos de referencia, utilizando $^2\text{H}_7$ -colesterol o utilizando $^{13}\text{C}_2$ -colesterol⁴¹. En los dos casos la determinación se lleva a cabo mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas realizando una derivatización previa para convertir al analito en una especie volátil. En algunas aplicaciones se mide el ion molecular mientras que en otros casos para la cuantificación se mide el fragmento correspondiente a la pérdida de agua.⁴¹ Cuando se usa el compuesto deuterado ($^2\text{H}_7$ -colesterol) se evita el solapamiento de masas entre el natural y el enriquecido mientras que si se utiliza el $^{13}\text{C}_2$ -colesterol se solapan en el M+2. Si se quiere realizar un calibrado y utilizar el trazador enriquecido en ^{13}C como patrón interno el solapamiento impide poder distinguir entre la señal del compuesto natural y el marcado isotópicamente. En el método de referencia se utiliza la masa isotópica y la masa M+3 del enriquecido para no encontrar solapamiento y así poder construir una curva de calibrado lineal⁴².

3.5.2. Cuantificación mediante Deconvolución de Perfiles Isotópicos IPD.

Con la intención de solventar las posibles limitaciones que presenta la cuantificación de moléculas orgánicas mediante IDMS se desarrolló un método alternativo que permite llevar a cabo la cuantificación del analito en una muestra utilizando trazadores con marcaje mínimo. Este método se conoce como Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) y permite, a través de una serie de cálculos matemáticos, separar las señales procedentes del analito y del trazador en una mezcla en la que se produzca un solapamiento espectral de ambas señales. Además este método permite la cuantificación directa del analito sin necesidad de construir rectas de calibrado.

El concepto de IPD fue descrito por primera vez en el libro de Lambert et al.³⁶ para calcular el grado de incorporación de isótopos en moléculas y para analizar la pureza de los clúster⁴³ mediante la detección del solapamiento del ion M-H⁺. Más recientemente también se ha utilizado para análisis elemental y especiación de elementos incluyendo estudios metabólicos.

IPD se puede aplicar también a la cuantificación de sustancias orgánicas por Dilución Isotópica al permitir separar las contribuciones de un compuesto natural y su análogo marcado isotópicamente en una mezcla de ambos. Por ejemplo, se ha utilizado para análisis de diferentes compuestos orgánicos tanto en aguas como en fluidos biológicos.⁴⁴⁻⁴⁷

3.5.3. Trazabilidad

IDMS es considerado un método primario ya de análisis ya que los resultados que proporciona son directamente trazables al Sistema Internacional de unidades (SI). El mol es la unidad de SI y está relacionado con las masas de los elementos mediante las masas de los isótopos, los cuales están relacionados con la masa del ¹²C que por definición es 12,00000. Además esta metodología proporciona gran fiabilidad de los resultados con incertidumbres menores, en muchos casos, que las obtenidas mediante otros métodos analíticos de cuantificación.⁴²

Hoy en día todavía no se ha extendido mucho el uso de IDMS en rutina ni en muchos laboratorios de investigación, ya que *a priori* conlleva una inversión inicial importante tanto en equipos como en reactivos (los espectrómetros de masas y trazadores enriquecidos elevan el coste). Sin embargo, la legislación europea (Directiva 98/79/EC) exige que todos los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* utilizados en los hospitales europeos, incluyendo los calibradores empleados en los distintos métodos de análisis, deben ser trazables al SI a través de procedimientos de medida de referencia o materiales de referencia disponibles.

Por ello, los métodos basados en IDMS se están desarrollando cada vez en mayor medida para su aplicación al análisis de parámetros de interés clínico.⁴⁸ Además estas metodologías permiten cuantificar el analito directamente sobre la muestra de una forma sencilla, rápida y fiable, que en el caso de la testosterona puede ser muy interesante en el control rápido y eficaz del dopaje.

OBJETIVOS

En el presente Trabajo de Fin de Máster se pretende cuantificar de manera absoluta los niveles de testosterona en muestras de orina. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método analítico de cuantificación basado en el análisis por Dilución Isotópica con detección por Espectrometría de Masas en Tándem acoplada a Cromatografía Líquida de alta eficacia. Para llevar a cabo la cuantificación se empleará un trazador de testosterona marcado en dos carbonos ($^{13}\text{C}_2$ -testosterona) y el sistema de cálculo IPD.

Este objetivo general se pretende conseguir cumpliendo los siguientes objetivos parciales:

- Estudio del patrón de fragmentación de la testosterona en el sistema HPLC-ESI-MSMS y selección de los fragmentos de medida óptimos para la cuantificación mediante IDMS
- Optimización y selección de las condiciones experimentales de medida para los fragmentos producto seleccionados para la cuantificación.
- Estudio de la pureza del clúster de la testosterona en el equipo HPLC-ESI-MSMS.
- Caracterización del trazador isotópico de testosterona en concentración y abundancia isotópica.
- Evaluación de las características analíticas de la metodología propuesta mediante estudios de recuperación en muestras acuosas y de orina humana.
- Determinación de testosterona en muestras de orina humana.

EXPERIMENTAL

1. Materiales, reactivos y muestras

1.1. Reactivos

Para la preparación de disoluciones patrón de testosterona se utilizó un patrón de testosterona sólida ($\geq 99\%$ para HPLC) de Sigma-Aldrich. El trazador empleado en este trabajo, 3,4- $^{13}\text{C}_2$ -testosterona (99%) de Cambridge Isotope Laboratories, fue proporcionado en solución metanólica por la Universitat Jaume I de Castellón. Las disoluciones de trabajo tanto para el patrón natural como para el trazador se prepararon gravimétricamente y fueron obtenidas por dilución del sólido y la disolución concentrada, respectivamente, en metanol.

Para la preparación de fases móviles se utilizaron agua ultrapura (Millipore Co., Bedford, EEUU), metanol (LC-MS CHROMASOLV $\geq 99,9\%$) de Sigma-Aldrich y como modificadores formiato amónico ($\geq 99,0\%$) de Sigma-Aldrich y ácido fórmico (98% p.a.) de Sigma-Aldrich.

Para la preparación del buffer sólido se utilizaron bicarbonato sódico (99,5% GR para análisis de Merck y carbonato de sodio (99,999% para análisis de trazas) de Sigma-Aldrich. Para el buffer en disolución se utilizaron hidrogenofosfato amónico ($\geq 98\%$) de Sigma-Aldrich y ácido clorhídrico (37% para análisis) de Merck. La enzima utilizada para la incubación de las muestras ha sido β -glucuronidasa *Escherichia coli* K12 de Roche y para la extracción líquido-líquido se ha utilizado metil tert-butil éter (99,9% CHROMASOLV Plus para HPLC) de Sigma-Aldrich.

1.2. Materiales

Para la preparación de las disoluciones se utilizaron micropipetas de volumen ajustable de 2-20 μL , 20-200 μL y de 100-1000 μL (Research plus, Eppendorf) viales de vidrio de 2, 7 y 15 mL (Sigma). Para realizar las medidas en el equipo HPLC-MSMS se han utilizado viales de vidrio con inserto de 300 μL (Agilent Technologies). Para la conservación de muestras de orina se han utilizado viales de vidrio de 7 mL (Sigma) y para el tratamiento de muestra tubos de centrifuga de fondo cónico de 15 mL de VWR.

1.3. Muestras de orina

Las muestras de orina fueron recogidas en un recipiente estéril especial para este tipo de muestras e inmediatamente después se separaron alícuotas de 2,5 mL en viales de vidrio de 7 mL y se conservaron en la oscuridad a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis. Finalmente se

descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se homogeneizaron completamente antes de someterlas a la etapa de preparación de muestra.

2. Instrumentación

2.1. Equipo HPLC-ESI-MS/MS



Las medidas analíticas se han realizado mediante un equipo de Cromatografía Líquida HPLC Agilent modelo 1290, con autoinyector termostatzado con disponibilidad para cuatro fases móviles, desgasificador, y bomba binaria de empuje. La separación de compuestos se ha llevado a cabo empleando una columna HPLC de fase reversa, Agilent Zorbax SB-C18 4.6 mm ID x 250 mm (5 μ m), el sistema se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas, modelo Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), fuente de ionización a presión atmosférica ESI tipo jet-stream (empleado en modo positivo) y detector dinodo de alta energía con electroamplificación.

El sistema jet-stream de la fuente de ionización electrospray permite la introducción de un flujo de gas adicional para focalizar y arrastrar los iones que salen del capilar del electrospray hacia la entrada del espectrómetro de masas. Con este sistema se mejora la transferencia iónica, y gracias al modo ortogonal de colocación de la fuente de ionización y la entrada al espectrómetro de masas se consigue introducir en el primer cuadrupolo únicamente los iones positivos y disminuir la entrada de suciedad en el espectrómetro de masas.

2.2. Otra instrumentación

Todas las disoluciones patrón de trabajo así como las mezclas de muestra y trazador se prepararon gravimétricamente utilizando una balanza analítica modelo MS205DU Mettler Toledo. Para su homogenización completa se ha utilizado un agitador mecánico a vibración Vortex modelo classic (VELP Scientifica). Para la homogenización del buffer sólido se ha utilizado un equipo agitación constante Fisher Bioblock modelo KL2 (Fisher Scientific). En la preparación

de muestra orina se ha utilizado una placa calefactora de control digital modelo RTC Basic (IKA-Werke) para controlar la temperatura de incubación de la muestra con la enzima y una centrifuga Heraeus Multifuge x3 L-R (Thermo Fisher Scientific) para facilitar la separación de las fases acuosa y orgánica y poder recoger el extracto orgánico en el que se encuentra la testosterona tras la separación líquido-líquido.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Estudio del patrón de fragmentación de testosterona mediante HPLC-ESI-MSMS

Para llevar a cabo el estudio del patrón de fragmentación de la testosterona se inyectaron en el equipo HPLC-ESI-MSMS 5 µL de una disolución patrón de 10 ppm de concentración.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la separación son las que se recogen en las tablas 2 y 3, recomendadas por el Laboratorio Antidopaje de Barcelona.

Tabla 2.- Fase móviles empleadas en la cromatografía.

FASE A (500 mL)	FASE B (500 mL)
50 µL ácido fórmico	50 µL ácido fórmico
1000 µL formiato amónico	1000 µL formiato amónico
500 mL agua Milli Q	500 Metanol

Tabla 3.-Condiciones cromatográficas.

Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	55	45
1	55	45
7,5	22,5	77,5
7,51	5	95
8	5	95
8,5	55	45
11,5	55	45

La selección de los fragmentos producto a emplear para la cuantificación de testosterona se llevó a cabo en el modo de trabajo de barrido de iones producto. Para ello se seleccionó como ion precursor en el primer analizador de masas el ion molecular con $m/z = 289$ y en el segundo analizador se llevó a cabo un barrido de m/z entre 90 y 300.

3.2. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización y celda de colisión.

La optimización de las condiciones de la fuente de ionización y de la celda de colisión se realizó mediante la inyección de 5 μL de una disolución de testosterona de aproximadamente 10 ppm preparada a partir del patrón sólido empleando como disolvente una mezcla de las fases móviles A y B en las mismas proporciones en las que se produce la elución de la testosterona. Las medidas se llevaron a cabo mediante el sistema FIA (Flow Injection Analysis). En la Tabla 4 se recogen los distintos parámetros optimizados para maximizar la señal de los iones de interés. Para la optimización de las condiciones de la fuente de ionización se monitorizó la señal del ion precursor con $m/z = 289$ trabajando en modo SIM, mientras que para la optimización de los parámetros de la celda de colisión se monitorizó la señal de los iones producto $m/z = 109$ y 97 en el modo de trabajo de barrido de iones producto.

