

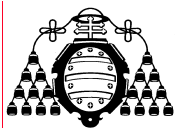
**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS  
UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Trabajo Fin de Máster*

**CUANTIFICACIÓN DE DIGITOXOSIL MITRAMICINA-SK EN  
MUESTRAS DE PLASMA DE RATA MEDIANTE HPLC-MS/MS**

**Santiago Ocón Barbas**

**Julio 2012, Oviedo**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**Departamento de Química Física y Analítica**

Prof. José Ignacio García Alonso

Departamento de Química Física y  
Analítica  
Facultad de Química  
Julián Clavería 8  
33006 Oviedo

Tel. +34-985103484  
Fax. +34-985103125  
E-mail. [jiga@uniovi.es](mailto:jiga@uniovi.es)

Oviedo, 23 de Julio de 2012.

José Ignacio García Alonso, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Oviedo,

**CERTIFICA**

Que D. Santiago Ocón Barbas ha realizado el trabajo fin de master titulado “CUANTIFICACIÓN DE DIGITOXOSIL MITRAMICINA-SK EN MUESTRAS DE PLASMA DE RATA MEDIANTE HPLC-MS/MS” bajo mi dirección.

Y para que conste firmo el presente certificado en Oviedo a 23 de Julio de 2012.

J. Ignacio García Alonso

Para la realización de esta memoria conté con la imprescindible ayuda de varias personas a las que estoy muy agradecido:

Al departamento de Química Física y Analítica y al Laboratorio de Isótopos Estables de la Universidad de Oviedo por permitirme realizar este proyecto:

Al Dr. Jose Ignacio Alonso por la supervisión del trabajo y la ayuda para orientar el estudio.

Al Dr. Pablo Rodríguez González por su seguimiento del trabajo en el laboratorio y por su guía y consejos para conducir los experimentos.

A Ana Gonzalez Antuña por todo el tiempo y trabajo que ha dedicado desinteresadamente en los ensayos de HPLC-MS

Al Dr. Francisco Morís Varas, por permitirme compaginar mi trabajo con la realización de este Máster en CC. Analíticas y Bioanalíticas.

A Mariam López y Patricia Oro por su labor en el ensayo de animalario.

A Javier González y Luz-Elena Núñez por su ayuda con mis dudas.

Y al resto de compañeros de Entrechem SL, por el apoyo y ánimo que me han dado.

A mis familiares y amigos que, aunque muchos desde lejos, me han acompañado estos meses.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1 ÁCIDOS AUREÓLICOS.....</b>	<b>6</b>
Definición.....	6
Aplicaciones e interés.....	7
Estudios farmacocinéticos.....	8
Cromatografía de líquidos de alta velocidad acoplada a espectrometría de masas en tándem. (HPLC – MS/MS) .....	9
<b>I.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....</b>	<b>9</b>
<b>I.3 EFECTO DE MATRIZ.....</b>	<b>15</b>
<b>II.OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>III. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>19</b>
<b>III.1 INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MATERIALES.....</b>	<b>19</b>
III.1.1 Instrumentación utilizada.....	19
III.1.2 Reactivos.....	19
<b>III.2 PROCEDIMIENTOS.....</b>	<b>20</b>
III.2.1 Estudio en ESI + de MTM-SK en agua. Scan, PI, MRM.....	20
III.2.2 Estudio en ESI + de MTM en agua. Scan, PI, MRM.....	21
III.2.3 determinación del compuesto en plasma de rata.....	21
III.2.3.1 Ensayo en ratas.....	21
III.2.3.2. Preparación de la muestra.....	21
III.2.3.3 Preparación del calibrado para medir en LC-MS/MS.....	22
III.2.4 abundancias teóricas y estudio de saturación de sodio.....	22
III.2.5 Estudio en ESI – MTM-SK y MTM.....	23
III.2.5.1 Estudio en agua. Scan, PI, MRM.....	23
III.2.5.2 Optimización de la cromatografía.....	23
III.2.5.3 Preparación del calibrado para medir las muestras de rata en modo negativo.....	24
III.2.5.4 Límites inferiores de detección.....	24
III.2.5.5 Efecto de la matriz.....	24
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.1 DETERMINACIÓN DE MTM Y MTM-SK EN POR HPLC-MS/MS EN MODO ESI (+)....</b>	<b>26</b>
IV.1.1 Estudio en ESI + de MTM-SK en agua. Scan, PI, MRM.....	26
IV.1.2 Estudio en ESI + de MTM en agua. Scan, PI, MRM.....	27
<b>IV.2 DETERMINACIÓN DEL COMPUESTO EN PLASMA DE RATA.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.3 ABUNDANCIAS TEÓRICAS Y ESTUDIO DE SATURACIÓN DE SODIO.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.4 DETERMINACIÓN DE MTM Y MTM-SK EN ESI MODO NEGATIVO.....</b>	<b>31</b>
IV.4.1 Cuantificación de MTM-SK en plasma de rata ESI (-).....	34
IV.4.2 Cálculo de los límites de detección.....	37
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>VI. ESTUDIOS FUTUROS.....</b>	<b>42</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 ÁCIDOS AUREÓLICOS.

### Definición

La familia de los ácidos aureólicos está compuesta por policétidos tricíclicos, glicosilados con dos cadenas oligosacáridicas de longitud variable<sup>1</sup>. Son producidos en su mayoría por especies del género bacteriano *Streptomyces*, y tienen potencial antitumoral, antimicrobiano e incluso antiviral. Los miembros más representativos son el de las mitramicinas (figura 1) y el de las cromomicinas. Otros miembros de la familia son las cromociclomicinas, olivomicinas, o las duramicinas.

La mitramicina fue, además, el primer compuesto de la familia en ser descubierto, en el año 1950. En un primer momento recibió diversos nombres (ácido aureólico, plycamicina, antibiótico LA-7017, y PA-144) al haber sido aislado por grupos distintos, y a partir de especies distintas de *Streptomyces*<sup>2,3,4</sup>. En todos los miembros de la familia hay dos cadenas de oligosacáridos unidos a la fracción aromática del policétido. En el caso de las mitramicinas, cromomicinas, cromociclomicinas y olivomicinas, poseen una cadena de dos y una de tres desoxiglucósidos.

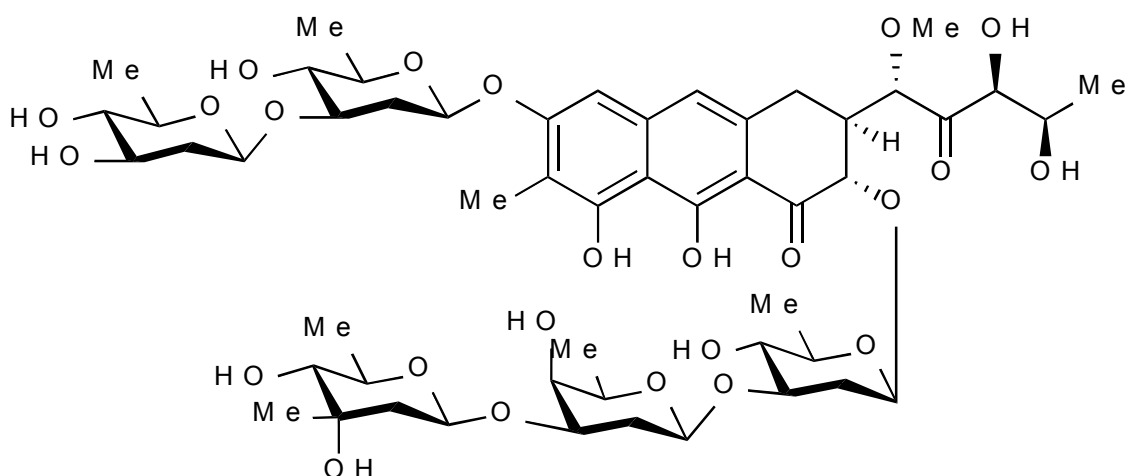


Figura 1. Estructura de la Mitramicina.

## Aplicaciones e interés.

El estudio de los ácidos aureólicos es importante debido a su potencial actividad como tratamiento para enfermedades como el cáncer. Ésta es una de las enfermedades de mayor incidencia actualmente en países occidentales y si se tienen en cuenta todas las posibles manifestaciones del cáncer, supone además la segunda causa de mortalidad. Hasta el momento, una de las terapias utilizadas para el tratamiento del cáncer es el uso de drogas supresoras del tumor o quimioterapia. Para muchos de los tipos de tumores a los que se enfrentan los pacientes ya existen en uso clínico un elevado número de medicamentos anticancerígenos, pero a pesar de ello aun es necesario el desarrollo de nuevos fármacos que sean menos tóxicos para el paciente y que tengan mejor actividad antitumoral que permitan el atacar a tumores que aun carecen del tratamiento apropiado<sup>5</sup>.

El origen del cáncer está en la desregulación del ciclo replicativo de ciertas células, conduciendo a una multiplicación descontrolada de las mismas y originando un tumor. La desregulación está causada por la actividad anómala de las rutas de transducción de señales celulares, llevadas a cabo por los factores de transcripción (TF). Los TF se convierten por tanto en dianas terapéutica para tratar la enfermedad<sup>6,7</sup>.

Mediante la biosíntesis combinatoria, la biocatálisis y la ingeniería genética de *Streptomyces*, es posible reorientar las rutas biosintéticas de los ácidos aureólicos con la finalidad de obtener nuevos análogos de las mitramicinas con potencial bioactivo y posible aplicación en quimioterapia. La spin-off biotecnológica de la Universidad de Oviedo, Entrechem S.L. aplica esta tecnología con el objetivo de lograr mejores compuestos antitumorales o antimicrobianos.

Entre ellos, tiene gran interés la digitoxosil- mitramicina – SK (*figura 2*), producida por biosíntesis combinatoria en *S. argillaceus*, que combina dos características estructurales que previamente habían demostrado mejorar el comportamiento farmacológico confiriendo menor toxicidad<sup>9</sup>. Su actividad es como agente de unión no covalente al ADN, en regiones que codifican genes relacionados con la oncogénesis. En concreto, puede bloquear la unión del TF Sp1<sup>8</sup>. Actualmente se encuentra en fase de estudio preclínica, habiéndose realizado con ella ensayos sobre animales y cultivos celulares, en los que se evalúa el efecto del compuesto y otros análogos sobre la inhibición del crecimiento del tumor<sup>5</sup>.

