



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS DE  
MUESTRAS DE PLASMA PARA ELIMINAR  
PROTEÍNAS Y CUANTIFICAR CURCUMINA POR  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**VICTOR HUGO SANTIAGO RIOS**

**ASESOR:**

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO.**

**COASESOR:**

**D.A.R. JUAN JOSÉ DÍAZ ESQUIVEL**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación de tratamientos de muestras de plasma para eliminar proteínas y cuantificar Curcumina por espectrometría de masas

Que presenta el pasante: Victor Hugo Santiago Rios  
Con número de cuenta: 304237209 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de septiembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dr. José Juan Escobar Chávez	
SECRETARIO	M. en C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
1er. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HML/a/c

## Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Marco Teórico.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Curcumina.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Generalidades.....	3
2.1.2. Las propiedades físicas y moleculares de la curcumina.....	3
2.1.3. Monografía de la Curcumina.....	4
<b>2.2. La Sangre.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Generalidades.....	5
2.2.2. Componentes de la sangre.....	5
<b>2.3. Componentes del plasma que afectan la lectura de analitos en Espectrometría de masas.....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Fosfolípidos endógenos.....	8
2.3.2. La Supresión de Iones.....	9
2.3.3. Efectos de la matriz en la respuesta del Detector de Masas.....	11
2.3.3.1. La Hemolisis.....	12
<b>2.4. Tratamientos para separación de proteínas plasmáticas en la cuantificación de fármacos (curcumina).....</b>	<b>14</b>
2.4.1. Precipitación de Proteínas.....	14
2.4.2. Extracción líquido-líquido.....	15
2.4.3. Extracción en Fase sólida.....	15
<b>2.5. Espectrometría de Masas.....</b>	<b>16</b>
2.5.1. Generalidades.....	16
2.5.2. Fundamento de la Espectrometría de Masas.....	17
2.5.3. Componentes del Espectrómetro de Masa.....	17
2.5.4. Introducción de la muestra.....	18
2.5.5. Fuentes de ionización.....	20
2.5.6. Analizadores de Masas.....	28
2.5.7. Cuidados y limpieza del espectrómetro de masas.....	31
2.5.8. Requerimientos de las muestras a introducir a un sistema cromatográfico acoplado a un detector de espectrometría de masas.....	37
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>39</b>

3.1. Objetivo General:.....	39
3.2. Objetivos Particulares:.....	39
4. Hipótesis.....	39
5. Plan de Trabajo.....	40
5.1. Diagrama de Flujo.....	40
6. Materiales y Metodología.....	41
6.1. Materiales, Equipos e instrumentos. ....	41
6.2. Obtención del plasma de perro. ....	43
6.3. Definición de Condiciones de trabajo para la Cuantificación de Curcumina por Espectrometría de Masas.....	44
6.3.1 Ionización.....	44
6.3.2. Las condiciones cromatográficas .....	44
6.4. Tratamientos de Extracción de Curcumina en muestras plasmáticas para la cuantificación por espectrometría de masas. ....	45
6.5. Estándar Interno. ....	49
6.6. Supresión Iónica.....	50
6.7. Efecto de matriz.....	50
7. Resultados.....	51
7.1. Cromatogramas de los Diferentes Tratamientos.....	51
7.2. Evaluación de los Tratamientos para la extracción de curcumina en plasma.....	55
7.2.1. Evaluación del procedimiento de las diferentes técnicas de tratamiento.....	55
7.2.2. Preparación de una Solución Diluyente.....	55
7.2.3. Determinación de proteínas en muestras plasmáticas por método espectrofotométrico.....	58
7.2.4. Evaluación de temperatura para la Técnica de Extracción Líquido-Líquido. ....	58
7.3. Elección de la Técnica para la extracción de Curcumina en muestras plasmáticas.....	61
7.4. Estándar Interno (EI). ....	70
7.4.2. Elección del Estándar Interno.....	74