Tabla 4.- Parámetros y valores utilizados para la optimización de la fuente y celda de colisión.

Parámetro	Valores utilizados
Temperatura sheat gas ($^{\circ}\text{C}$)	200, 250, 300, 350, 390
Flujo sheat gas (L/min)	7, 9, 10, 11, 12
Presión nebulizador (psi)	5, 15, 35, 45, 55, 60.
Voltaje capilar (V)	1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000.
Voltaje Nozzle (V)	0, 300, 500, 1000, 1500, 2000
Temperatura del gas ($^{\circ}\text{C}$)	200, 240, 280, 320, 350
Flujo del gas (L/min)	5, 7, 9, 11
Voltaje del acelerador de la celda (V)	0, 1, 2, 4, 6
Fragmentor	100, 150, 200, 250, 300
Energía de la celda de colisión	5, 10, 15, 17, 19, 20, 23, 25, 27

3.3. Estudio de la pureza del clúster de la testosterona

Para determinar la posible contribución del ion M-1 sobre la señal de la testosterona se llevaron a cabo las medidas en modo SIM (single ion monitoring) seleccionando las relaciones m/z 289, 290, 291 y 292. La contribución del ion M-1 se obtuvo mediante el cálculo de IPD que se describirá con detalle en la sección de procedimientos matemáticos.

3.4. Caracterización del trazador $^{13}\text{C}_2$ -Testosterona

La caracterización del trazador de testosterona en concentración se llevó a cabo mediante IDMS inversa, frente a un patrón natural de testosterona. Para ello se prepararon por tres mezclas del patrón natural de concentración conocida (100 ppb) y del patrón marcado. Las tres mezclas se prepararon por pesada y por triplicado con relaciones aproximadas entre el patrón natural y el marcado de 60:100, 100:100 y 140:100. Se inyectaron 5 μL de estas disoluciones en el sistema instrumental HPLC-ESI-MSMS y se midieron las señales en modo SRM para las transiciones que se recogen en la Tabla 5. Las abundancias experimentales de la mezcla se obtuvieron integrando las áreas para cada transición medida y finalmente se calculó la concentración del trazador en cada mezcla mediante IPD.

Tabla 5.- Transiciones seleccionadas para las medidas en SRM.

Transiciones medidas en el modo SRM	
289 \rightarrow 97	291 \rightarrow 99
289 \rightarrow 109	291 \rightarrow 111
290 \rightarrow 98	292 \rightarrow 99
290 \rightarrow 110	292 \rightarrow 111

Para la caracterización del trazador en términos de abundancia se inyectaron 5 μL de una disolución de unas 100 ppb en el sistema HPLC-ESI-MSMS, y se midieron en modo SIM las m/z correspondientes al ion molecular de la testosterona (288, 289, 290, 291, 292). Las abundancias experimentales del trazador se obtuvieron integrando las áreas para cada relación m/z medida. Llevando estos datos de abundancias al software de cálculo en Excel que se describirá con detalle más adelante (sección 4.1) se obtuvo la abundancia isotópica de ^{13}C en el trazador.

3.5. Cuantificación de muestras acuosas fortificadas

Para la cuantificación de testosterona en muestras acuosas se prepararon disoluciones de testosterona natural en agua ultrapura a distintos niveles de concentración, 1, 10, 25 y 50 ppb. Tras añadir la cantidad necesaria de trazador se midieron en el HPLC-ESI-MSMS en modo SRM las transiciones que se recogen en la Tabla 5 bajo las condiciones instrumentales de trabajo previamente optimizadas. Las abundancias experimentales de la mezcla se obtuvieron integrando las áreas para cada transición medida y mediante IPD se calculó la concentración de testosterona en la muestra. Finalmente los cálculos de recuperación se realizaron teniendo en cuenta la concentración teórica de testosterona en la muestra acuosa fortificada con el patrón natural por pesada.

3.6. Cuantificación de testosterona en muestras de orina humana

Para hacer el tratamiento de muestra a cada alícuota de 2,5 mL de orina se le añadieron 250 μ L de una disolución de 100 ppb de trazador, 1 mL del tampón de fosfato, que se preparó disolviendo 3,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en 25 mL de Milli-Q y ajustando el pH hasta 7 con HCl 37%, y se homogeneizó completamente mediante un agitador mecánico con vibración. A continuación se añadió la enzima β -glucuronidasa *E.coli* y se incubó durante 1 hora a 55 ± 2 °C. Tras dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente, se le añadieron 200 mg del buffer sólido, preparado mezclando 1 g de NaHCO_3 y 2 g Na_2CO_3 hasta su completa homogeneización, y se agitó mecánicamente hasta que todo el sólido quedó completamente disuelto. Después se añadieron 6 mL de metil tert-butil éter como extractante, se mezcló durante un minuto en el sistema de agitación mecánica por vibración y se separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación durante 5 minutos a 3500 rpm. Posteriormente el extracto orgánico se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno y se redisolvió en 300 μ L de MeOH/ H_2O (1:1, v/v). Finalmente se inyectaron 5 μ L del extracto en el equipo de HPLC-ESI-MSMS. Las abundancias experimentales de la mezcla se obtuvieron integrando las áreas para cada transición medida (Tabla 5 de la sección 3.4) y mediante IPD se calculó la concentración de testosterona en la muestra.

3.7. Cuantificación de testosterona en muestras de orina fortificadas

Para llevar a cabo un estudio de recuperaciones en muestra real se fortificaron por pesada varias alícuotas de la muestra de orina humana con cantidades crecientes de testosterona natural. Los niveles de concentración ensayados para los estudios de recuperación fueron de 0, 1, 5, 10 y 25 ppb, preparándose cada una de ellas por triplicado. El procedimiento de preparación de muestra

fue el mismo que se ha descrito previamente en la sección 3.6, pero en este caso la cantidad de trazador añadida ha sido la adecuada para conseguir un nivel de concentración de trazador similar a la concentración de testosterona en cada muestra, 3, 8, 12 y 20 ppb.

Después de realizar las medidas en HPLC-ESI-MSMS se obtuvieron las abundancias experimentales de la mezcla las áreas para cada transición medida (Tabla 5 de la sección 3.4) y mediante IPD se calculó la concentración de testosterona en la muestra. Teniendo en cuenta la cantidad exacta de testosterona que se ha añadido y los cálculos experimentales se calcularon las recuperaciones en muestra real a distintos niveles de concentración.

4. Procedimientos matemáticos y herramientas de cálculo

4.1. Software de cálculo en Excel

Para el cálculo de las abundancias teóricas de cada isotopólogo del perfil isotópico de la testosterona y también para el cálculo del enriquecimiento del trazador se ha utilizado un programa de Visual Basic escrito para Excel, que fue preparado por José Ignacio García Alonso^{43,49} basado en el algoritmo descrito por Kubinyi.⁵⁰ Este archivo de Excel incluye las masas exactas de los elementos, las abundancias de los isótopos estables o enriquecidos y también las incertidumbres de las abundancias de los elementos que publica IUPAC. De esta manera aplica un algoritmo que utiliza la distribución binomial para calcular probabilidad de que aparezca un isótopo. Con esto el programa tiene en cuenta el número de átomos que tiene la molécula para realizar los cálculos necesarios que proporcionan los valores de las abundancias de las 20 primeras masas consecutivas de la molécula o fragmento de interés.

Para calcular el enriquecimiento exacto del trazador es necesario conocer las abundancias del clúster isotópico si este fuera puro y tener en cuenta la contribución del M-1 por ello es necesario calcularlo previamente. El programa calcula las abundancias del M y M-1 del trazador para diferentes enriquecimientos después aplica una regresión lineal múltiple para cada uno de los enriquecimientos y se evalúa la suma cuadrática de los residuales del ajuste. El enriquecimiento que obtenga el valor mínimo de la suma cuadrática de los residuales será el enriquecimiento del trazador.

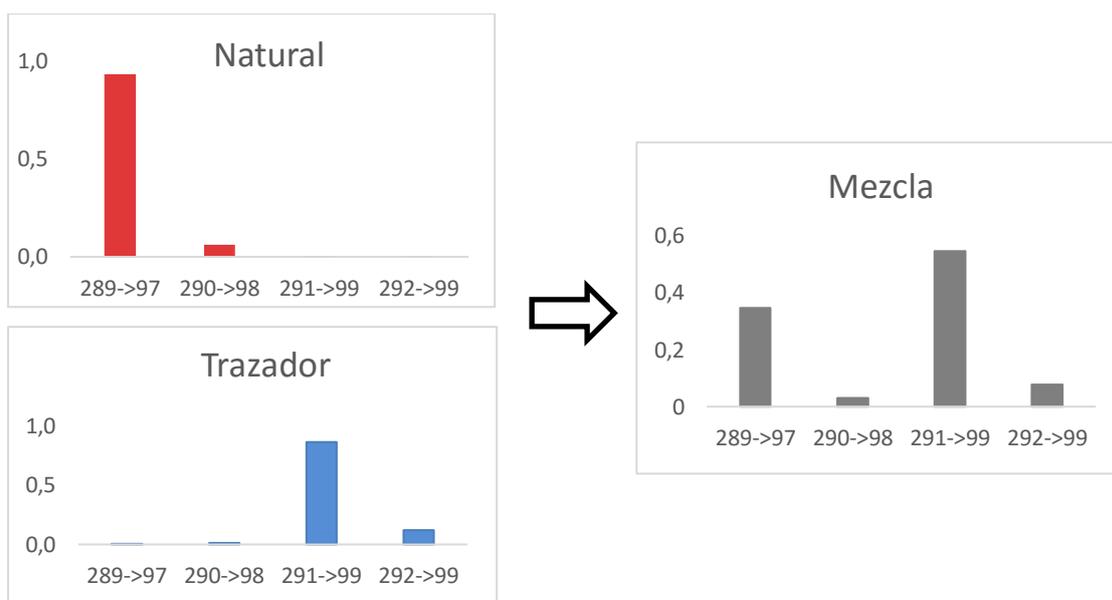
4.2. Programa IsoPatrn ©

Para la cuantificación de testosterona en orina se utiliza el modo de medida SRM (Selected Reaction Monitoring) ya que como se ha mencionado previamente es el modo más sensible y

selectivo, y por lo tanto el más adecuado en matrices reales que pueden tener interferencias. El cálculo de la contribución teórica de cada ion precursor en los iones fragmento que se quieren medir tanto de la testosterona natural y el trazador (teniendo en cuenta el enriquecimiento) se llevó a cabo mediante el programa IsoPatrn© software propuesto por Ramalei et. al.⁵¹

4.3. Deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)

Para el cálculo de las fracciones molares del analito y el trazador en una mezcla de ambos se recurrió a la Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD). Cuando se tiene una muestra sobre la que se ha añadido un trazador y se produce un solapamiento entre ambos, se asume que la composición isotópica obtenida es una combinación lineal de los perfiles isotópicos de ambos. Conociendo el perfil isotópico de la mezcla, que se puede medir experimentalmente, y los perfiles isotópicos teóricos del compuesto natural y su análogo marcado se puede conocer la fracción molar del compuesto marcado y del natural en la mezcla mediante un cálculo de regresión lineal múltiple.³⁶



Si sobre una muestra se añade una cantidad conocida del trazador, los moles totales de la mezcla serán la suma de moles del compuesto marcado añadido y del natural que contenía la muestra.

$$N_m = N_n + N_t \quad (7)$$

Se puede hacer el mismo balance para cada masa nominal de la mezcla. Teniendo en cuenta las abundancias isotópicas, para cada masa i se obtendría

$$N_m \cdot A_m^i = N_n \cdot A_n^i + N_t \cdot A_t^i \quad (8)$$

Teniendo en cuenta que:

$$x_n = \frac{N_n}{N_n + N_m} \quad x_m = \frac{N_m}{N_n + N_m} \quad (9) \text{ y } (10)$$