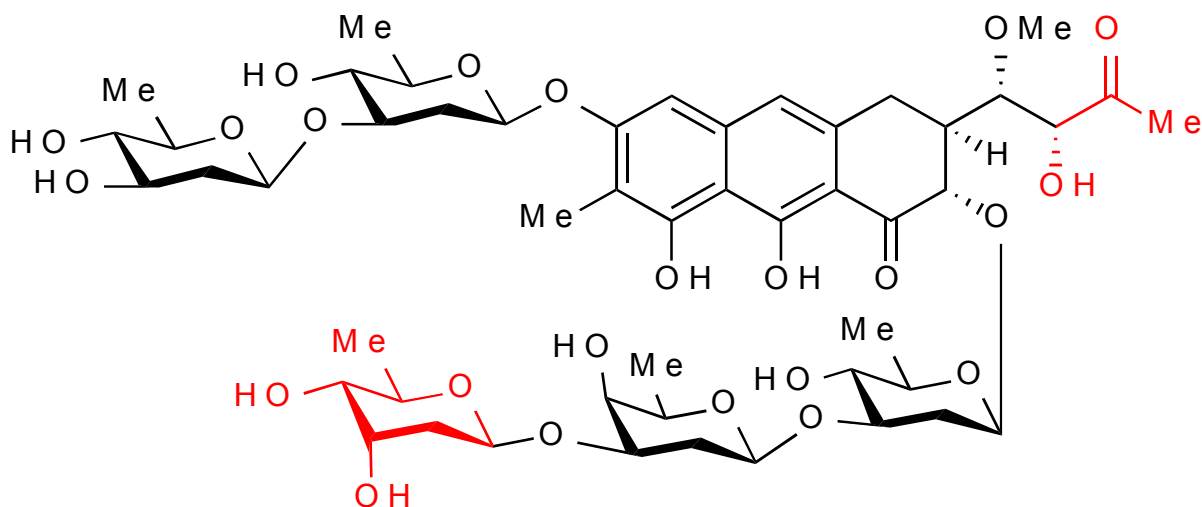


Fig. 2. Estructura de la digitoxosil mitramicina SK. En rojo se indican las variantes respecto a la mitramicina.

### Estudios farmacocinéticos.

En el estudio de un fármaco para su aplicación en clínica es importante saber a qué velocidad se metaboliza o elimina del organismo. Para ello es necesario determinar la cantidad del mismo en el plasma a lo largo del tiempo, desde la aplicación del fármaco hasta su eliminación total. Un modo de llevarlo a cabo es inyectar en ratones o ratas una cantidad conocida del fármaco y tomar muestras de sangre a diversos intervalos de tiempo. Para un estudio completo con ratones se toma la sangre total de tres ratones por punto de tiempo mediante punción cardíaca, sacrificando al animal. En cambio, si se trabaja con ratas, es posible hacer varias extracciones de sangre de un mismo animal dado su mayor tamaño. El compuesto se analiza en el plasma de estas muestras, donde se encuentra mezclado con otros muchos elementos de la sangre para lo que es necesario emplear técnicas de detección altamente selectivas. Para ello se emplea, previa preparación de la muestra, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.



## **Cromatografía de líquidos de alta velocidad acoplada a espectrometría de masas en tándem. (HPLC – MS/MS).**

La cromatografía es un método de separación física en el cual los componentes a separar son distribuidos selectivamente entre dos fases inmiscibles: una fase móvil y una fase estacionaria, fluyendo la primera a través de la segunda.<sup>10</sup> La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) como el equipo de la figura 3, es una técnica analítica que combina la separación física ofrecida por la cromatografía líquida (HPLC) con la posibilidades de identificación y cuantificación de la espectrometría de masas. Cuando el sistema además emplea dos analizadores de masas acoplados en tándem, se denomina HPLC—MS/MS, y ofrece unas mejores prestaciones en cuanto a sensibilidad y eliminación del ruido de fondo como se verá más adelante, lo cual es muy útil al analizar muestras complejas como es el plasma. Las aplicaciones de la LC-MS son diversas y tienen unas elevadas sensibilidad y selectividad.



Figura 3. Equipo Agilent LC-MS/MS serie 6400.

## I.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que mide la relación entre carga y masa ( $m/z$ ) de partículas cargadas.<sup>11</sup> Se utiliza para la determinación de la masa exacta de analitos, para determinar la composición elemental de una muestra o molécula y para elucidar la estructura química de moléculas como por ejemplo péptidos. La base de la MS es la ionización química de los compuestos para generar moléculas o fragmentos moleculares con carga. La muestra es cargada en el equipo de MS y vaporizada. A continuación debe producirse la ionización de las moléculas en fase gaseosa. Una vez ionizadas las moléculas, entran al analizador de masas donde son separadas en función de la relación ( $m/z$ ). Por último, los iones llegarán a un detector a una intensidad muy baja, y necesitan de un sistema multiplicador que recoja la señal, la aumente y la transforme en señal eléctrica para ser registrada. En la tabla 1 se muestran algunas de las modalidades posibles en cada paso del proceso.

<b>Fuente de Ionización</b>	<b>Analizador</b>	<i>Detector</i>
ESI	Quadrupolo, QqQ	Multiplicador de electrones
APCI	Time of Flight	Fotomultiplicador
APPI	FT –MS	Placa microcanal
MALDI	Ion Trap	

Tabla 1. Algunas de las posibilidades en cada elemento del espectrómetro de masas.

**La ionización por electrospray (ESI)** es útil en la ionización de macromoléculas ya que es una fuente de ionización débil, que evita la excesiva fragmentación de las moléculas al ionizarse.<sup>12</sup> En esta modalidad, como puede verse en la figura 4, se introduce el analito disuelto en un solvente más volátil por un capilar de metal muy pequeño y cargado. Debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido es expulsado del capilar

formando un aerosol de gotas pequeñas (10  $\mu\text{m}$ ) altamente cargadas. A medida que el solvente se evapora, las moléculas de analito se aproximan entre sí, se repelen y finalmente, cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas. Este proceso se repite hasta que el analito queda libre de solvente y solamente quedan iones, que se dirigen hacia el analizador de masas.

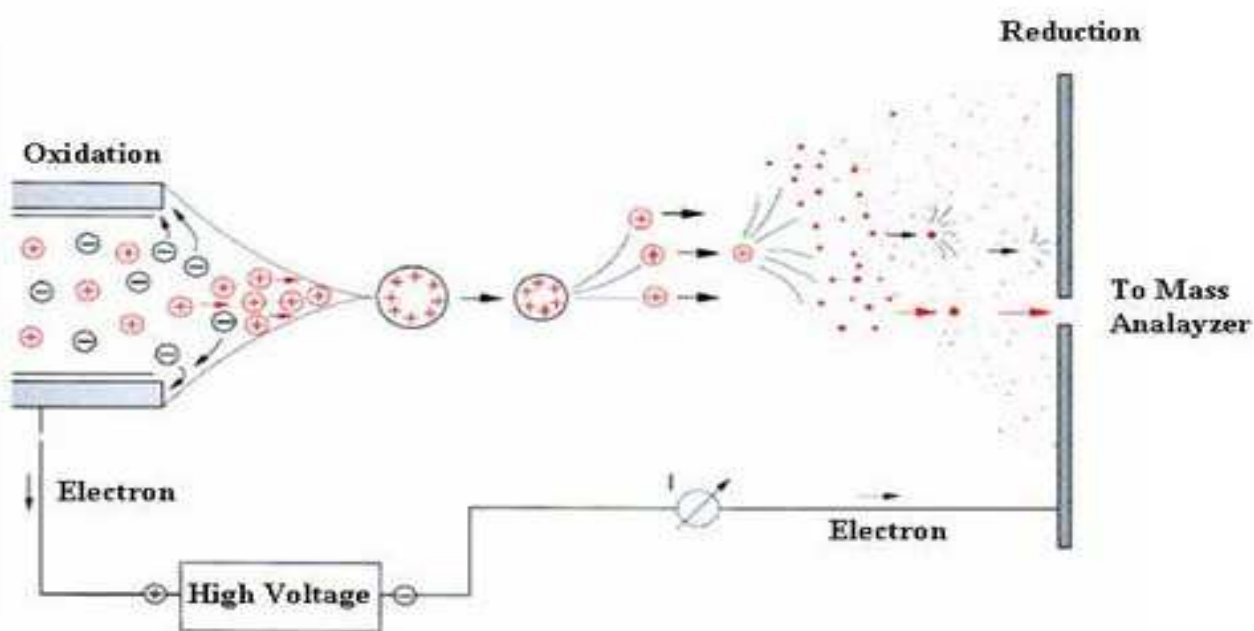


Figura 4. Esquema del proceso de ionización por electrospray (ESI).

**Analizador tipo Quadrupolo.** Consistente en cuatro barras dispuestas en paralelo enfrentadas entre sí como muestra la figura 5.

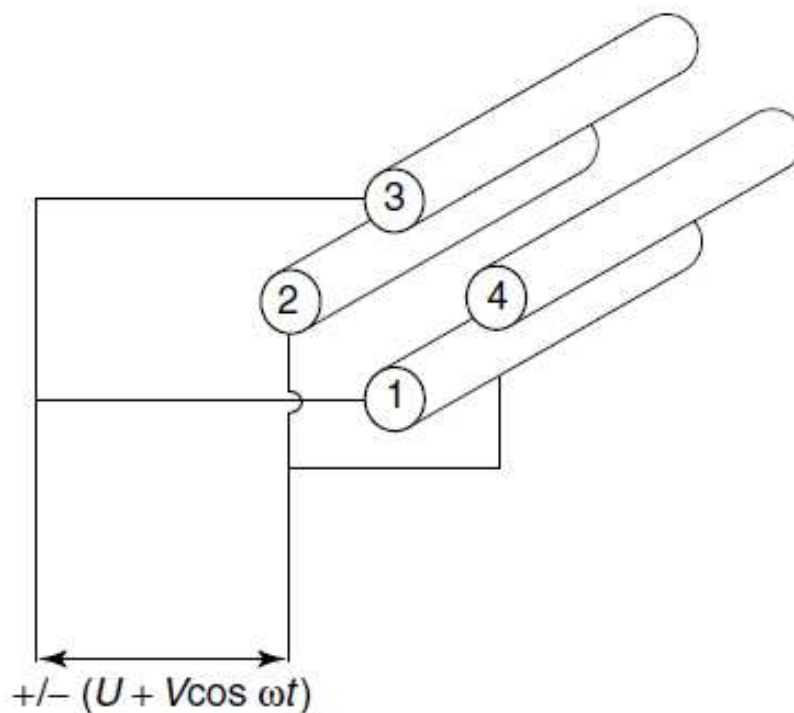


Figura 5. Esquema de la configuración de un cuadrupolo.