<b>7.5. Optimización de la Técnica de Extracción Líquido-Líquido con Cloroformo y el Estándar Interno.....</b>	<b>76</b>
<b>7.6. Supresión iónica.....</b>	<b>78</b>
7.6.1. Inyección de la Curcumina y del Estándar Interno. ....	79
7.6.2. Evaluación de la supresión de iones con EDTA. ....	80
7.6.3. Evaluación de la supresión de iones con Heparina.....	82
<b>7.7. Efecto de la matriz.....</b>	<b>84</b>
7.7.1. Plasma sin hemolisis.....	84
7.7.2. Plasma semi hemolizado.....	86
7.7.3. Plasma hemolizado.....	87
7.7.4. Factor Matriz Normalizado. ....	89
<b>8. Análisis de resultados y discusión.....</b>	<b>90</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>96</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>97</b>

## Índice de Tablas.

Tabla 1. Características y almacenamiento de hemoderivados. ....	7
Tabla 2. Técnicas de ionización más habitualmente empleadas en los acoplamientos GC y LC.....	27
Tabla 3. Mantenimiento del Espectrómetro de Masas.....	34
Tabla 4. Elementos Expuestos a Eluyentes. ....	35
Tabla 5. Sustancias Químicas. ....	41
Tabla 6. Reactivos. ....	41
Tabla 7. Materiales.....	42
Tabla 8. Equipos.....	42
Tabla 9. Parámetro de fragmentación del ion de Curcumina.....	44
Tabla 10. Características de los Patrones Internos. ....	49
Tabla 11. Evaluación del procedimiento de las técnicas para separación de proteínas.....	55
Tabla 12. Determinación del cociente de absorbancias para las técnicas de Precipitación de Proteínas y Extracción líquido-líquido.....	58
Tabla 13. Evaluación del tiempo y la temperatura con respecto al porcentaje recuperado. ....	59
Tabla 14. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Precipitación de Proteínas con Acetonitrilo. ....	68
Tabla 15. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Precipitación de Proteínas con Acetona. ....	68
Tabla 16. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Extracción Líquido- Líquido con Cloroformo.....	68
Tabla 17. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Extracción Líquido- Líquido con Acetato de Etilo. ....	69
Tabla 18. Resumen de los resultados de las diferentes Técnicas para la extracción de curcumina.....	69
Tabla 19. Características cromatográficas de los Estándares Internos. ....	74
Tabla 20. Curva de calibración de Malatonina con adición de curcumina (100 ng/mL).....	75



<b>Tabla 21. Curva que evalúa la Técnica de Extracción líquido-líquido con cloroformo.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 22. Efecto de la matriz en la técnica de Extracción líquido-líquido con Cloroformo. ....</b>	<b>89</b>

## Índice de Figuras.

Figura 1. Componentes de la Sangre.....	7
Figura 2. Estructuras para Glicerofosfolinas.....	8
Figura 3. Escala utilizada para medir el grado de hemólisis en muestras de plasma. ....	13
Figura 4. Una réplica del tercer espectrómetro de masas de Aston. ....	17
Figura 5. Componentes de un Espectrómetro de Masas. ....	18
Figura 6. Sonda de introducción directa. ....	19
Figura 7. Esquema de una fuente de Ionización Electrónica.....	22
Figura 8. Cono de Taylor.....	24
Figura 9. Reducción de tamaño de gota en Ionización por Electrospray.....	25
Figura 10. Esquema de una fuente de Ionización por Electrospray.....	26
Figura 11. Esquema de una fuente de Ionización a Presión Atmosférica. ....	26
Figura 12. Analizador de masas de Cuadrupolo ( <i>quadrupole</i> ). ....	29
Figura 13. Analizador de masas Trampa de iones ( <i>ion-trap</i> ). ....	30
Figura 14. Analizador de masas de Tiempo de Vuelo ( <i>time-of-flight, TOF</i> ). ...	31
Figura 15. Espectrómetro de masas TQ Xevo de Waters.....	32
Figura 16. Sistema ACQUITY Espectrómetro de masas TQ Xevo UPLC/MS de Waters.....	32
Figura 17. Diagrama de flujo de las actividades implicadas en el trabajo.....	40
Figura 18. Condiciones de trabajo para la técnica de Extracción Líquido-Líquido.....	46
Figura 19. Condiciones de trabajo para la técnica de Precipitación de Proteínas. ....	47
Figura 20. Condiciones de trabajo para la técnica Extracción en Fase Sólida. ....	48
Figura 21. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con metanol.....	51
Figura 22. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con Acetronitilo. ....	51