Si dividimos las dos ecuaciones anteriores

$$A_m^i = x_n \cdot A_n^i + x_t \cdot A_t^i \quad (11)$$

Teniendo en cuenta que x_n y x_t son las fracciones molares de los compuestos natural y marcado, y que en los compuestos orgánicos cada masa nominal tiene diferente composición isotópica, se pueden expresar todas ecuaciones de forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} A_{mezcla}^1 \\ \vdots \\ A_{mezcla}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{natural}^1 & A_{trazador}^1 \\ \vdots & \vdots \\ A_{natural}^n & A_{trazador}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{natural} \\ x_{trazador} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix} \quad (12)$$

De este modo pueden calcularse las fracciones molares del analito y el trazador en la mezcla mediante un ajuste por mínimos cuadrados del vector de error e. Este cálculo se puede llevar a cabo fácilmente mediante la función de “estimación lineal” en Microsoft Excel. Para ello se seleccionan dos columnas de cinco casillas, la función “ESTIMACIONLINEAL” y se coge como y las abundancias de la muestras calculadas experimentalmente y como x las abundancias teóricas del natural y del trazado. De esta manera nos calcula las fracciones molares y sus desviaciones estándar.⁴²

Para poder realizar este cálculo es necesario conocer las abundancias teóricas del compuesto natural y del marcado. Estas abundancias se pueden obtener fácilmente mediante programas de cálculo como los descritos en las secciones 4.1 y 4.2, pero éstos no suelen tener en cuenta el enriquecimiento exacto del trazador ni la contribución de la señal del ion M-1 que se produce en algunos analizadores como el cuadrupolo por falta de resolución del analizador de masas, por ello es necesario determinarlos previamente.⁵² Para el cálculo de la contribución de M-1 también se utiliza la regresión lineal múltiple, aplicando en este caso el sistema matricial mostrado en la ecuación siguiente. Si también se observara experimentalmente una señal para el ion M-2 se podría calcular su contribución igualmente, añadiendo al sistema de ecuaciones las abundancias teóricas de ese ion y una nueva incógnita correspondiente a su fracción molar.⁴³

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^1 \\ \vdots \\ A_{exp}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_M^1 & A_{M-1}^1 \\ \vdots & \vdots \\ A_M^n & A_{M-1}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_M \\ x_{M-1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix} \quad (13)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del patrón de fragmentación de la testosterona en el sistema HPLC-ESI-MSMS.

Para estudiar cómo se fragmenta la testosterona en la fuente de ionización ESI se inyectó un patrón natural en el equipo con las condiciones cromatográficas indicadas en la sección experimental y se llevaron a cabo las medidas mediante modo scan. En la Fig. 5 se observa que el tiempo de retención para un patrón comercial de testosterona natural en las condiciones utilizadas es de 5,4 minutos.

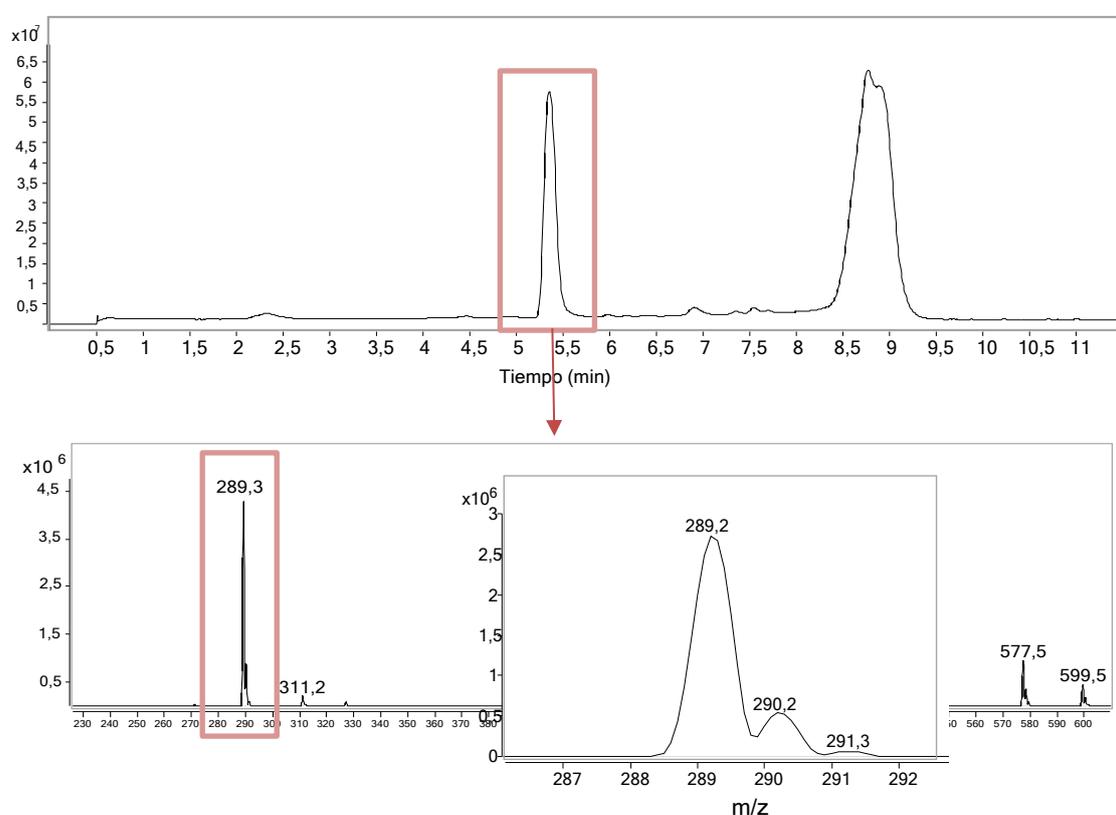


Fig. 5.- Arriba cromatograma de patrón de testosterona realizado en modo scan; abajo su espectro de masas y ampliado el clúster isotópico de la masa de testosterona.

En el espectro de masas se obtiene el pico más intenso de $m/z = 289$ que corresponde al ion molecular de la testosterona protonado en la fuente de ionización ESI. El pico de $m/z = 311$ corresponde al aducto que se forma entre la testosterona y el sodio ($288 + 23$) y los picos que se encuentran a $m/z = 578$ y 600 se considera que pueden ser los dímeros de los dos anteriores. Si se amplía el espectro de masas se puede observar el clúster isotópico del ion molecular de la testosterona que aparte de $m/z = 289$ también tiene masas de 290 y 291 , por la presencia de isótopos más pesados (^{13}C , ^2H ...) que hacen que el perfil de la testosterona presente más de un

isotópico. Puesto que el ion molecular es el que presenta mayor intensidad en el espectro de masas se seleccionó como clúster de medida para todas las medidas realizadas en modo SIM y como ion precursor para las medidas llevadas a cabo en los modos de barrido de iones producto y SRM.

Para seleccionar las transiciones de medida más adecuadas para obtener la mejor sensibilidad posible en la determinación de testosterona se procedió a realizar un barrido de iones producto seleccionando $m/z = 289$ como ion precursor.

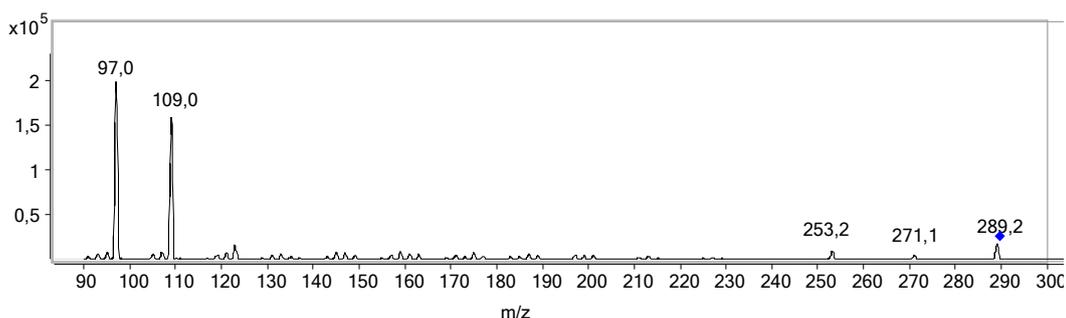


Fig. 6.-Espectro de los iones producto de la fragmentación del ion precursor $m/z=289$.

Como se puede observar en la Fig. 6 los fragmentos más característicos que se obtienen son de $m/z = 271, 253, 109$ y 97 , siendo estos dos últimos los más intensos. De acuerdo con la bibliografía estos fragmentos presentan la estructura que se muestra en la Fig. 7,⁵³ y al ser los más intensos serán los fragmentos producto seleccionados para la cuantificación de testosterona, que se realizara en modo SRM para obtener así una mayor selectividad y mejores límites de detección.

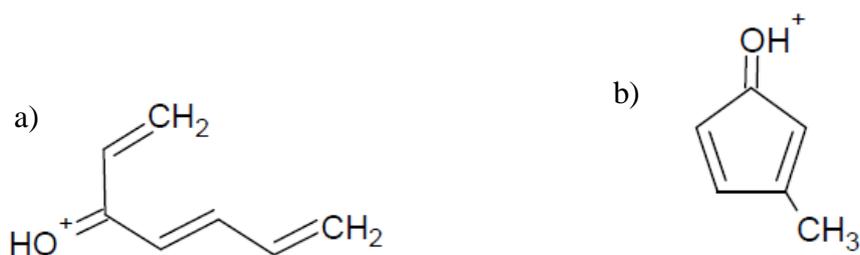


Fig. 7.- Fragmentos de testosterona a) $m/z=109$ y b) $m/z=97$

2. Optimización de los parámetros de la fuente y celda de colisión

Con el fin de conseguir la máxima sensibilidad en la cuantificación de testosterona mediante IDMS se optimizaron los distintos parámetros que afectan a la ionización del analito en la fuente

y transmisión de los iones generados hacia el analizador de masas y a su fragmentación en la celda de colisión. Dependiendo de las características del compuesto que se quiere analizar y el medio en el que se encuentre en el momento de producirse la ionización (fase móvil) el valor óptimo de estos parámetros será diferente.

En la Fig. 8 se puede ver el esquema de una fuente de ionización utilizada en este trabajo en el que señalan los parámetros a optimizar y a que parte de la fuente afecta cada uno de ellos. La **presión de nebulizador** será la presión del gas que se utiliza para evaporar la muestra y mediante el **gas de secado** se desolvatará el analito, gracias al **voltaje de capilar** entrará dentro de este y por el **voltaje del fragmentor** recorrerá el capilar hasta el final para entrar en el espectrómetro de masas.

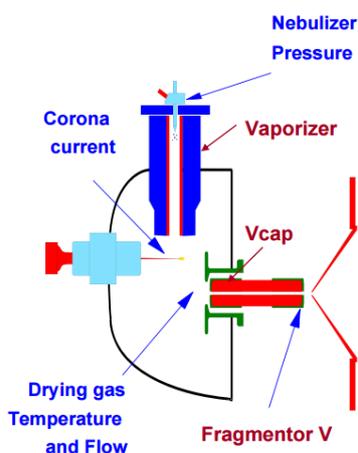


Fig. 8.- Esquema de una fuente de ionización electrospray con los distintos parámetros señalados⁵⁴.

El sistema jet-stream es un nuevo sistema que como se ha mencionado anteriormente ayuda a focalizar los iones mediante un gas adicional y permite que sólo entren los iones positivos en el espectrómetro de masa por un voltaje adicional aplicado. Los parámetros adicionales que se incorporan con este sistema son el **flujo y la temperatura del sheath gas** y el **Nozzle voltage** como se puede apreciar en la Fig. 9.