Los pares opuestos están conectados eléctricamente. Se aplica un voltaje consistente tanto en radiofrecuencia (RF) como corriente continua (DC) estando desfasados a  $180^\circ$  los componentes de RF en los dos pares. A determinados valores del voltaje, los iones cargados de una particular  $m/z$  siguen una trayectoria estable a través de las barras y llegan hasta el detector. De ese modo, para producir un espectro de masas se hacen variar los voltajes de RF y DC de forma sistemática para atraer iones de mayor o menor  $m/z$  al detector. El cuadrupolo es un analizador ideal para cromatografía y es capaz de hacer barridos rápidos utilizando voltajes bajos, lo que lo hace tolerar presiones relativamente altas como las producidas en LC- MS.

Un analizador de masas con cuadrupolo permitirá hacer medidas en los modos de Scan (barrido) y SIM (selected ion monitoring).<sup>13</sup>

- **Scan o barrido:** en este modo, también denominado total ion current (TIC), se miden todas las masas que llegan al analizador sin restricción, obteniendo un cromatograma en el que se representan la suma de intensidades a lo largo de todo el rango de masas detectadas en cada punto del análisis. El rango es normalmente de varios cientos de unidades de  $m/z$ . En una muestra compleja, la información es limitada ya que muchos analitos eluyen a la vez enmascarando especies químicas individuales.<sup>13</sup>
- **SIM:** este otro modo de barrido solo recoge las relaciones  $m/z$  de un rango limitado, consiguiendo un incremento en la sensibilidad.

### **Espectrometría de masas en tándem.**

La ventaja de la MS es su capacidad no sólo de aportar información sobre la masa molecular de un analito sino además sobre su estructura. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite la fragmentación “suave” de las moléculas que se desean analizar de modo que se formen fragmentos pequeños, sin llegar a romper todas las moléculas del analito en cuestión. Además es aplicable a todas las formas de ionización siempre que exista un equipo disponible.

**Analizador de Triple cuadrupolo:** esta configuración consiste en la combinación de tres cuadrupolos consecutivos (pueden ser hexapolos u octapolos) donde el segundo cuadrupolo no actúa como analizador sino como celda de colisión en la que se lleva a cabo la fragmentación de los iones transmitidos por el primer cuadrupolo. Además actúa como dispositivo para enfocar los iones producidos hacia el tercer cuadrupolo.

### **Posibilidades de medida:**

- **Precursor Ion Scan:** ahora, el segundo analizador recoge una única  $m/z$ , mientras que el primer analizador está ajustado para barrer a través del rango de masas de interés. De nuevo, en el segundo cuadrupolo a modo de celda de colisión se produce la fragmentación de los iones. Sólo se ve una señal en el detector, cuando los iones están siendo transmitidos tanto por el primer analizador como por el segundo.

- **Multiple reaction monitoring (MRM):** también llamado Selected Reaction Monitoring (SRM) es la modalidad que permite monitorizar la cantidad de analito presente en una muestra de forma indirecta al detectar los iones de fragmentos característicos de dicho analito. El primer analizador selecciona la  $m/z$  del analito de interés y pasa a la celda de colisión. Allí se fragmenta y da lugar a iones de los que el segundo analizador sólo recoge los fragmentos seleccionados.

La sensibilidad para detectar los fragmentos es menor que en un barrido normal, registrándose picos de señal más bajos, pero sin embargo se obtiene el beneficio de reducir la relación señal/ruido de manera considerable ya que la señal de fondo de la muestra es prácticamente cero. Esto es especialmente interesante para muestras complejas como el plasma donde nuestro analito puede estar mezclado con otros muchos compuestos. En la figura 6 se puede observar el esquema de este proceso:

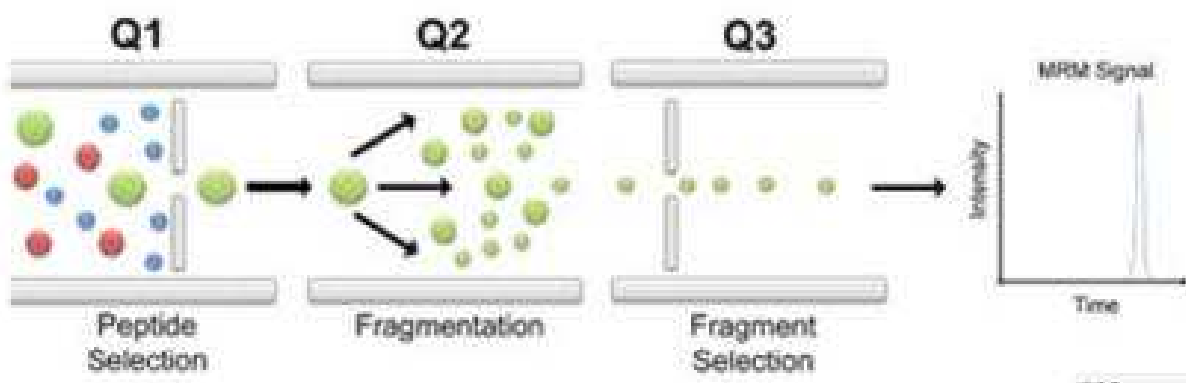


Figura 6. Secuencia dentro de un equipo triple cuadrupolo, en el modo de MRM

- **Neutral Loss:** se ha observado que las moléculas con determinadas características estructurales también pasan por reacciones de reagrupamiento en la fuente del analizador de masas. La más conocida es la reacción de McLafferty, donde un átomo de hidrógeno migra a un grupo insaturado eliminando una molécula neutra (Figura 7). Estos reagrupamientos se pueden dar en el analizador de masas, y dar información útil para interpretar el espectro de un material desconocido.<sup>13</sup>

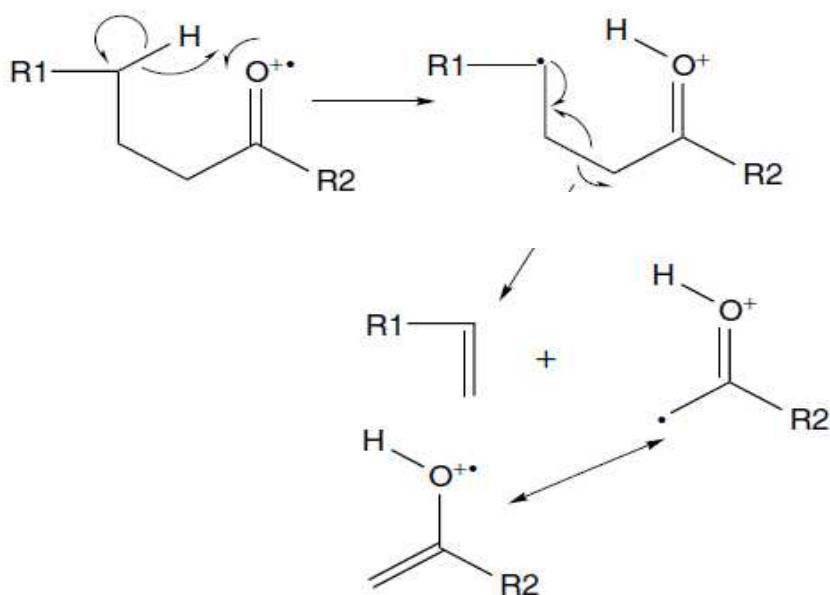


Figura 7. Reacción de McLafferty.

### I.3 EFECTO DE MATRIZ.

La matriz en la que se encuentra el analito de interés es el plasma en dilución con metanol y desprovisto de proteínas. El entorno que esta matriz genera, puede causar un efecto de cambio de la señal analítica afectando a su magnitud al causar que la ionización de la molécula no sea igual que en un entorno más neutral. Utilizando el método de adición de un patrón interno o estándar de concentración conocida y expresando la señal del analito como relativa a la de dicho patrón interno, logramos minimizar el efecto de la matriz y obtenemos una medida mucho más fiable.

En el presente estudio se utilizó la mitramicina como patrón interno en todas las medidas. Su estructura se puede observar en la anterior figura 1.

## **II.OBJETIVOS**



El estudio de la farmacocinética en animales de experimentación es un paso fundamental en los estadios de ensayos preclínicos para evaluar la utilidad de un compuesto. Aporta información sobre el tiempo de residencia del compuesto en el organismo, de modo que se puedan ajustar la administración de las dosis. La cromatografía líquida facilita la separación del compuesto para después poder ser medido mediante la espectrometría de masas.

El **principal objetivo** de este Proyecto fin de Master es el desarrollo de un método de análisis para determinar la cantidad de compuestos análogos de la mitramicina en plasma de animales de experimentación, mediante cromatografía de líquidos acoplada a Espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

El objetivo general se tratará de alcanzar a través de los siguientes objetivos parciales:

- i) Estudio de la fragmentación del compuesto digitoxosil mitramicina SK, utilizando como patrón interno el compuesto mitramicina
- ii) Optimización de la medida del compuesto mediante MRM, en muestras reales de plasma de rata.
- iii) Determinación de los límites inferiores de detección (LOD) mediante el cálculo de la concentración hallada en las muestras.

## **III. EXPERIMENTAL**

## III EXPERIMENTAL.

### III.1 INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MATERIALES.

#### III.1.1 Instrumentación utilizada

- Equipo LC MS/MS: HPLC 1290 Infinity Agilent; 6460 Triple-Quad LC/MS Agilent. (Tokyo, Japón). Equipo de espectrometría de masas acoplado a un sistema de HPLC con autosampler. Trabaja con una fuente de ionización por ESI con tecnología Jet Stream, consistente en la utilización de un gas de impulsión supercalentado que permite aumentar la cantidad de moléculas que se ionizan.
  
- Balanza de precisión Metler – Toledo AB204-S (EE.UU)
  
- Micropipetas: Pipetman, Gilson. ( EE.UU)
  
- Columnas de cromatografía:
  1. Zorbax SB-C18. 2,1 x 50mm. Tamaño de partícula 1.8µm. Agilent.
  2. Zorbax SB-C18. 2,1 x 100mm. Tamaño de partícula 3.5µm. Agilent.