Figura 23. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con acetona fría (-20°C).....	52
Figura 24. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo. ....	52
Figura 25. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Cloroformo. ....	53
Figura 26. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo/n-propanol.	53
Figura 27. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Diclorometano. ....	54
Figura 28. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción fase sólida. ....	54
Figura 29. Espectro de masas que muestra la respuesta del Ión Padre que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio de disolución metanol. ....	56
Figura 30. Espectro de masas que muestra la respuesta del Ión Hijo que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio de disolución metanol. ....	56
Figura 31. Espectro de masas que muestra la respuesta del Ión Padre que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente). ....	57
Figura 32. Espectro de masas que muestra la respuesta del Ión Hijo que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente). ....	57
Figura 33. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 50°C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo. ....	59
Figura 34. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 70°C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo. ....	60

Figura 35Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 79 <sup>o</sup> C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.....	60
Figura 37. Procedimiento para la Inyección del Estándar de Curcumina.....	61
Figura 36. Inyección del Estándar de Curcumina. ....	61
Figura 38. Procedimiento para la Inyección del Sistema Blanco del Plasma.	62
Figura 39. Procedimiento para la Inyección del Sistema Blanco. ....	62
Figura 40. Procedimiento para de Técnica de Precipitación de Proteínas. ....	63
Figura 41. Procedimiento para de Técnica de Extracción Líquido-Líquido...	64
Figura 42. Cromatograma del Sistema blanco para la técnica extracción Líquido-Líquido.....	65
Figura 43. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica extracción Líquido-Líquido con cloroformo. ....	65
Figura 44. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo. ....	66
Figura 45. Cromatograma del Sistema blanco para la técnica Precipitación de Proteínas. ....	66
Figura 46. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica Precipitación de Proteínas con Acetonitrilo. ....	67
Figura 47. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica Precipitación de Proteínas con Acetona Fría (-20 <sup>o</sup> C).....	67
Figura 48. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre del clorhidrato de propafenona empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente). ....	70
Figura 49. Cromatograma que muestra el tiempo de retención del clorhidrato de propafenona.....	71
Figura 50. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre de Clopidogrel bisulfato empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente). ....	71
Figura 51. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Clopidogrel bisulfato.....	72

Figura 52. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre del Tramadol empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).....	72
Figura 53. Cromatograma que muestra el tiempo de retención del Tramadol. .....	73
Figura 54. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre de Melatonina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).....	73
Figura 55. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Melatonina. .....	74
Figura 56. Sistema de secado de las muestras.....	75
Figura 57. Optimización de la Técnica de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.....	77
Figura 58. Cantidad adicionado de curcumina en función de la cantidad recuperada de curcumina contenido en los placebos cargados de plasma. .	78
Figura 59. Cromatograma del Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.....	79
Figura 60. Cromatograma del Estándar de Curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente. ....	79
Figura 61. Cromatograma del Estándar de Curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente. ....	80
Figura 62. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA.....	80
Figura 63. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente.....	81
Figura 64. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente. ....	81
Figura 65. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo Clopidogrel a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.....	81
Figura 66. Espectro de masa que muestra la respuesta del plasma con EDTA infundiendo Clopidogrel a una concentración de 40 ng/mL.....	82
Figura 67. Cromatograma del Blanco de plasma con Heparina. ....	82

<b>Figura 68. Blanco de plasma con Heparina infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 69. Blanco de plasma con Heparina infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 70. Blanco de plasma con Heparina infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 71. Espectro de masas que muestra la respuesta del plasma con Heparina infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 72. Cromatograma del Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 73. Cromatograma del Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 74. Cromatograma Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 75. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma sin presencia de hemolisis.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 76. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolisado infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 77. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolisado infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 78. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 79. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma semi hemolizado.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 80. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 81. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 82. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.....</b>	<b>88</b>