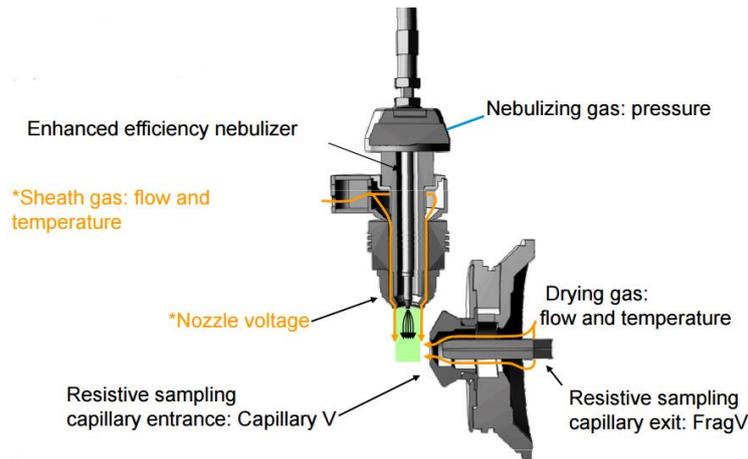


Fig. 9.- Esquema de un sistema jetstream con sus parámetros señalados⁵⁴.

Los parámetros de la fuente de ionización se optimizaron en modo de medida SIM, buscando maximizar la señal para el ion molecular, que es a su vez el ion precursor seleccionado para llevar a cabo las medidas en SRM que se utilizarán para la cuantificación.

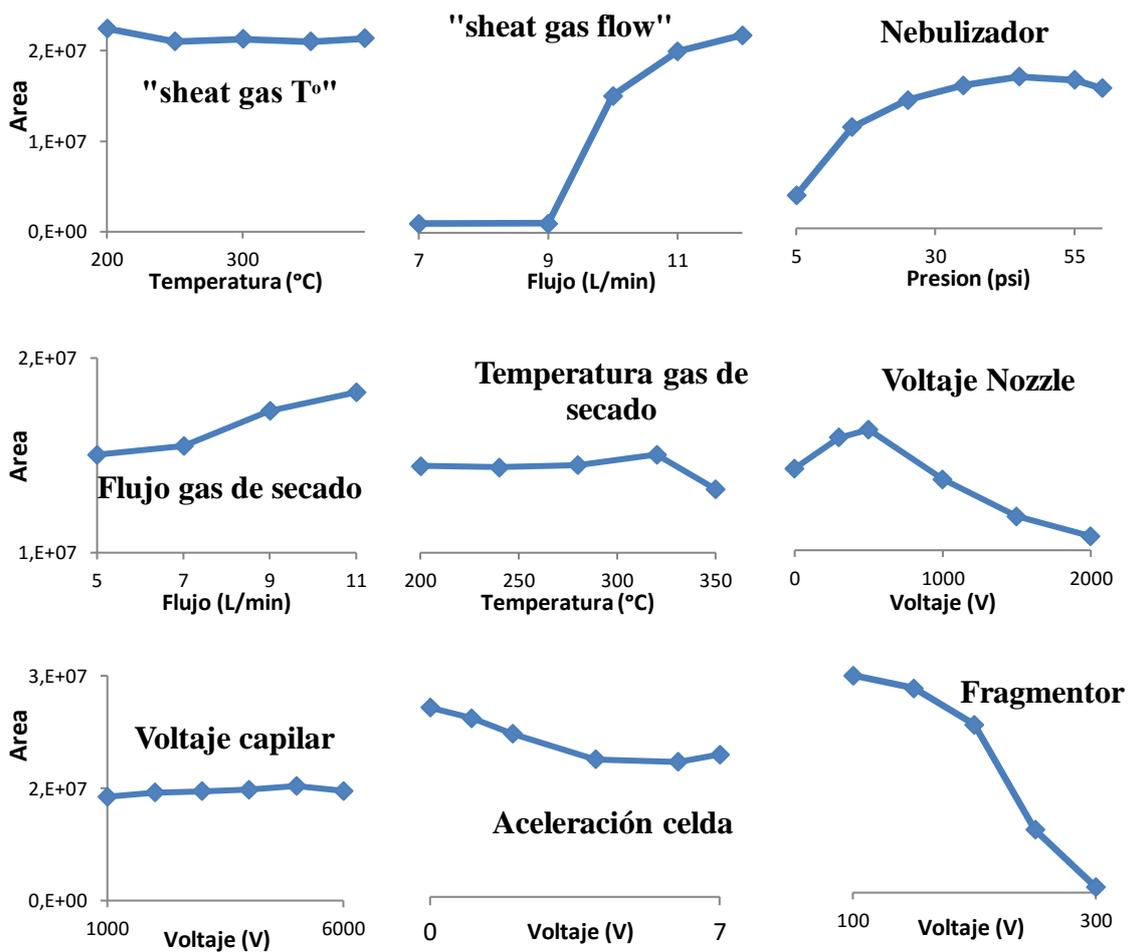


Fig. 10.- Representación de cómo afecta cada parámetro de la fuente en el área de la masa 289.

Como se puede ver los parámetros que más afectan son el “sheat gas flow” y la presión del nebulizador. Como valores óptimos se escogen los valores máximos que se obtienen al integrar el área de $m/z = 289$ de esta manera se obtendrá la mayor sensibilidad en nuestras medidas. Los valores seleccionados aparecen recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6.- Valores óptimos de cada parámetro de la fuente y celda de colisión para el análisis de testosterona.

Parámetro	Valor óptimo escogido
Temperatura sheat gas	200 °C
Flujo sheat gas	12 L/min
Presión nebulizador	45 psi
Voltaje capilar	5000 V
Voltaje Nozzle	500 V
Temperatura del gas	320 °C
Flujo del gas	11 L/min
Voltaje del acelerador de la celda	1 V
Fragmentor	100

El voltaje de **aceleración de la celda** es un parámetro de la celda de colisión. Este se aplica para limpiar la celda de colisión entre transición y transición. Cuanto más voltaje se aplica más se limpia pero también se pierde sensibilidad, en la optimización se logra un compromiso entre sensibilidad y limpieza.

La **energía de colisión** de la celda afecta en la intensidad de los fragmentos producto. Este parámetro se optimizó en el modo de medida barrido de iones producto, buscando maximizar la señal de los fragmentos producto de $m/z = 97$ y 109 seleccionados para llevar a cabo la cuantificación. En la Fig. 11 se puede apreciar que a mayor energía de colisión la molécula se fragmenta cada vez más, la intensidad de los picos de los fragmentos 97 y 109 va aumentando. Pero también es interesante mantener un mínimo pico del ion precursor para poder confirmar la existencia del analito de interés y que los fragmentos producto realmente provienen de este ion precursor. Por ello la energía de colisión óptima seleccionada ha sido de 20 eV.

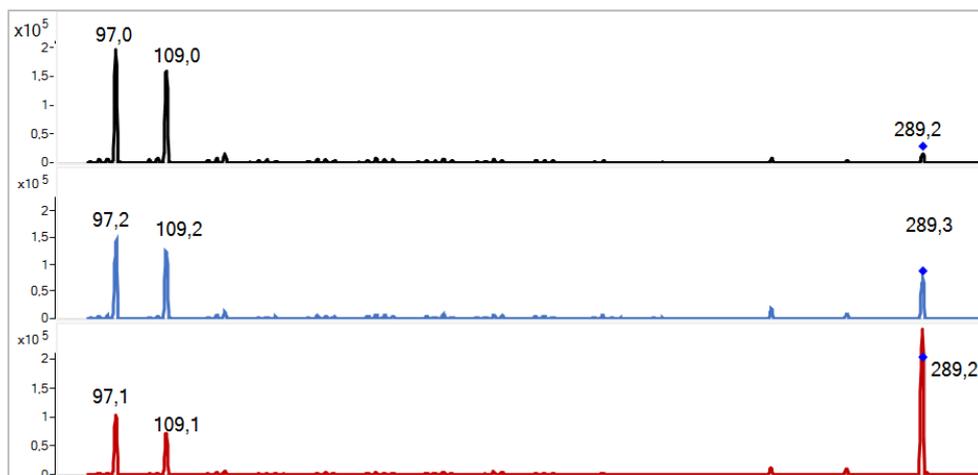


Fig. 11.- Cambio de las intensidades de los picos de los fragmentos de interés dependiendo de la energía de colisión, 10 (rojo), 15 (azul) y 20 (negro) eV.

3. Estudio de la pureza del clúster de la testosterona

Las medidas experimentales de abundancias isotópicas pueden estar afectadas por la baja resolución de los analizadores de masa tipo cuadrupolo⁴³, que se ve reflejada en el grado de pureza de los clúster medidos. A nivel experimental este efecto se puede observar por la aparición de una pequeña señal detectada una unidad de masa por debajo de la correspondiente al ion monoisotópico del analito (M-1), que dará lugar a una pequeña desviación entre las abundancias isotópicas calculadas teóricamente y las medidas experimentalmente. Por tanto, es necesario evaluar la pureza experimental del clúster y corregirla para asegurar la fiabilidad de los resultados analíticos. Para ello se midieron las abundancias experimentales de cada isotopólogo de la testosterona en modo SIM para un patrón natural. Los resultados obtenidos para el rango de m/z que va de 288 a 292 se recogen en la Fig. 12. La masa monoisotópica de la testosterona es de 288, pero en la fuente de ionización ESI se crea un ion protonado, por ello la señal más intensa se observa para $m/z = 289$. Las masas más grandes corresponden a isotopólogos con uno más isótopos pesados y la señal observada a $m/z = 288$ se debe a la contribución M-1.

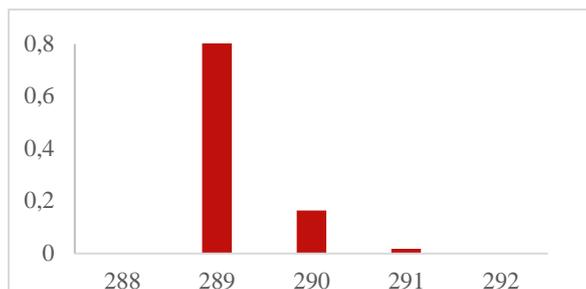


Fig. 12.- Abundancias experimentales del clúster de la testosterona medido en modo SIM.

Como se ha visto en la Fig. 12 que representa las abundancias del clúster experimental de la testosterona hay una pequeña contribución del M-1. Teniendo en cuenta las abundancias teóricas del M y del M-1 se calcula esa contribución mediante cálculos de IPD, que resultó ser de 0,29 %. La contribución de M-2 no fue necesario calcularla ya que no se ha visto señal para $m/z = 287$, pero si existiera también sería necesario evaluarla y corregirla de la misma manera.