#### III.1.2 Reactivos:

- Mitramicina (mtm) Entrechem S.L.  
MW = 1084,4
- Digitoxosil Mitramicina SK (mtm sk) Entrechem S.L.  
MW= 1040.5
- Acetonitrilo. Optima LC/MS Fischer Scientific.
- Ácido trifluoroacético: 99% (Technical) VWR (EE.UU)
- NH<sub>3</sub> 28-30% Merck.
- Acido fórmico: Fluka analytical, pureza 98%

## III.2 PROCEDIMIENTOS.

### III.2.1 Estudio en ESI + de MTM-SK en agua. Scan, PI, MRM.

El primer paso del estudio fue observar el compuesto disuelto en agua para detectar su tiempo de retención y su fragmentación en el equipo de espectrometría de masas.

- Se preparó una dilución de 1000ppm a partir de 1mg del compuesto liofilizado en H<sub>2</sub>O MiliQ. A partir de ella se obtuvo otra dilución a 100ppm por volumen.
- Con esta dilución se llevó a cabo en primer lugar un Scan en modo ESI + del compuesto. A continuación se realizó el Product Ion (PI) para detectar los fragmentos que se obtienen. La energía de colisión óptima se determinó ensayando varias energías de colisión en la celda de colisión y seleccionado la que ofrecía mayor intensidad de los fragmentos sin llegar a descomponer totalmente todo el ión precursor
- Por último se registró los fragmentos producidos mediante MRM.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

Eluyente A = H<sub>2</sub>O; 0.1% ácido trifluoroacético.

Eluyente B = Acetonitrilo

Volumen de inyección = 20μL

Temperatura de la columna = 40°C

Flujo = 0.3mL/min.

Columna = 1

Tiempo (min)	% fase B
0	10
6	60
7	100
8	100
9	10

Tabla 2. Gradiente de fases en la cromatografía.

### III.2.2 Estudio en ESI + de MTM en agua. Scan, PI, MRM.

La mitramicina fue utilizada como patrón interno y se hizo un estudio preliminar en el mismo modo que con el analito (MTM-SK).

### III.2.3 determinación del compuesto en plasma de rata.

Para estudiar la duración del fármaco en el organismo se realiza un ensayo de farmacocinética en ratas.

#### III.2.3.1 Ensayo en ratas.

Se utilizaron 4 ratas macho sanas de cuatro meses y medio de edad, a las que se administró una dosis de 8mg/kg de digitoxosil mitramicina SK disuelto en suero salino, por vía intravenosa. Los animales fueron anestesiados previamente mediante gas isoflurano, y se tomaron diversos puntos de muestra a distintos tiempos que cubrieron un período de 24 horas. Para algunos de estos puntos no fue posible tener réplicas debido a dificultades técnicas durante la extracción de sangre. Ésta se llevó a cabo mediante incisión en el extremo de la cola de los animales.

Así mismo, se tomo plasma de una quinta rata sin tratar, para utilizarlo como control y para preparar los calibrados en matriz.

Cada rata se empleó para tomar diversos puntos que cubriesen un período de 24 horas:

<b>Rata</b>	<b>Tiempos de muestreo</b>
1	4h; 6h, 8h, 24h
2	5'; 15'; 30'; 1h; 2h; 4
3	15'; 30'; 1h; 2h; 4h; 20h
4	5'; 15'; 30'; 1h; 16h

#### III.2.3.2. Preparación de la muestra.

La sangre obtenida en el ensayo anterior se recoge en tubos eppendorf.

- Para separar el plasma de la fracción celular se centrifuga a 3000g durante 15min.
- El sobrenadante, amarillento, se recoge en un nuevo tubo para ser procesado o conservado a -20°C hasta su posterior utilización.
- Para analizar la muestra, primero es necesario eliminar las proteínas de modo que evitamos que éstas entren en los equipos de análisis. Se lleva a cabo por precipitación con metanol.
- Se añadieron en un tubo con un volumen de plasma, cuatro volúmenes de metanol (100µL de plasma; 400µL de metanol).
- Al mezclar la muestra por agitación mecánica se observa una solución blanquecina por la precipitación de las proteínas.

- Se centrifugó a 15.000g durante 5 min. Las proteínas quedan como precipitado y se recoge el sobrenadante, que se volvió a centrifugar y separar en un nuevo tubo.
- Se trató el volumen total de la muestra, y a lo largo de los ensayos permaneció conservada a -20°C.

### III.2.3.3 Preparación del calibrado para medir en LC-MS/MS.

- Solución stock de MTM-SK: a partir de la misma dilución usada para inyectar a las ratas (1600 ppm) se preparó una dilución por volumen, de 10ppm en plasma de la rata control. Se preparó un calibrado con 6 puntos: 0, 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppb, a partir de la solución stock anterior, añadiendo los volúmenes adecuados para obtener las concentraciones del calibrado.

A partir de una solución de 1000ppm en H<sub>2</sub>O de la MTM, se obtuvo otra de 10ppm en plasma, a partir de la cual se hicieron adiciones sobre los puntos del calibrado de modo que cada uno de ellos tuviera una concentración final de 1 ppm. La misma adición de MTM como patrón interno se realizó sobre cada una de las muestras obtenidas a partir de las ratas.

### *III.2.4 abundancias teóricas y estudio de saturación de sodio.*

Se realizó el cálculo de las abundancias isotópicas teóricas para comprobar que corresponden con las medidas experimentalmente.

Al observar mayor sensibilidad en las muestras en plasma frente a lo medido en agua, realizamos un ensayo de saturación de Na<sup>+</sup> en disoluciones crecientes de Na<sup>+</sup> con el analito en H<sub>2</sub>O, y de ese modo comprobar la influencia de la matriz en la formación del aducto, ya que el plasma es rico en sodio.

Se preparan disoluciones del analito y el patrón interno (1ppm final de ambos) en H<sub>2</sub>O con las siguientes concentraciones de Na<sup>+</sup>: 0, 5, 20, 30, 40 y 60, mM, y se lleva a cabo un ensayo en SIM, monitorizando solamente las transiciones:

MTM-SK: 1062,9 => 413,3

MTM: => 1107,5 => 427,3

### III.2.5 ESTUDIO EN ESI - DE MTM-SK Y MTM

#### III.2.5.1 Estudio en agua. Scan, PI, MRM.

Tras estudiar el comportamiento de los compuestos en modo ESI +, realizamos el mismo estudio en modo negativo. El proceso es el mismo, realizando primero un Scan, y después el product ion para optimizar la energía de colisión con la que fragmentar los compuestos en la celda de colisión, correspondiente al cuadrupolo intermedio en el analizador de masas.

Las fases móviles utilizadas en esta parte del estudio fueron inicialmente:

A: H<sub>2</sub>O + NH<sub>3</sub> (25%)

B: ACN + NH<sub>3</sub> (25%)

Bajo estas condiciones, el compuesto MTM-SK mostraba colas y un ensanchamiento, por lo que se probaron nuevas condiciones cromatográficas para mejorar la resolución. En el apartado IV. Resultados, se indica que al optimizar la cromatografía se llegó a obtener un desdoblamiento de la señal del compuesto en dos picos diferentes.

#### III.2.5.2 Optimización de la cromatografía.

Las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron:

Eluyente A = H<sub>2</sub>O; 0.15% ácido fórmico; 0,3%NH<sub>3</sub>; **pH**= 8,15

Eluyente B = Acetonitrilo

Volumen de inyección = 20µL

Temperatura de la columna = 40°C

Flujo = 2.0mL/min.

Columna = 2

#### III.2.5.3 Preparación del calibrado para medir las muestras de rata en modo negativo.

Se procedió de la misma manera que al realizar las medidas en modo ESI (-), pero en esta ocasión los puntos del calibrado fueron: 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 500, 1000 ppb.

El patrón interno se añadió a una concentración final de 100ppb.

#### III.2.5.4 Límites inferiores de detección.

El límite de detección corresponde a la masa o concentración mínima de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado.<sup>14</sup> Éste límite se puede calcular como tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen del calibrado dividido por la pendiente.

#### III.2.5.5 Efecto de la matriz.

Para minimizar la distorsión que la matriz de la muestra puede tener sobre la señal analítica, se añadió a todas las muestras una cantidad del patrón interno, a concentración 1ppm en los estudios en ESI (+) y después a 100ppb en el modo negativo, al ver que los valores de concentración de las muestras eran bastante inferiores.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 DETERMINACIÓN DE MTM Y MTM-SK EN POR HPLC-MS/MS EN MODO ESI (+)

#### IV.1.1 Estudio en ESI + de MTM-SK en agua. Scan, PI, MRM.

Al llevar a cabo la medida en modo Scan, se observan señales de intensidad más alta para las  $m/z$  de 1058,0; 1062,9, y 1078,9. (Figura 8) Corresponden a aductos (tabla 3) sobre la masa de 1040,5 que es el peso molecular de la MTM-SK

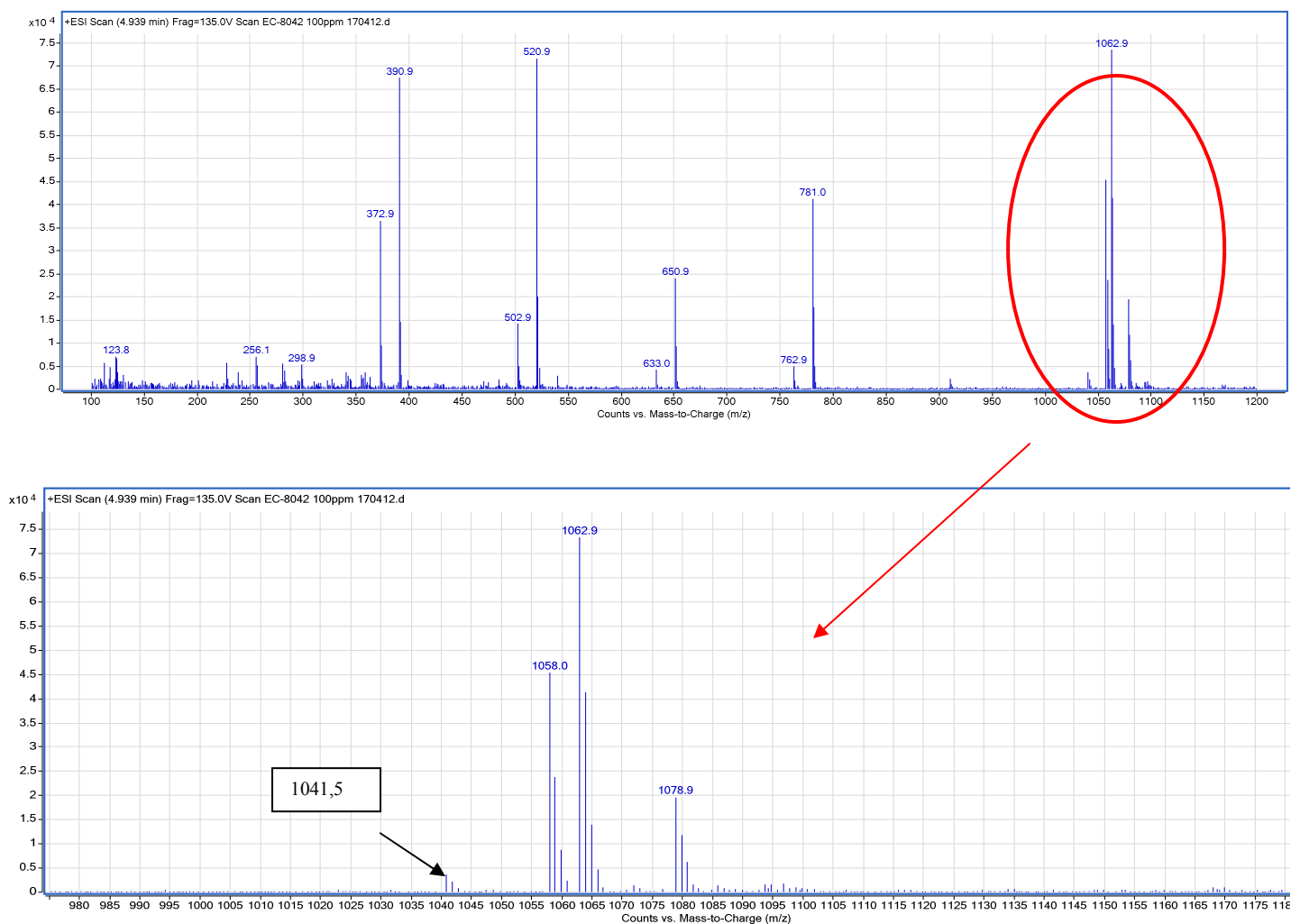


Figura 8. Espectro de masas extraído de la medida en modo Scan. En la parte inferior detalle de las  $m/z$  observadas entorno a la masa del analito.

m/z	aducto
1041,5	[MTM+H] <sup>+</sup>
1059,0	[MTM+18] <sup>+</sup> *
1063,4	[MTM+23] <sup>+</sup> aducto de Na <sup>+</sup>
1079,3	[MTM+39] <sup>+</sup> aducto de K <sup>+</sup>

Tabla 3. Aduetos formados en el Scan. El Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> proceden probablemente de restos en el interior de la columna. \*podría tratarse de una hidratación en la molécula.

Ya que el [MTM+H]<sup>+</sup> presenta baja sensibilidad por la presencia de aductos, se decide trabajar con la m/z 1062,9 por ser la señal de mayor intensidad.

A continuación se optimizó la energía de colisión en el segundo cuadrupolo, de modo que obtuviesemos una proporción de fragmentos con buena intensidad, sin que el ión precursor llegase a descomponerse del todo.

Energía óptima de colisión: 50.0V

Los fragmentos que se eligen para monitorizar en MRM son los que resultan de las transiciones: 1062,9 => 803,5  
1062,9 => 413,3

#### IV .1.2 Estudio en ESI + de MTM en agua. Scan, PI, MRM.

Para la MTM, utilizada como patrón interno, también encontramos los aductos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, con las m/z indicadas en la tabla 4

m/z	aducto
1084	[MTM+H] <sup>+</sup>
1102,5	[MTM+18] <sup>+</sup> *
1107,5	[MTM+23] <sup>+</sup> aducto de Na <sup>+</sup>
1123,5	[MTM+39] <sup>+</sup> aducto de K <sup>+</sup>

Tabla 4. aductos formados en el Scan del patrón interno.

Al optimizar la **energía de colisión**, obtenemos que la mejor es **40.0V**, como puede verse en la figura 9.



Figura 9 Optimización de la energía de colisión para el patrón interno.

Ésta energía de colisión nos permite seleccionar uno fragmento para la posterior monitorización del compuesto en el modo MRM, que son los indicados a continuación:

1107,5 => 847,5

1107,5 => 427,3

#### IV. 2 DETERMINACIÓN DEL COMPUESTO EN PLASMA DE RATA.

Del ensayo llevado a cabo en ratas se obtuvieron muestras de sangre suficientes para extraer plasma y llevar a cabo los ensayos posteriores. Por dificultades al extraer la sangre, no se pudieron tomar réplicas de todos los puntos de tiempo del ensayo, por lo que los

resultados no se pueden tomar para hacer cálculos farmacocinéticos, aunque sí sirven como muestra para poner a punto el método analítico.

Las muestras se prepararon como se indica en el apartado III.3.2, y se conservaron a -20°C hasta su utilización para los ensayos posteriores.

#### IV.3 ABUNDANCIAS TEÓRICAS Y ESTUDIO DE SATURACIÓN DE SODIO.

Se calcularon las abundancias isotópicas teóricas y experimentales de la MTM-SK y la MTM, viéndose que concuerdan unas con otras, como se ilustra en la figura 10a y 10b

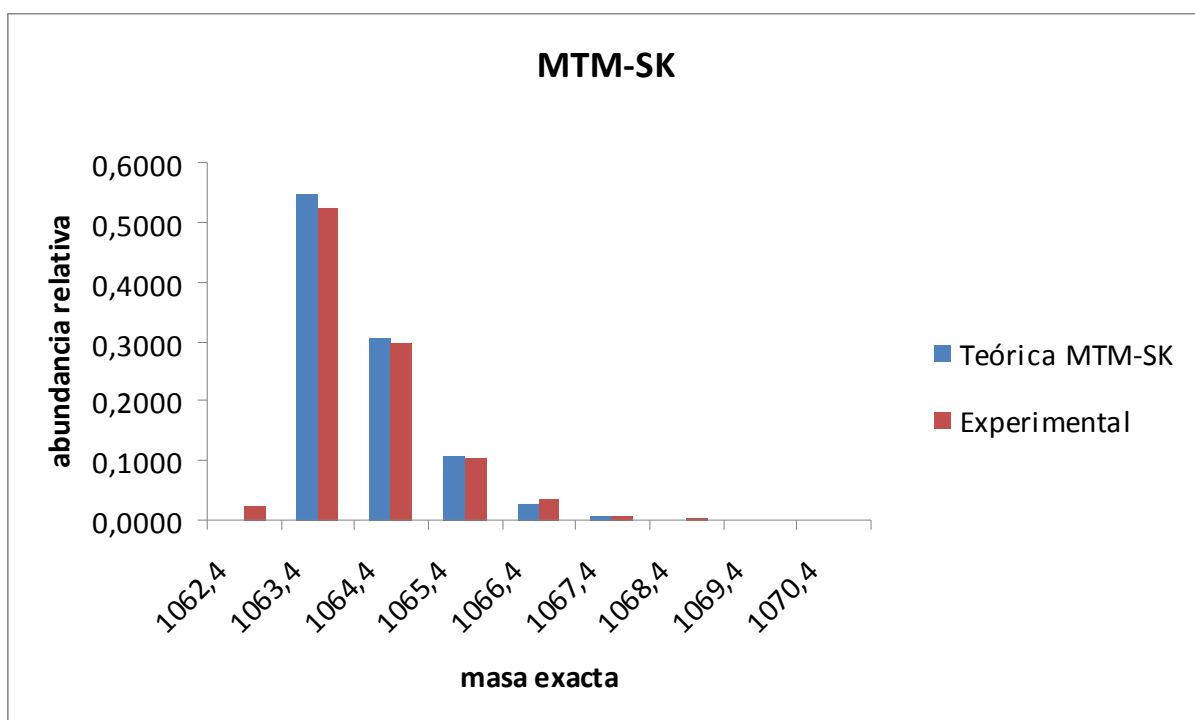


Figura10a Abundancias isotópicas en el analito (MTM-SK)

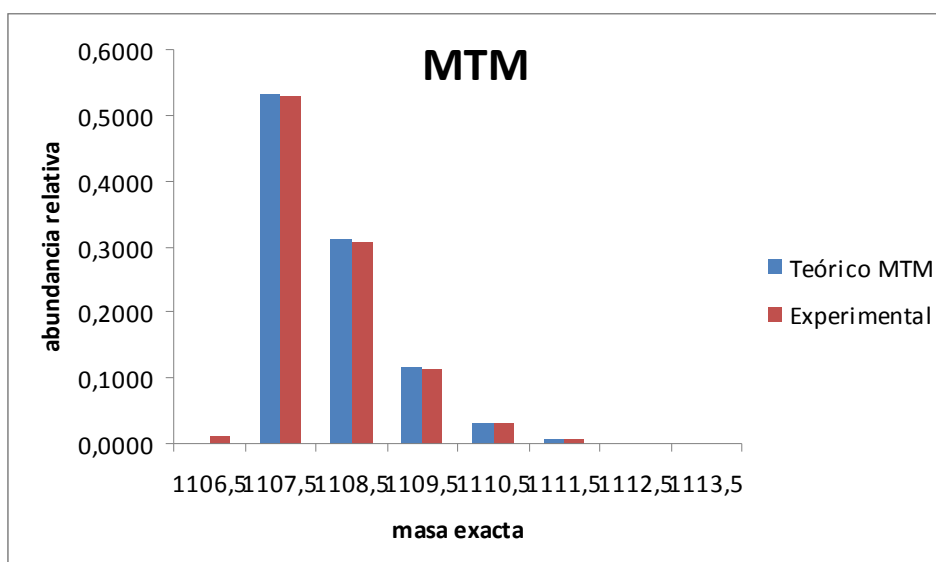


Figura 10b Abundancias isotópicas en el patrón interno (MTM).

Por otro lado se estudió la influencia de la matriz en la sensibilidad del aducto de sodio. Se observó que la señal de la  $m/z$  1063,4; correspondiente al aducto de  $\text{Na}^+$   $[\text{MTM}+23]^+$ , incrementa según aumenta la concentración de NaCl en el que se disuelve la molécula, llegando al máximo entorno a 50mM. Estos resultado se reflejan en la Figura 11. Sin embargo parece que después podría disminuir. La relación de la señal entre el analito y el patrón interno se mantiene constante a medida que la concentración de NaCl aumenta, de modo que se puede concluir que afecta a los dos por igual.