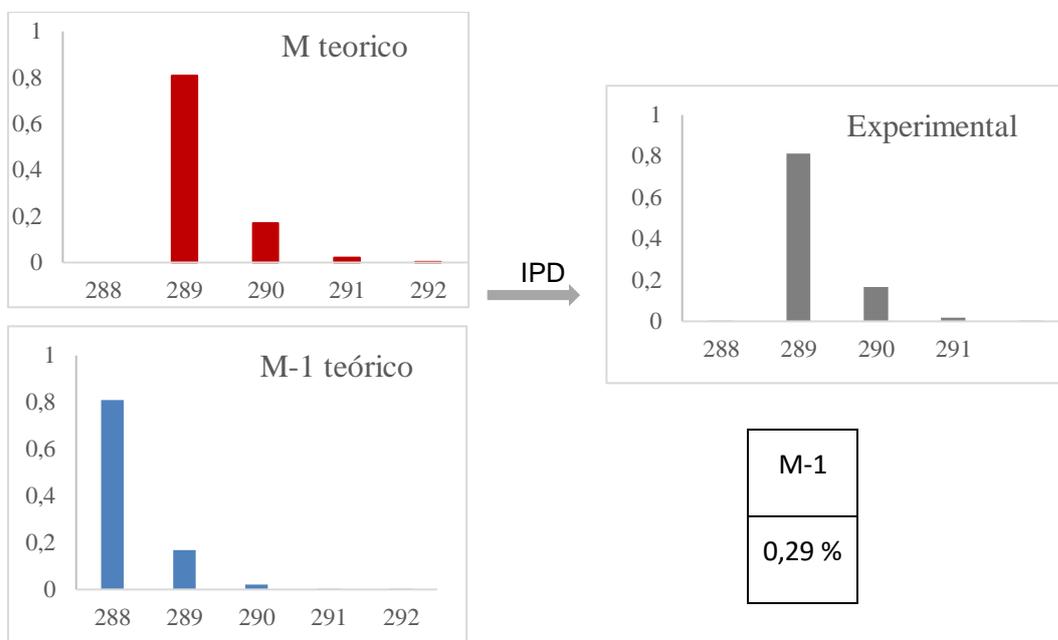


Fig. 13.- Calculo de la contribución del M-1 mediante IPD.

4. Caracterización del trazador $^{13}\text{C}_2$ -testosterona

Para asegurar la calidad de los resultados analíticos en IDMS es necesario disponer de un trazador perfectamente caracterizado tanto en concentración como en su enriquecimiento. El enriquecimiento del trazador debe ser conocido para poder calcular sus abundancias isotópicas teóricas, que serán necesarias para obtener las fracciones molares del analito y el trazador en una mezcla de ambos mediante cálculos de IPD. La concentración del trazador es necesaria para

saber la cantidad de moles añadidos sobre la muestra y para poder calcular así los moles de analito que contiene.

4.1. Cálculo del enriquecimiento isotópico del trazador

Para conocer el enriquecimiento del trazador se midió una disolución patrón del mismo en modo SIM, obteniéndose así las abundancias experimentales del trazador. Teniendo en cuenta la contribución del M-1 obtenida para el patrón natural de testosterona se calculó el enriquecimiento del trazador mediante el software de cálculo en Excel descrito en la sección 4.1. Puesto que se espera un enriquecimiento del trazador de 98-100%, los cálculos realizados mediante el software se limitaron a este rango de valores. En la Fig. 14 se puede observar los resultados obtenidos al minimizar la suma cuadrática de los residuales del ajuste para los distintos enriquecimientos evaluados, y como se puede observar se obtuvo un valor mínimo para un enriquecimiento de 99,22%. Como se puede observar en esta figura los valores de abundancias obtenidos experimentalmente se ajustan correctamente con los valores calculados teóricamente para el enriquecimiento asignado al trazador.

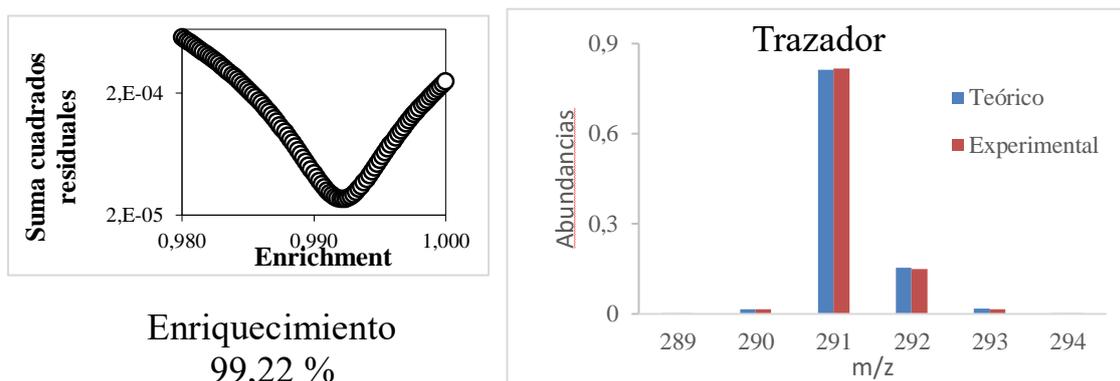


Fig. 14.- Determinación del enriquecimiento del trazador mediante los residuales de las medidas que calcula software en Excel.

4.2. Cálculo de la concentración.

El cálculo de la concentración del trazador en la disolución patrón se llevó a cabo mediante IDMS inversa. Esta estrategia consiste en mezclar el trazador con un patrón natural de testosterona de concentración conocida. Mediante cálculos de IPD se pueden obtener las fracciones molares del patrón natural en esa mezcla y conocida la concentración del patrón natural se puede obtener la del trazador. Las medidas experimentales se llevaron a cabo en el modo de trabajo SRM, por lo que inicialmente fue necesario seleccionar las transiciones de medida. En este trabajo se han seleccionado dos clústers, los más intensos correspondientes a los fragmentos de

m/z= 97 y 109, para la cuantificación, y para cada uno se seleccionaron cuatro transiciones. Mediante el programa IsoPatrn© se pueden calcular abundancias teóricas para cada transición, tanto del natural como del marcado, teniendo en cuenta el enriquecimiento del último.

Tabla 7.- Abundancias teóricas de cada transición del primer clúster de la testosterona natural y del trazador.

Natural	289	290	291	292	293
97	0,808482	0,115844	0,009346	0,000550	0,000024
98		0,053611	0,007682	0,000620	0,000036
99			0,003155	0,000452	0,000036
100				0,000132	0,000019
101					0,000003
Trazador	289	290	291	292	293
97	0,000050	0,000007	0,000001	0,000000	0,000000
98		0,012788	0,001832	0,000148	0,000009
99			0,813801	0,116606	0,009407
100				0,036370	0,005211
101					0,002294

Tabla 8.- Abundancias teóricas de cada transición del segundo clúster de la testosterona natural y del trazador.

Natural	289	290	291	292	293
109	0,808482	0,107100	0,008188	0,000462	0,000013
110		0,062355	0,008260	0,000631	0,000017
111			0,003735	0,000495	0,000021
112				0,000166	0,000017
113					0,000004
Trazador	289	290	291	292	293
109	0,000050	0,000007	0,000001	0,000000	0,000000
110		0,012789	0,001694	0,000130	0,000007
111			0,813939	0,107822	0,008243
112				0,045172	0,005984
113					0,002687

Las transiciones en color de las tablas 7 (289-> 97, 290->98, 291->99 y 292->99 para el primer clúster) y 8 (289-> 109, 290->110, 291->111 y 292->111 para el segundo clúster) fueron las seleccionadas para realizar las medidas de SRM, teniendo en cuenta que fueran transiciones con abundancias lo más altas posibles para el analito y/o para el trazador para tener así una mayor sensibilidad en las medidas y una mejor precisión de los resultados analíticos.

Para comprobar que a pesar de estar midiendo sólo una parte de todas as transiciones que en realidad ocurren, las abundancias experimentales obtenidas fueron las correctas se compararon los resultados obtenidos experimentalmente con las abundancias teóricas proporcionadas por el software Isopatrⁿ. Para ello se midieron experimentalmente las transiciones seleccionadas en una disolución de patrón natural y trazador por separado y se comprobó que las abundancias obtenidas experimentalmente se ajustaban perfectamente a las teóricas como se puede ver en la Fig. 15. Las desviaciones que se observan entre ambos perfiles no son significativas, por lo que se pudo confirmar que las transiciones seleccionadas pueden medirse correctamente, y son entonces las que se utilizarán de aquí en adelante para la cuantificación de testosterona en el modo de medida SRM.

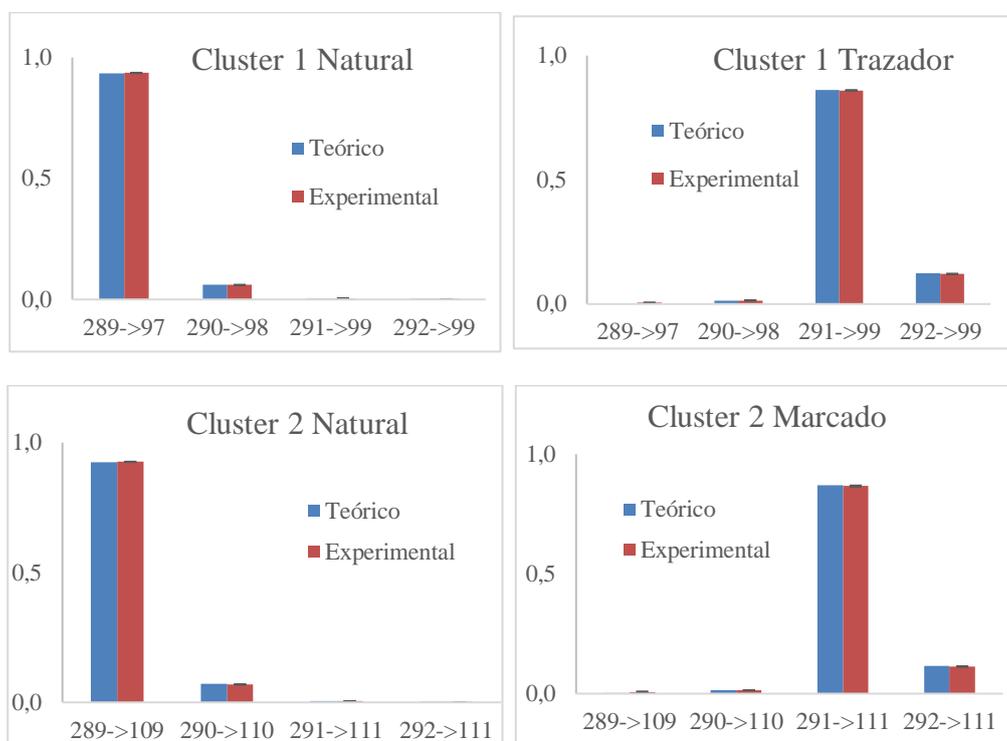


Fig. 15.- Comparación de las abundancias teóricas y experimentales de las transiciones seleccionadas de los dos clúster, tanto en el natural como en el marcado.

Para determinar la concentración del trazador se prepararon por triplicado tres mezclas con un patrón natural de testosterona. Estas mezclas se midieron en modo SRM para las transiciones seleccionadas previamente. Mediante el cálculo de IPD y IDMS inversa se calculó la concentración del trazador a través los dos clúster de trabajo propuestos, proporcionando los resultados que se recogen en la Tabla 9. En la tabla se recogen los valores promedio de las tres replicas preparadas para mezcla ensayada y para los dos clústers propuestos. La concentración final se obtuvo promediando las concentraciones de los dos clúster para las tres mezclas estudiadas obteniéndose un valor de 17,70 ppm con una desviación estándar de 0,22 para la

disolución madre del trazador. Además se comprobó que la concentración obtenida mediante el modo SRM está de acuerdo con la obtenida en modo SIM, que se coge como referencia ya que en este caso se mide todo el clúster de la testosterona por lo que es improbable que se produzcan errores en los resultados al estar trabajando con patrones que no deberían estar afectados por la presencia de interferentes.

Tabla 9.-Cálculo de la concentración del trazador. El promedio y la desviación estándar a cada nivel está calculada mediante las tres disoluciones preparadas.