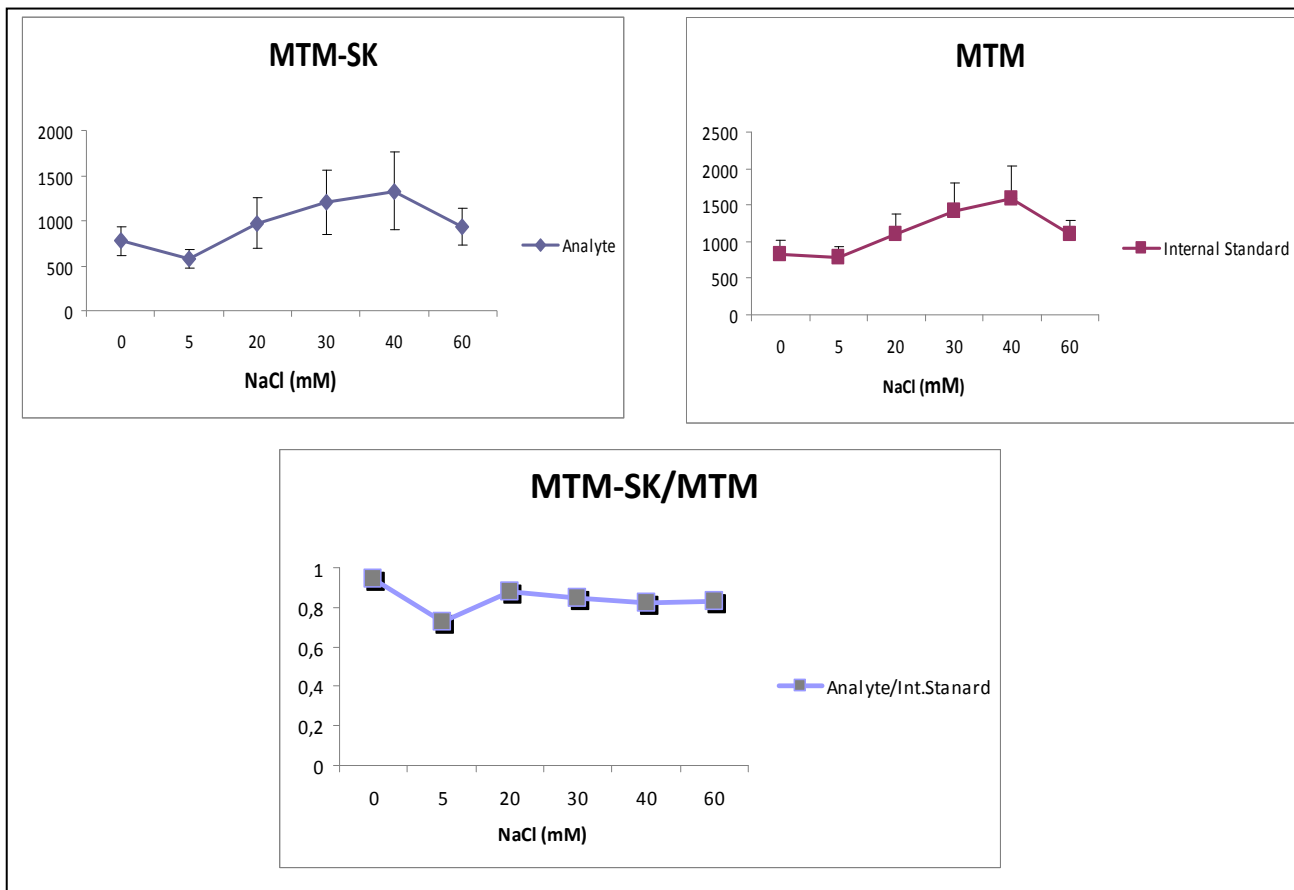


Figura 11. Estudio de la saturación del sodio y su influencia en la intensidad de la señal analítica.

#### IV.4 DETERMINACIÓN DE MTM Y MTM-SK EN ESI MODO NEGATIVO.

Tras declinar el uso del ESI + por la formación de aductos, abordamos el mismo estudio en modo negativo.

Las condiciones en modo negativo hacen que las fases utilizadas para favorecer la ionización negativa de los compuestos tengan un pH más básico que en el modo de ESI (+). Tras un primer ensayo donde se utilizó como fases móviles  $H_2O + NH_3$ , y  $ACN + NH_3$ , se observa que el pico muestra colas demasiado grandes, por lo que se aborda la optimización cromatográfica para tratar de resolver mejor el pico y determinar en su caso si se tratase de impurezas.

En el proceso de optimización se decide utilizar una columna más larga para lograr una mejor resolución, por lo que también se modifica el flujo al que podemos trabajar (hasta 2.0 mL/min), ya que las presiones que se alcanzan ahora son más bajas.

En el primer ensayo se observó un aducto mayoritario del compuesto más 114 u.m.a,  $[M-H+114]^-$ , que podría corresponder al TFA (probablemente procedente de residuos en la columna. Se añadió ácido fórmico a la fase A para tratar de mejorar la ionización y eliminar las colas, pero no se consigue el efecto deseado. Se probó añadir TFA para tratar de desplazar toda la formación de aducto al  $[M-H+114]^-$ , pero por el contrario lo que se obtuvo fueron señales con un nivel muy alto de ruido.

Se opta por limpiar la columna y trabajar con ácido fórmico y  $NH_3$ . El programa en gradiente con el se consigue la mejor separación de los picos es el siguiente:

<b>Tiempo</b>	<b>% fase B</b>
0	2
2	2
20	100
25	2

Tabla 5. Gradiente cromatográfico.

En estas condiciones se alcanza el mejor resultado entre sensibilidad del patrón interno y resolución del doble pico del analito, como se muestra en la figura 12



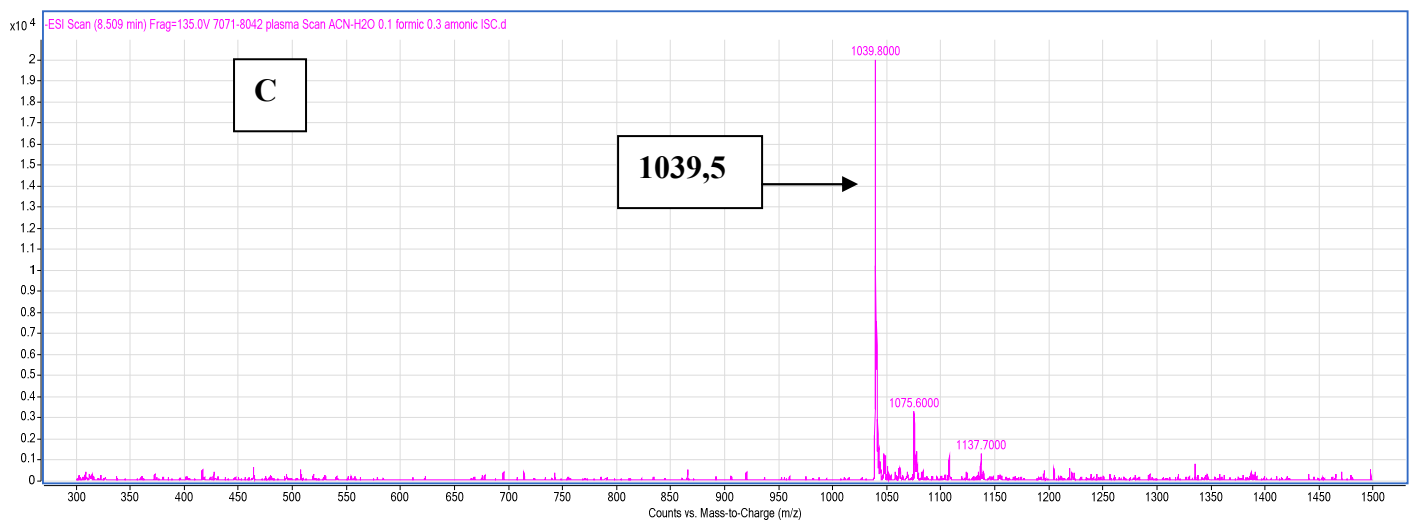
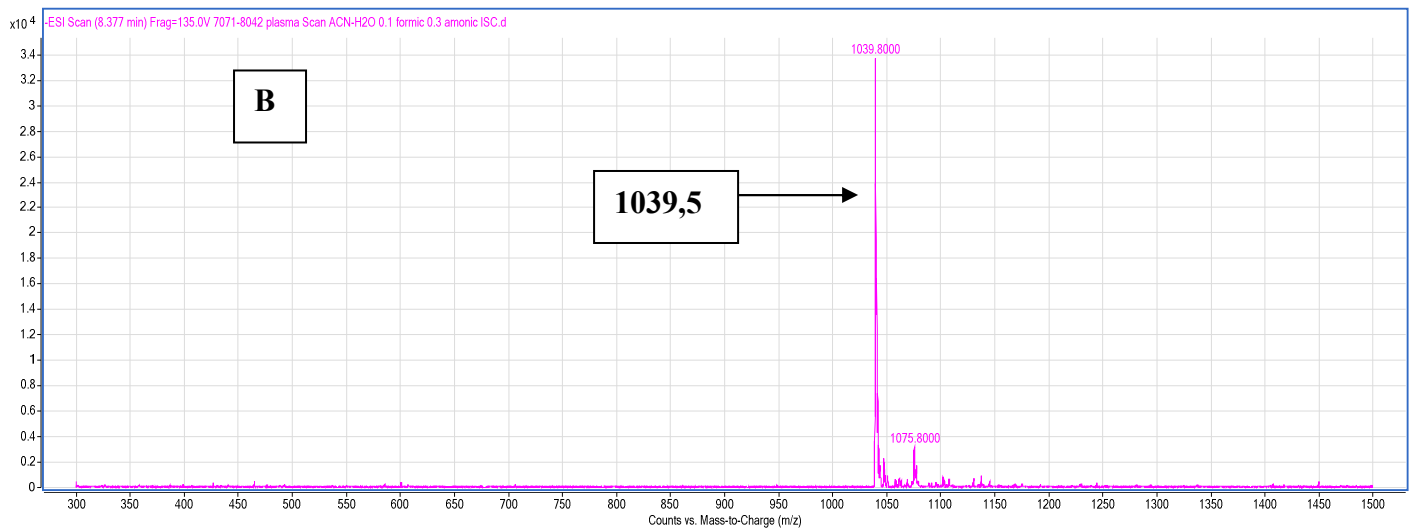
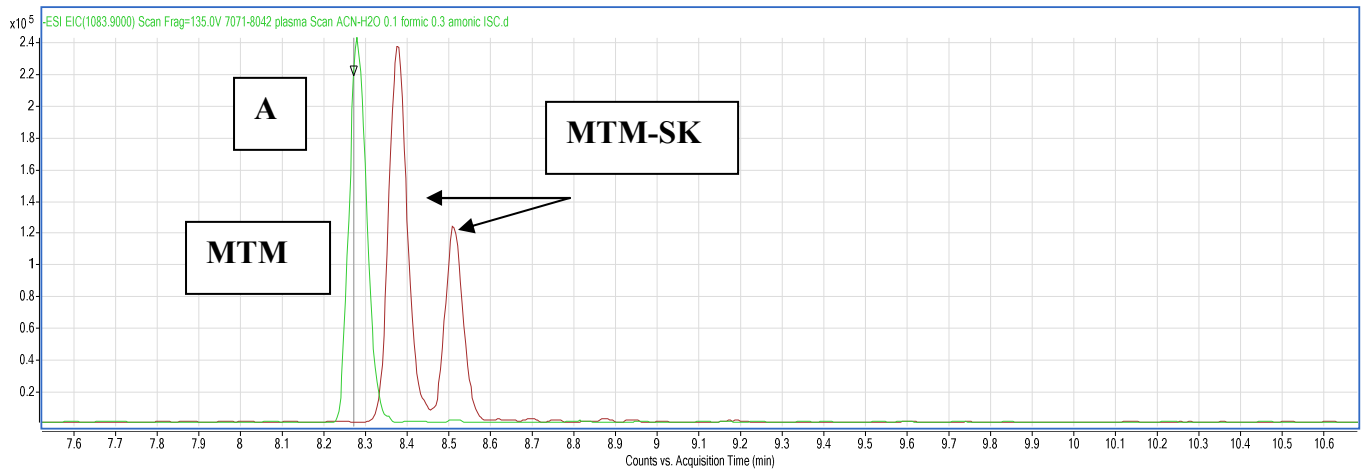


Figura 12. La cromatografía se ha optimizado para obtener picos bien definidos de la mtm-SK y la mtm. A es el cromatograma de masas donde se observan todos los picos. B corresponde al espectro de masa del primer pico de mtm-SK y C al segundo pico, lo que verifica que ambos proceden de un mismo ión precursor.

Posteriormente se lleva a cabo el Product Ion con diferentes energías de colisión y se obtiene que la energía óptima es de 70V para la MTM-SK, y de 45V para la MTM utilizada

como patrón interno. Estas energías de colisión son las que después se utilizan al analizar las muestras en modo MRM.

Las moléculas fragmentan de la siguiente manera:

MTM-SK: Ión precursor = 1039,5	Fragmentos.	→	387,2
			271,1
MTM: Ión precursor = 1083,5	Fragmentos	→	935,7
			530,1

#### *IV.4.1 Cuantificación de MTM-SK en plasma de rata ESI (-)*

Se midió en una misma secuencia los puntos del calibrado por triplicado, y las muestras tomadas de cada rata a distintos tiempos. De las muestras sólo se hizo una medida ya que en el ensayo anterior en el modo ESI (+) se observó una buena reproducibilidad. Mediante el software Mass Hunter (Agilent) se seleccionaron los picos obtenidos tras realizar las medidas en MRM y se integró el área de los mismos.

A falta de más pruebas con las que elucidar si cada pico en que se desdobra el analito es un compuesto diferente o si se produce una tautomerización por causa de las condiciones cromatográficas a pH más elevado, se consideraron ambos picos, y la concentración medida de analito como la suma de ambos picos tras integrarlos. Se obtuvieron dos rectas de calibrado, una para cada pico observado en que se desdobra el analito, que se muestran en las figuras 13 y 14.

La señal obtenida del analito se divide entre la del patrón interno, teniendo en cuenta las siguientes transiciones de ión precursor a fragmento:

Transición: MTM-SK = **1039,5-> 387,2**

MTM = **1039,5->271,1**

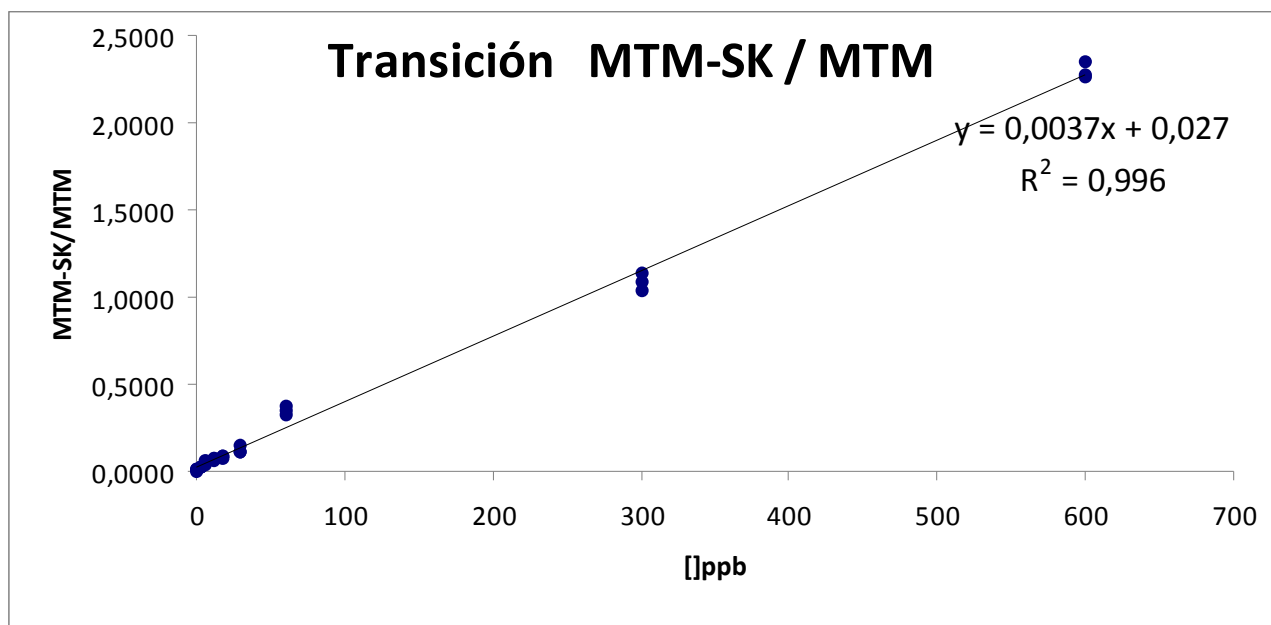


Figura 13. Recta de calibrado para el primer pico del analito.

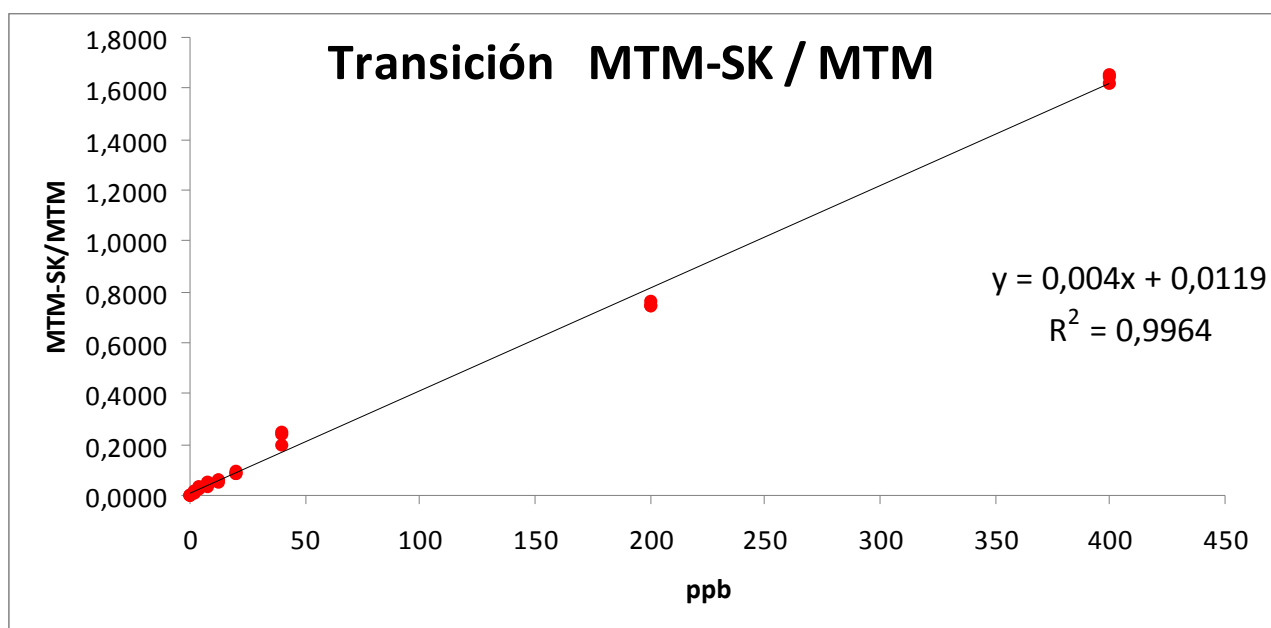


Figura 14. Recta de calibrado para el segundo pico del analito.

Ahora, interpolando en las rectas y multiplicando los valores por 5, teniendo en cuenta el factor de dilución 1/5 por la preparación de la muestra, obtenemos los valores de concentración del analito en cada pico, y hallamos la suma entre ambos picos. Estos valores se recogen en la tabla 6.

		<b>Pico 1</b>	<b>Pico 2</b>	
	<b>Tiempo (h)</b>	<b>ppb</b>	<b>ppb</b>	<b>SUMA</b>
R1-4h	4	2588,6	1172,4	3761,1
R1-6h	6	980,4	474,5	1454,8
R1-8h	8	275,6	143,9	419,4
R1-24h	24	0	5,0	5
R2-5m	0,08	6836,7	2877,4	9714,1
R2-15m	0,25	1394,4	793,7	2188,1
R2-30m	0,5	3146,3	1382,1	4528,4
R3-15	0,25	28237,6	19302,6	47540,2
R3-30	0,5	13270,1	3976,3	17246,3
R3-1h	1	28,0	5325,7	5353,7
R3-2h	2	2340,1	1007,6	3347,7
R3-4h	4	6954,1	1115,7	8069,8
R3-20h	20	2011,9	24,4	2036,4
R4-5m	0,08	10033,2	4713,1	14746,3
R4-15m	0,25	4749,0	2064,2	6813,2
R4-30m	0,5	4442,0	1751,5	6193,5
R4-1h	1	2495,9	972,3	3468,1
R4-16h	16	8,7	30,3	39,0

Tabla 6. R1-R4 indica el número de animal, y la cifra y letra que lo acompañan, el punto de muestreo siendo m = minutos y h = horas.