	Clúster 1 (m/z=97)		Clúster 2 (m/z=109)		SIM	
Mezclas	Promedio (ppm)	SD	Promedio (ppm)	SD	Promedio (ppm)	SD
60:100	17,73	0,01	18,05	0,05	17,48	0,29
100:100	17,54	0,11	17,82	0,07	17,21	0,06
140:100	17,37	0,05	17,68	0,04	17,07	0,06
Promedio	17,55		17,85		17,25	
SD	0,18		0,19		0,21	
Concentración trazador 17,70 ± 0,22 ppm						

5. Cuantificación de testosterona en muestras acuosas fortificadas

Con el objetivo de hacer un estudio de recuperaciones se prepararon por triplicado muestras acuosas fortificadas con testosterona natural a distintos niveles de concentración. Sobre estas muestras se añadió la cantidad adecuada de trazador y fueron cuantificadas mediante el método de IDMS propuesto en este trabajo. En las Tablas 10 y 11 se recogen las recuperaciones obtenidas para concentraciones de patrón natural de 1, 10 25 y 50 ppb calculadas a partir de los dos clúster de trabajo seleccionados. Como se puede observar en el caso del clúster 1 se consiguieron recuperaciones de alrededor de 96% y en el clúster 2 alrededor de 99% con desviaciones estándar relativas calculadas para tres medidas individuales de cada disolución inferiores a 5% para todas las muestras y todos los niveles de concentración. A nivel de 1 ppb las recuperaciones obtenidas son mucho mayores, y con una desviación estándar notablemente mayor, pero esto es lógico ya que al estar a niveles de concentración tan bajos la sensibilidad es menor y por lo tanto la exactitud así como la reproducibilidad en la medida e integración de los picos cromatógrafos disminuye.

Tabla 10.- Recuperaciones obtenidas mediante cálculos de IPD en el primer clúster en muestras acuosas fortificadas a distintos niveles de concentración. La desviación estándar corresponde a tres inyecciones independientes.

Muestra	Concentración (ppb)	Clúster 1				
		Concentración experimental	SD	Recuperación (%)	SD	RSD (%)
1.1	0,77	0,889	0,003	115,5	0,4	0,3
1.2	0,78	0,80	0,02	102	3	2,9
1.3	0,78	0,82	0,02	104	3	2,5
10.1	8,03	7,75	0,04	96,5	0,5	0,5
10.2	7,73	7,50	0,06	97,0	0,7	0,8
10.3	7,89	7,55	0,04	95,7	0,4	0,5
25.1	20,61	19,96	0,07	96,8	0,4	0,4
25.2	20,41	19,7	0,1	96,7	0,7	0,7
25.3	20,38	19,71	0,05	96,7	0,3	0,3
50.1	39,77	38,38	0,04	96,5	0,1	0,1
50.2	40,03	38,5	0,3	96,2	0,8	0,9
50.3	40,63	39,1	0,2	96,2	0,5	0,6

Tabla 11.- Recuperaciones obtenidas mediante cálculos de IPD en el segundo clúster en muestras acuosas fortificadas a distintos niveles de concentración. La desviación estándar corresponde a tres inyecciones independientes.

Muestra	Concentración (ppb)	Clúster 2				
		Concentración experimental	SD	Recuperación (%)	SD	RSD (%)
1.1	0,77	0,93	0,05	121	6	5
1.2	0,78	0,80	0,02	102	3	3
1.3	0,78	0,84	0,03	107	4	4
10.1	8,03	8,03	0,04	100,0	0,5	0,5
10.2	7,73	7,64	0,02	98,8	0,3	0,3
10.3	7,89	7,80	0,04	98,9	0,5	0,5
25.1	20,61	20,5	0,1	99,3	0,6	0,6
25.2	20,41	20,2	0,1	98,9	0,7	0,7
25.3	20,38	20,2	0,1	99,2	0,7	0,7
50.1	39,77	39,31	0,07	98,8	0,2	0,2
50.2	40,03	39,5	0,2	98,8	0,4	0,4
50.3	40,63	40,2	0,1	99,0	0,3	0,3

El uso de dos clúster diferentes en la cuantificación se lleva a cabo para detectar posibles interferentes en muestras reales. La probabilidad de que un interferente afectara por igual a la señal de los dos clústers de trabajo es muy baja. Si el interferente afectara sólo a uno de los clústers se obtendrían recuperaciones diferentes para cada uno de ellos. En el caso de muestras acuosas no debería de estar presente ningún compuesto que interfiera con la testosterona y por ello las recuperaciones obtenidas se encuentran en el mismo rango de valores al llevar a cabo la cuantificación a través de los dos clústers de trabajo.

Con el fin de conocer los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) del método de cuantificación se han medido tres disoluciones de blanco acuosas con tres inyecciones independientes en cada una. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12.-Valores de testosterona en blancos de agua. Cálculo del LOD 3 veces la desviación estándar de las tres disoluciones y LOQ 10 veces la desviación estándar.

	Valores blanco (ppb)
	0,064
	0,036
	0,037
Promedio	0,045
SD	0,016
LOD (3SD)	0,048
LOQ (10SD)	0,160

6. Cuantificación de testosterona en muestras de orina

El análisis de muestras de orina requiere un tratamiento de la muestra que consta de distintas etapas. En primer lugar es necesario incubar la muestra 1 hora a 55°C en presencia de la enzima β -glucuronidasa E.coli. Esta etapa es necesaria para el análisis de testosterona así como otros esteroides en orina, ya que estas sustancias reaccionan para su excreción con el ácido glucurónico⁵⁵ para mejorar su solubilidad en agua pudiendo así ser eliminadas más fácilmente a través de la orina. La enzima β -glucuronidasa E.coli sirve romper el enlace entre la testosterona y el ácido glucurónico y así tener la testosterona libre para poder determinarla.^{56,57} La segunda etapa del procedimiento de preparación de la muestra consiste en una extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico (MTBE) para poder así llevarlo a sequedad fácilmente y reconstruirlo en el disolvente que sea adecuado para la medida en HPLC-ESI-MSMS. Las medidas se llevaron a cabo en el modo SRM para las transiciones seleccionadas para cada uno de los dos clústers de trabajo propuestos.

Se analizaron muestras de orina de un mismo individuo pero recogidas en dos días diferentes. En el lote de muestras recogidas en el primer día se obtuvieron cromatogramas en los que el pico cromatográfico de la testosterona no estaba afectado por ningún tipo de interferente como se puede ver en el cromatograma negro de la Fig. 16. Sin embargo para el segundo lote de muestras se observó una interferencia en forma de un pequeño hombro como se puede ver en el cromatograma azul de la Fig. 16. Al extraer los cromatogramas de las transiciones mayoritarias del compuesto natural (289->97 y 289->109) se observa que para el segundo lote de muestras aparece un interferente que no permite la resolución a línea base. Se ve claramente en los cromatogramas pequeños de la derecha de la Fig. 16, el rojo y el negro pertenecen a las

transiciones 289->109 y 289->97 del lote de orina del primer día, y el rosa y el naranja son del segundo lote de orina de las mismas transiciones, 289->109 y 289->97 respectivamente.

Debido a esta interferencia no fue posible llevar a cabo la correcta cuantificación de testosterona en esta muestra de orina, por lo que se decidió modificar las condiciones cromatograficas con el fin de separar nuestro analito del interferente encontrado en esta muestra real de orina.

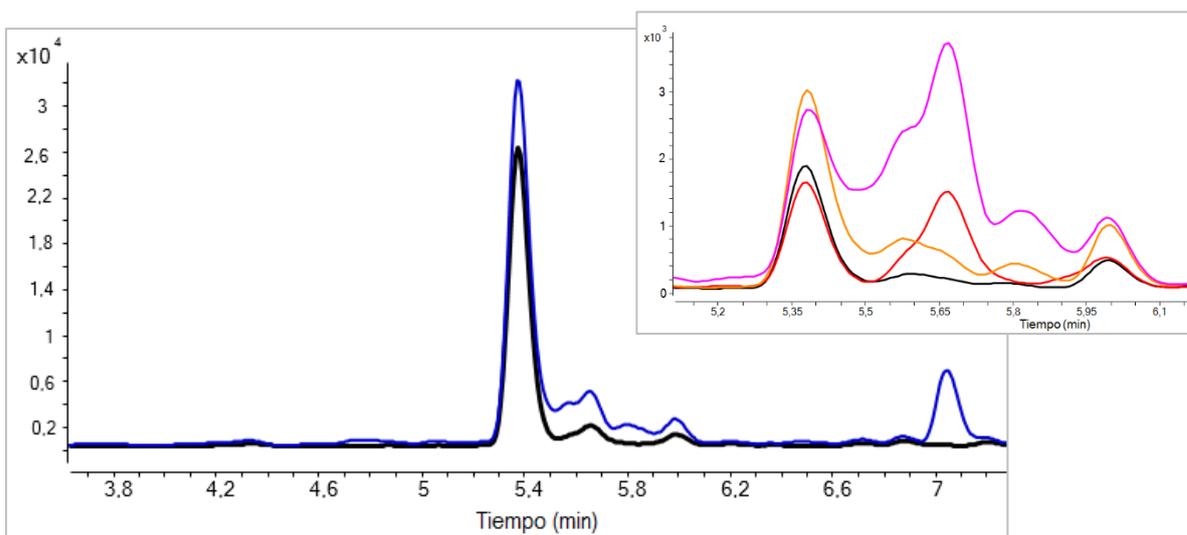


Fig. 16.- Cromatograma de dos muestras de orina distintas, negro primer lote, azul segundo lote. Los cromatogramas pequeños de la derecha son las transiciones mayoritarias de la testosterona natural extraídas. Negro y rojo transiciones 289->97 y 289->109 del primer lote, y naranja y rosa transiciones 289->97 y 289->109 del segundo lote.

Para optimizar las condiciones cromatográficas, inicialmente se planteó reducir la proporción inicial de la fase móvil B, fase orgánica, con la intención de retener más la testosterona y poder separarla de la interferencia. El primer gradiente que se probó, Fig. 17 gradiente A, tenía una rampa demasiado grande para separar los picos, como se puede ver en el cromatograma rojo de la Fig. 18. Por ello, se fue disminuyendo la pendiente de la rampa con el fin de conseguir la separación, Fig. 17 gradientes B y C. Mediante el gradiente B no se consigue separar el interferente, cromatograma gris de la Fig. 18. En el caso del gradiente C, se emplea más tiempo en subir el porcentaje de fase móvil y se sube hasta 70% de fase B ya que se ha calculado que la testosterona sale aproximadamente a 68% fase B. De esta manera se consigue una buena separación, cromatograma azul de la Fig. 19. Por último se emplea el gradiente D, disminuyendo el porcentaje inicial de fase B y así poder emplear dos minutos menos para la subida hasta 70% sin aumentar la pendiente. Se puede decir que la disminución del porcentaje inicial de fase B no ha afectado a correcta separación y ha sido necesario emplear un gradiente más bajo para separar la testosterona del interferente.

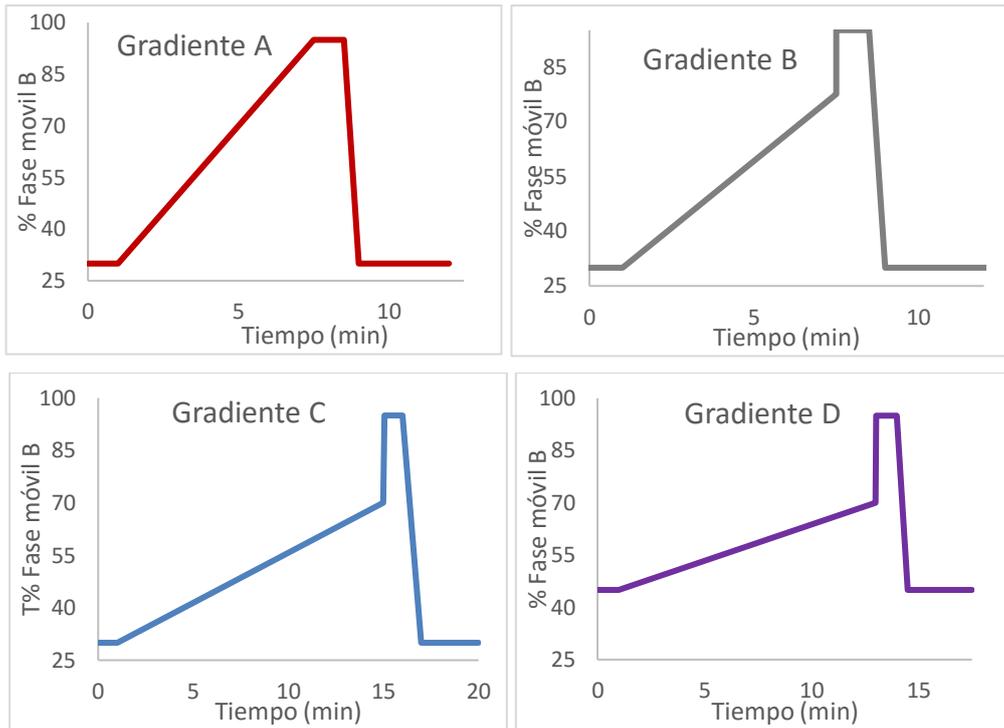


Fig.17.- Gradientes utilizados para la optimización de la cromatografía.

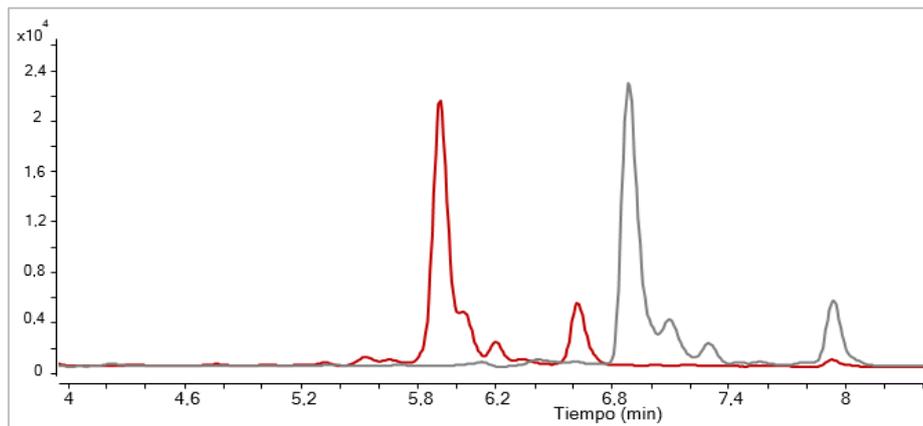


Fig. 18.- Cromatogramas obtenidos con gradiente A (rojo), gradiente B (gris).

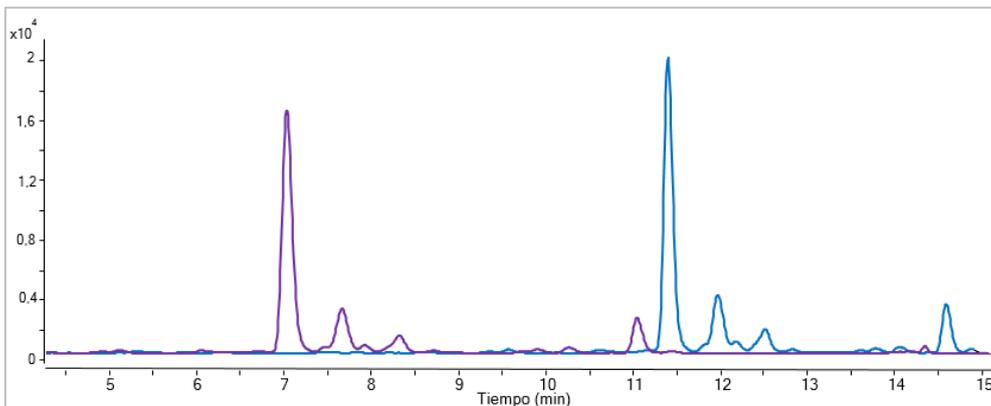


Fig. 19.- Cromatogramas obtenidos con los gradientes C (azul) y D (morado).

Por lo tanto se ha conseguido separar correctamente el analito de interés en la muestra real, pudiendo realizar integraciones adecuadas de los picos de las transiciones medidas para llevar a cabo la cuantificación de testosterona en los dos lotes de orina. En la Tabla 13 se recogen las concentraciones aproximadas para conocer en qué nivel de testosterona se encuentra la orina empleada. No es una cuantificación exacta ya que no se han realizado réplicas de muestras ni medidas, pero ha servido para diseñar un experimento para fortificar la orina y conocer recuperaciones.

Tabla 13.- Concentraciones aproximadas de muestras de orina del lote 1 y 2.

	Orina 1	Orina 2
Concentración (ppb)	1,81	2,66
SD	0,02	0,13

Finalmente, tres réplicas del lote de orina 2 se prepararon y midieron por triplicado, obteniendo los resultados de la Tabla 14.

Tabla 14.- Concentraciones obtenidas mediante cálculos de IPD en muestras de orina humana sin fortificar. La desviación estándar corresponde a tres inyecciones independientes.

Muestra	Clúster 1			Clúster 2		
	Concentración (ppb)	SD	RSD (%)	Concentración (ppb)	SD	RSD
0.1	2,50	0,01	0,56	2,33	0,04	1,6
0.2	2,49	0,03	1,3	2,30	0,03	1,1
0.3	2,49	0,04	1,5	2,28	0,03	1,3

7. Cuantificación de testosterona en muestras de orina fortificadas

Por último se llevaron a cabo estudios de recuperación sobre muestras reales. Para ello se fortificaron muestras de orina del lote 2 a distintos niveles de concentración de testosterona natural y se cuantificaron mediante la metodología propuesta. En la Tablas 15 y 16 se recogen las recuperaciones obtenidas para los distintos niveles de concentración ensayados a través de los dos clústers propuestos para la cuantificación de testosterona. Como se puede observar en el clúster 1 las recuperaciones están entre 94-117 % y en el segundo clúster en el caso de todas las disoluciones es ligeramente más baja, 84-113 %, con RSDs inferiores a 8 y 3 % respectivamente.

Tabla 15.- Recuperaciones obtenidas mediante cálculos de IPD en el primer clúster en muestras de orina humana fortificadas a distintos niveles de concentración. La desviación estándar corresponde a tres inyecciones independientes.

Muestra	Concentración añadido (ppb)	Clúster 1				
		Concentración experimental	SD	Recuperación (%)	SD	RSD (%)
1.1	0,88	0,83	0,01	94	1	1
1.2	0,87	0,94	0,07	108	8	7
1.3	0,88	1,04	0,08	117	9	8
5.1	4,47	4,26	0,05	95	1	1
5.2	4,62	4,43	0,02	96,0	0,4	0,5
5.3	4,62	4,91	0,05	106	1	1
10.1	8,62	8,23	0,01	95,5	0,1	0,1
10.2	8,75	8,45	0,04	96,6	0,4	0,4
10.3	8,83	8,58	0,06	97,2	0,7	0,7
25.1	19,14	20,00	0,02	104,5	0,1	0,1
25.2	19,08	20,05	0,09	105,1	0,5	0,4
25.3	19,23	20,06	0,03	104,3	0,2	0,1

Tabla 16.- Recuperaciones obtenidas mediante cálculos de IPD en el segundo clúster en muestras de orina humana fortificadas a distintos niveles de concentración. La desviación estándar corresponde a tres inyecciones independientes.

Muestra	Concentración añadido (ppb)	Clúster 2				
		Concentración experimental	SD	Recuperación (%)	SD	RSD (%)
1.1	0,88	0,75	0,01	84	1	2
1.2	0,87	0,88	0,03	100	3	3
1.3	0,88	1,00	0,01	113	1	1
5.1	4,47	4,00	0,06	89	1	2
5.2	4,62	4,18	0,04	90,5	0,9	1
5.3	4,62	4,52	0,07	97	2	2
10.1	8,62	7,68	0,05	89,2	0,6	0,7
10.2	8,75	7,86	0,04	89,8	0,5	0,5
10.3	8,83	8,02	0,06	90,8	0,7	0,8
25.1	19,14	18,8	0,1	98,3	0,6	0,6
25.2	19,08	18,7	0,1	98,1	0,6	0,6
25.3	19,23	18,77	0,04	97,6	0,2	0,2

Si se observan los picos cromatográficos extraídos para las transiciones mayoritarias de los dos clúster en la Fig. 20, podemos ver que la transición 289->109 que corresponde al cromatograma azul tiene una pequeña interferencia anterior al pico que no permite recuperar totalmente la línea de base antes de comenzar a salir el pico de la testosterona, pudiendo provocar una subestimación de la señal que podría explicar los niveles ligeramente inferiores, afectando en mayor medida a los niveles de concentración más bajos. De esta manera las recuperaciones

encontradas para la cuantificación llevada a cabo a través del clúster 2 resultan más bajas como se puede observar en la Tabla 16.

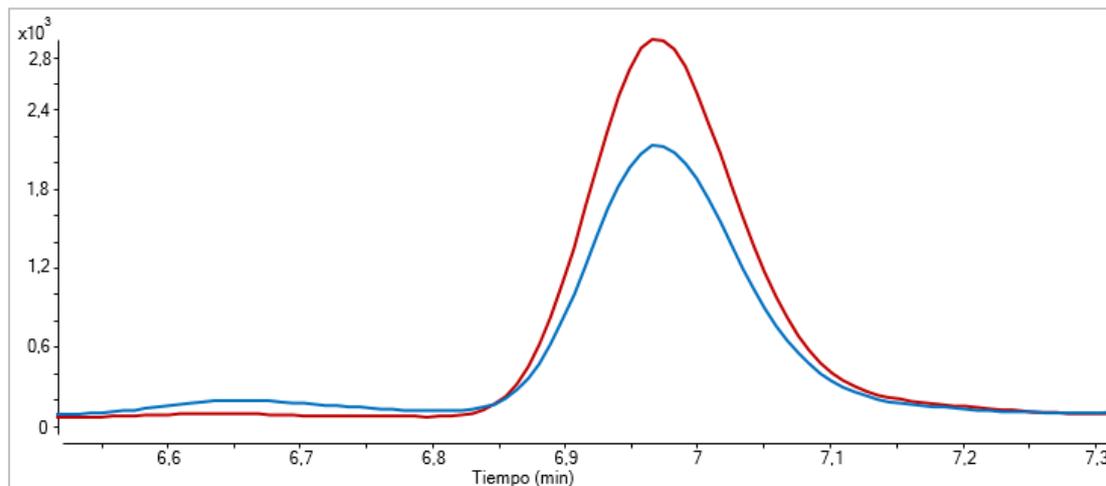


Fig. 20.- Cromatogramas extraídos de las transiciones 289->97 (rojo) y 289->109 (azul) medidas en una muestra de orina fortificada a nivel de 0,9 ppb.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede decir que el clúster 1, en el que se miden las transiciones 289->97, 290->98, 291->99 y 292->99, resulta más adecuado para la cuantificación de testosterona en muestras de orina.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método analítico no han podido ser evaluados al no estar disponible ninguna matriz de orina libre de testosterona para la realización de este trabajo de fin de master.

CONCLUSIONES

Mediante los experimentos llevados a cabo en este trabajo de fin de master se ha podido comprobar que es posible llevar a cabo una cuantificación directa de testosterona en orina mediante IDMS.

Para el desarrollo de la metodología analítica propuesta en este trabajo se han optimizado y seleccionado las condiciones experimentales de trabajo más adecuadas para el sistema instrumental HPLC-ESI-MSMS en modo SRM, con el fin de asegurar una detección sensible y selectiva de la testosterona.