Analizando cada rata por separado, se observa una tendencia a disminuir la cantidad del compuesto desde el momento de la inyección, hasta casi desaparecer transcurridas varias horas. Sin embargo, existen puntos que se salen de lo que se esperaría de una cinética normal, ilustrados en la figura 15, ya que eventualmente aparecen valores a tiempos más tardíos mayores que los que les preceden, y esto no es posible.

Esto quizás sea debido al tiempo de almacenaje a  $-20^{\circ}\text{C}$  del plasma extraído, ya que desde la preparación para hacer el primer análisis hasta que se realizó la medida de todas las muestras en modo ESI (-), transcurrieron varias semanas, y se desconoce la estabilidad del compuesto en esas condiciones, por no haber sido necesario ese estudio con anterioridad. Por otro lado, durante la recolección de sangre hubo alguna dificultad técnica para extraer en alguna de las ratas, esto puede que también haya influido en la representatividad de las muestras.

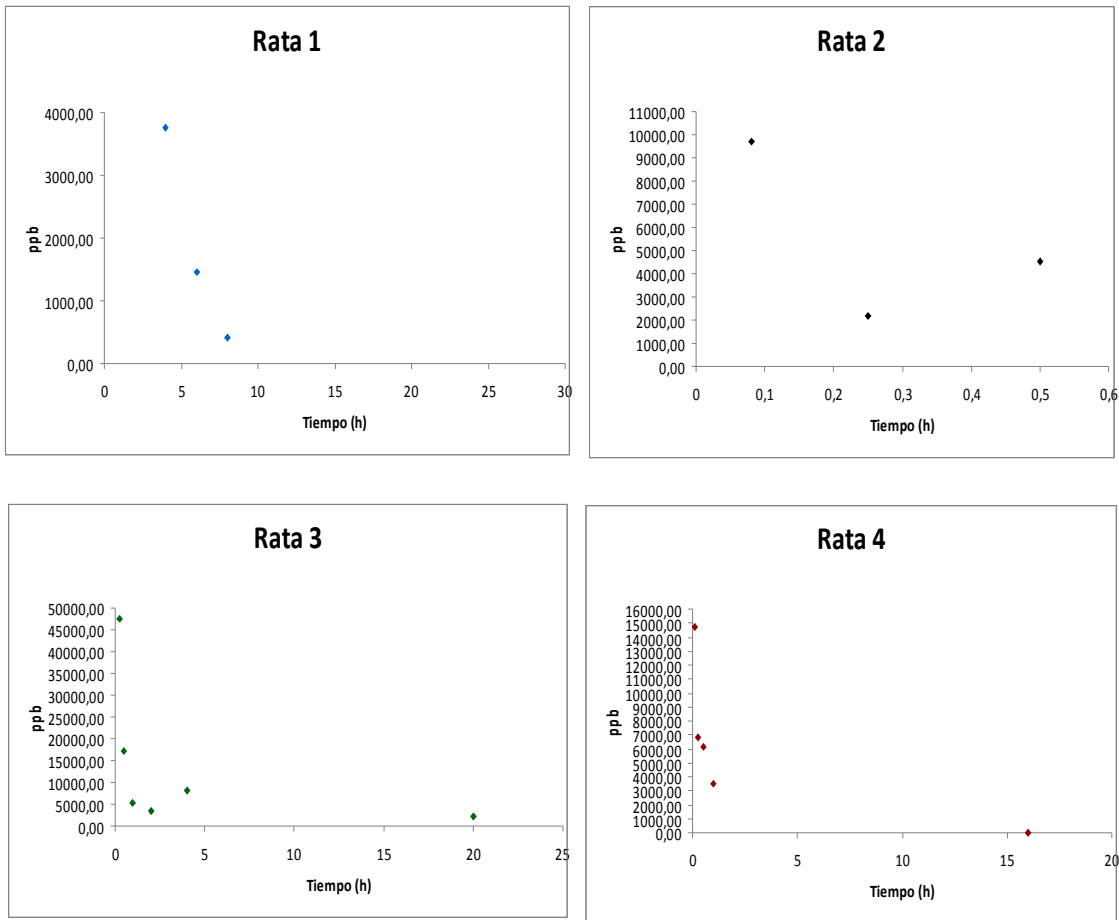


Figura 15. La concentración del compuesto tiende a bajar a lo largo del tiempo, pero algunos de los puntos no responden a dicha tendencia.

#### IV.4.2 Cálculo de los límites de detección.

Los límites de detección se calcularon mediante estimación lineal, multiplicando tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen del calibrado dividido por la pendiente.

Se tuvieron en cuenta los resultados del primer pico de la MTM-SK, y se comparó el límite de detección tomando los cocientes entre las señales de transición de masas de ión precursor a fragmentos 1 y 2 entre el analito y el patrón interno.

Los resultados fueron:

**Transición 1 = 8,7 ppb**

**Transición 2 = 12,2ppb**

Comparando estos valores con los obtenidos en las muestras de rata, podemos ver que dichas muestras presenta valores por encima de los límites de detección. En el caso de la Rata 1, a las 24 horas, obtenemos un valor por debajo de dicho límite de detección. Esto probablemente sea debido a que ya no exista compuesto en la sangre del animal en ese tiempo de análisis.

La rata 4, a las 16h, tiene un valor en el primer pico que está en el límite de detección por lo que habría que tener cuidado a la hora de dar por válido dicho resultado.

## **V. CONCLUSIONES**

## V. Conclusiones.

En el presente Trabajo Fin de Master se han realizado estudios para la puesta a punto de un método analítico, de los que se puede concluir que:

- La cuantificación de digitoxosil mitramicina sk en plasma de rata mediante HPLC-MS/MS es un método posible y válido, y se puede emplear en estudios farmacocinéticos.
- La ionización positiva es poco conveniente para este tipo de compuestos ya que da lugar a la formación de diversos aductos complicando la medida.
- Mediante la ionización negativa se puede seguir directamente el ión molecular y los fragmentos formados por este en la celda de colisión lo que resulta en una medida más segura que si utilizásemos los aductos.
- Para minimizar las desviaciones en la medida, el uso de la mitramicina es muy adecuado ya que presenta una estructura similar que se comporta de modo parecido en el detector de masas, pero que a la vez le confiere un tiempo de retención distinto aunque no demasiado alejado.
- En condiciones cromatográficas, bajo pH básico, el compuesto digitoxosil mitramicina SK parece desdoblarse en dos compuestos diferentes que bien podrían ser tautómeros ya que su masa es la misma.
- El almacenamiento de muestras de plasma en metanol, a pesar de ser a temperatura de -20°C durante un período prolongado de tiempo podría afectar a la estabilidad del compuesto y dar lugar a medidas erróneas de la concentración.



## **VI. ESTUDIOS FUTUROS**

## VI. ESTUDIOS FUTUROS.

A partir de los resultados obtenidos, se pueden plantear diversos trabajos futuros con los que seguir profundizando en este estudio:

Para poder determinar la concentración real del analito en las muestras de plasma de rata, es necesario discernir primero si los dos picos que se obtienen al analizar la muestra en ESI (-) son el mismo compuesto o no. Para ello será necesaria la separación cromatográfica de ambos pico y la recolección por separado de las fracciones de cada uno de ellos. Entonces, se deberá comprobar si cada una de las fracciones por separado se comporta desdoblándose de nuevo en dos picos, lo cual indicaría que dicha transformación es sólo producto de las condiciones de pH del método cromatográfico (por encima del nivel de pH fisiológico). De lo contrario sería necesaria la identificación de cada una de estas fracciones mediante análisis por resonancia magnética nuclear (RMN).

Una vez aclarado dicho punto, y teniendo la certeza de que el compuesto es uno sólo y no se transforma en otro, se podría abordar otro aspecto: la cuantificación precisa del compuesto. Para cuantificar con mayor precisión existe la posibilidad de emplear la técnica de IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), consistente en la combustión total del analito a CO<sub>2</sub> y el análisis de carbono mediante un detector de masas utilizando CO<sub>2</sub> marcado como referencia. Así se podría medir la pureza exacta del compuesto antes de ser ensayado en los animales, y a partir de ese valor calcular la concentración exacta medida en LC-MS/MS.

Otro aspecto a determinar sería la cantidad de compuesto que se recupera de la muestra tras extraer el plasma de la sangre y precipitar las proteínas por el método del metanol. Para ello sería necesario tomar una muestra de sangre de una rata control sin tratar y añadirle una cantidad conocida del analito, para después tratar la muestra por el procedimiento establecido y cuantificarla. La diferencia obtenida será el rendimiento del método y se deberá aplicar a las medidas en posteriores muestras reales.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Lombó F, Menéndez N, Salas JA, Méndez C. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006** Nov;73(1):1-14.
- 2) Grundy WE, Goldstein AW, Rickher JC, Hanes ME, Warren HB, Sylvester JC (1953) Aureolic acid, a new antibiotic. I. Microbiological studies. *Antimicrob Chemother* 3:1215–1221
- 3) Sensi P, Greco AM, Pagani H *Antibiot Chemother* (1958) 8:241–244
- 4) Rao KV, Cullen WP, Sobin BA *Antibiot Chemother* (1962) 12:182–186
- 5) Núñez LE, Nybo SE, González-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, Braña AF, Shaaban KA, He M, Morís F, Salas JA, Rohr J, Méndez C. *J Med Chem.* (2012) Jun 28;55(12):5813-25. Epub 2012 Jun 7.
- 6) Darnell, J. E. Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, 2,740-749.
- 7) Germain, D.; Frank, D. A. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13,5665-5669.
- 8) Page, B.D.; Ball, D. P.; Gunning, P. T. Signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2011**, 21, 65-83.
- 9) Malek A, Núñez L-E, Magistri M, Brambilla L, Jovic S, et al. (2012) *PLoS ONE* 7(4): e35130. doi:10.1371/journal.pone.0035130
- 10) Niessen, W.F.A. “Liquid Chromatography–Mass Spectrometry.” Third Edition. **2006**. CRC Press. Taylor and Group. Estados Unidos.
- 11) Arpino, P. *Mass Spectrometry Reviews*, Vol 11, **1992** pp 3-40.
- 12) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. (1989). *Science* 246 (4926): 64–71.

- 13) Ardrey, R.E. "Liquid Chromatography – Mass spectrometry: An Introduction"  
(2003) John Wiley and Sons, Ltd. Inglaterra.
- 14) Harris, Daniel C., Análisis químico cuantitativo. W.H. Freeman & Company  
(2003)
- 15) Skoog, Holler, Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw Hill, (2001)