Se ha caracterizado el trazador utilizado en este trabajo tanto en concentración como en abundancias isotópicas. Se ha encontrado que la disolución patrón empleada presenta un enriquecimiento de un 99.22% y la concentración obtenida mediante IDMS inversa fue de unas 18 ppm.

Se han evaluado de las características analíticas de la metodología de cuantificación propuesta mediante estudios de recuperación en muestras acuosas y se ha demostrado que es un método sensible, preciso y exacto para muestras acuosas a niveles de hasta 1 ppb, proporcionando recuperaciones entre 102 y 120% y RSDs inferiores a 5 % para ese nivel de concentración. Los límites de detección y cuantificación alcanzados en esta matriz fueron de 0.05 y 0.16 ppb respectivamente.

También se han evaluado las características analíticas del método realizando estudios de recuperación en muestra real. Se han obtenido recuperaciones próximas al 100% para todos los niveles de concentración ensayados y a través de los dos clúster de trabajo propuestos. El uso de dos clústers durante todo el diseño del método ha permitido comparar y seleccionar el clúster más adecuado para la medida de muestras reales de orina. Según los resultados obtenidos se ha seleccionado como óptimo el clúster número 1, con recuperaciones de entre 94 y 117% y RSDs inferiores a 8% al verse menos afectado por la posible presencia de sustancias interferentes.

Finalmente se ha aplicado la metodología propuesta a la determinación de testosterona en una muestra de orina de una mujer, encontrándose niveles de testosterona de unas 3 ppb, ligeramente por debajo del valor esperado para este tipo de muestra.

Además se puede añadir que el método propuesto es un método sencillo y rápido, ya que una vez caracterizado el trazador únicamente es necesario añadir una cantidad conocida directamente en la muestra y medir el ratio isotópico mediante el Espectrómetro de Masas después del tratamiento de muestra. Mediante esta metodología se evita la construcción de curvas de calibrado y los potenciales errores derivados de pérdidas de muestra o la presencia de efectos de matriz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amot, T., Mohsin, H. . R. & Nikolai, P. P. Testosterone and Cardiovascular Disease. **67**, 1–10 (2016).
2. Van Renterghem, P., Van Eenoo, P., Geyer, H., Sch??nzer, W. & Delbeke, F. T. Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes. *Steroids* **75**, 154–163 (2010).
3. Christiansen, K. in *Testosterone* 107–142 (1998).
4. Gambelunghe, C. *et al.* Effects of Chrysin on Urinary Testosterone Levels in Human Males. *J. Med. Food* **6**, 387–390 (2003).
5. Álvarez, A. M. Á., Suárez, I. R. M. G. & Marrero, I. I. M. a. Papel de la testosterona y el cortisol en el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 Role of testosterone and cortisol in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Rev. Cuba. Endocrinol.* **21**, 80–90 (2010).
6. José, M. *et al.* Análisis de resistencia insulínica, tolerancia a la glucosa y testosterona en mujeres jóvenes con síndrome de ovario poliquístico agrupadas por índice de masa corporal. *Rev. Chil. Ostet. y Ginecol.* **71**, 299–306 (2006).
7. Maravelias, C., Dona, A., Stefanidou, M. & Spiliopoulou, C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol. Lett.* **158**, 167–175 (2005).
8. Cawley, A. T. & Flenker, U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* **43**, 854–864 (2008).
9. World Anti Doping Agency (WADA). Prohibited List. *World Anti-Doping* 1–116 (2016). Available at: <http://www.wada-ama.org>.
10. de la Torre, X., Colamonici, C., Curcio, D., Molaioni, F. & Botrè, F. A comprehensive procedure based on gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry following high performance liquid chromatography purification for the analysis of underivatized testosterone and its analogues in human urine. *Anal. Chim. Acta* **756**, 23–29 (2012).
11. Konieczna, L., Plenis, A., Oldzka, I., Kowalski, P. & Bczek, T. Optimization of LC method for the determination of testosterone and epitestosterone in urine samples in view of biomedical studies and anti-doping research studies. *Talanta* **83**, 804–814 (2011).

12. Laboratorio Antidopaje de Barcelona - IMIM Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques.
13. Taieb, J. *et al.* Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin. Chem.* **49**, 1381–1395 (2003).
14. Di Benedetto, L. T., Dimitrakopoulos, T., Davy, R. M. & Iles, P. J. Testosterone Determination Using Rapid Heterogeneous Competitive-Binding for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Flow Injection. *Anal. Lett.* **29**, 2125–2139 (1996).
15. Conneely, G., Aherne, M., Lu, H. & Guilbault, G. G. Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal. Chim. Acta* **583**, 153–160 (2007).
16. Moal, V., Mathieu, E., Reynier, P., Malthièry, Y. & Gallois, Y. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin. Chim. Acta* **386**, 12–19 (2007).
17. Hill, D. W. & Langner, K. J. HPLC photodiode array UV detection for toxicological drug analysis. *J. Liq. Chromatogr.* **10**, 377–409 (1987).
18. Tachibana, S. & Tanaka, M. Simultaneous determination of testosterone metabolites in liver microsomes using column-switching semi-microcolumn high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **295**, 248–56 (2001).
19. Wang, G., Xiaoming Cui, H., Cheng, K.-C. & Korfmacher, W. A. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of testosterone and its metabolites in vitro samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2215–2221 (2006).
20. Caron, P., Turcotte, V. & Guillemette, C. A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume. *Steroids* **104**, 16–24 (2015).
21. Aguilera, R. *et al.* Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids. *J. Mass Spectrom.* **31**, 169–176 (1996).
22. Saudan, C. *et al.* Testosterone and doping control. *Br. J. Sports Med.* **40 Suppl 1**, i21–i24 (2006).
23. Kushnir, M. M. *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of

- steroids in clinical laboratories. *Clin. Biochem.* **44**, 77–88 (2011).
24. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 37–70 (1990).
 25. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675–679 (1985).
 26. Gross H., J. *Mass spectrometry. Trends in Genetics* **16**, (2011).
 27. Jacobs, B. A. W. *et al.* Development and validation of a rapid and sensitive UPLC–MS/MS method for determination of uracil and dihydrouracil in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **126**, 75–82 (2016).
 28. Arsene, C. G., Henrion, A., Diekmann, N., Manolopoulou, J. & Bidlingmaier, M. Quantification of growth hormone in serum by isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **401**, 228–235 (2010).
 29. Trinh, T., Harden, N. B., Coleman, H. M. & Khan, S. J. Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 1668–1676 (2011).
 30. Values, C. S. R., Solleder, C., Wudy, S. A. & Do, H. G. Profiling Steroid Hormones in Amniotic Fluid of Midpregnancy by Routine Stable Isotope Dilution / Gas Hydroxylase Deficiency *. **84**, 2724–2728 (2016).
 31. Patterson, D. G. *et al.* Determination of steroid hormones in a human-serum reference material by isotope dilution--mass spectrometry: a candidate definitive method for cortisol. *Clin. Chem.* **30**, 619–626 (1984).
 32. Liao, H. W. *et al.* Quantification of endogenous metabolites by the postcolumn infused-internal standard method combined with matrix normalization factor in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1375**, 62–68 (2015).
 33. Foster, G. L. & Rittenberg, D. A NEW PROCEDURE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS BY ISOTOPE DILUTION, WITH APPLICATION TO THE DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND FATTY ACIDS. *J. Biol. Chem.* **133**, 737–744 (1940).
 34. Itoh, N., Numata, M., Aoyagi, Y. & Yarita, T. Comparison of the behavior of ¹³C- and deuterium-labeled polycyclic aromatic hydrocarbons in analyses by isotope dilution mass spectrometry in combination with pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr. A* **1138**,

- 26–31 (2007).
35. Berg, T. & Strand, D. H. ^{13}C labelled internal standards-A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples. *J. Chromatogr. A* **1218**, 9366–9374 (2011).
 36. González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., Centineo, G. & García Alonso, J. I. Evaluation of minimal ^{13}C -labelling for stable isotope dilution in organic analysis. *Analyst* **135**, 953–964 (2010).
 37. Pickup, J. F. & McPherson, K. Theoretical considerations in stable isotope dilution mass spectrometry for organic analysis. *Anal. Chem.* **48**, 1885–1890 (1976).
 38. Budzikiewicz, H. & Grigsby, R. D. Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 146–157 (2006).
 39. Rychlik, M. & Asam, S. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 617–628 (2008).
 40. Wade, D. Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules. *Chem. Biol. Interact.* **117**, 191–217 (1999).
 41. de Leenheer, A. & Thienpont, L. M. Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology. *Mass Spectrom. Rev.* **11**, 249–307 (1992).
 42. Alonso, I. G. & Rodriguez-gonzalez, P. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. (RSC Publishing, 2013).
 43. Gonzalez-Antuña, A., Rodriguez-Gonzalez, P. & García Alonso, J. I. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **49**, 681–691 (2014).
 44. Fabregat-Cabello, N., Sancho, J. V., Vidal, A., González, F. V. & Roig-Navarro, A. F. Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution. *J. Chromatogr. A* **1328**, 43–51 (2014).
 45. Fabregat-Cabello, N., Castillo, Á., Sancho, J. V., González, F. V. & Roig-Navarro, A. F. Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1301**, 19–26 (2013).
 46. González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., Centineo, G. & García Alonso, J. I.

- Simultaneous determination of seven β 2-agonists in human and bovine urine by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry using compound-specific minimally ^{13}C -labelled analogues. *J. Chromatogr. A* **1372**, 63–71 (2014).
47. Somoano-Blanco, L., Rodriguez-Gonzalez, P., Centineo, G., Fonseca, S. G. & Garcia Alonso, J. I. Simultaneous determination of α -, β - and γ -hexabromocyclododecane diastereoisomers in water samples by isotope dilution mass spectrometry using ^{81}Br -labeled analogs. *J. Chromatogr. A* **1429**, 230–237 (2016).
 48. Dai, W. *et al.* Comprehensive and Highly Sensitive Urinary Steroid Hormone Profiling Method Based on Stable Isotope-Labeling Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 10245–10251 (2012).
 49. García Alonso, J. I., Rodríguez-González, P., González-Gago, A. & González-Antuña, A. Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules. *Anal. Chim. Acta* **664**, 68–76 (2010).
 50. Kubinyi, H. *Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem.* *Analytica Chimica Acta* **247**, (Elsevier, 1991).
 51. Ramaley, L. & Cubero Herrera, L. Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2707–2714 (2008).
 52. González-Gago, A., Marchante-Gayón, J. M., Ferrero, M. & Alonso, J. I. G. Synthesis of ^{81}Br -Labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Characterization Using GC (EI) MS and GC (ICP) MS. *Anal. Chem.* **82**, 2879–2887 (2010).
 53. Williams, T. M., Kind, A. J., Houghton, E. & Hill, D. W. Electrospray collision-induced dissociation of testosterone and testosterone hydroxy analogs. *J. Mass Spectrom.* **34**, 206–216 (1999).
 54. Presser, D. Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC / MS / MS Users Session MassHunter Quant : Method setup Peak detection optimization Quant troubleshooting • QQQ method development and optimization. *Agilent Technologies MH User Workshop* (2009).
 55. Van Eenoo, P. & Delbeke, F. T. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **101**, 161–178 (2006).
 56. Hauser, B., Deschner, T. & Boesch, C. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **862**, 100–

112 (2008).

57. Aoki, K., Shinohara, H., Tanaka, H. & Ueki, M. Steroid profile analysis and UGT2B17 genotyping of the same urine sample to determine testosterone abuse. *Forensic Toxicol.* **32**, 194–200 (2014).