**Figura 83. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma hemolizado..... 88**

## Introducción.

En el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) se desarrollaron nanopartículas para mejorar la biodisponibilidad de la curcumina, la curcumina se ha utilizado en todo el mundo en la conservación de alimentos y en productos cosméticos.<sup>(1)</sup> En cuanto al potencial terapéutico, el rizoma seco y el polvo de la cúrcuma se ha utilizado como medicina doméstica desde tiempos antiguos: sus propiedades curativas y antiinflamatorias, incluso se describen en los libros sagrados de Ayurveda.<sup>(2)</sup> (Ayurveda es un sistema basado en el conocimiento de la medicina donde se describen metodologías y únicas formulaciones de fármacos para el cuidado de la salud y la vida humana<sup>(3)</sup>).

Debido a la baja biodisponibilidad de la curcumina en plasma es necesario contar con un equipo que nos permita cuantificar cantidades pequeñas. La Espectrometría de Masas de alta resolución (HR- MS) se ha convertido en el enfoque actual para hacer frente a algunos retos planteados en los métodos bioanalíticos.<sup>(4)</sup>

En particular, la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF/MS) y más recientemente, trampa de iones con cuadrupolo en lineal (TQ-MS/MS), ambos acoplados a la cromatografía líquida, han demostrado ser eficiente para la investigación metabolómica. El análisis cualitativo que corresponde a exigir medidas de la masa y la composición elemental, son fundamentales para una caracterización de pequeñas sustancias farmacológicamente activas.<sup>(5)</sup>

Sin embargo la Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC MS/MS) no está exenta de problemas y a diferencia de los inmunoensayos directos, los métodos LC-MS/MS requieren de la extracción de proteínas y, preferiblemente, de otras sustancias que interfieren en la muestra antes de un análisis.<sup>(6)</sup>

Las proteínas pueden causar bloqueos en el equipo y sus componentes así como también efectos de la matriz de la muestra, lo cual puede tener efectos nocivos en el análisis. Los efectos de la matriz son debidos principalmente a las sales y los fosfolípidos que pueden alterar la eficacia de ionización.<sup>(6)</sup> Mientras que las sales son relativamente fáciles de eliminar, los fosfolípidos

provocan más de un problema, incluso con sofisticados procedimientos de limpieza de la muestra.<sup>(6)</sup>

Por lo que se llevo a cabo en el LEDEFAR la optimización de tratamientos de muestras más eficientes para la limpieza de la matriz, entre los cuales están precipitación de proteína (PP), extracción en fase sólida (EFS) y la extracción líquido-líquido (ELL), con la finalidad de evitar interferencias provocadas por los componentes del plasma que puedan influir negativamente en la cuantificación del analito y de algunos parámetros de validación de métodos bioanalíticos, así también prolongar la vida útil de la columna.

## Marco Teórico.

### 2.1. Curcumina

#### 2.1.1. Generalidades.

La curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) es un pigmento amarillo natural aislado originalmente de la cúrcuma (*Cúrcuma longa* L.), un rizoma utilizado en la India durante siglos como una especia y agente medicinal. Posee una amplia gama de propiedades farmacológicas.<sup>(2)</sup> Anti-oxidante, antiinflamatorio, y propiedades antidepresivas. La curcumina también ha sido reportada para mejorar la cicatrización de heridas. El uso de la curcumina como una nueva sustancia química natural prometedora para la quimioprevención y la quimioterapia del cáncer ha sido ampliamente estudiada en los últimos años.<sup>(7)</sup>

Sin embargo, la aplicación clínica de la curcumina es limitada debido a su pobre biodisponibilidad por su baja solubilidad en agua y mala absorción.<sup>(8)</sup>

No obstante la escasa solubilidad en agua (0.0004 mg/mL a pH 7.3) y baja biodisponibilidad de la curcumina puede ser superado mediante la aplicación de enfoque de entrega basado en la nanotecnología.<sup>(9)</sup>

#### 2.1.2. Las propiedades físicas y moleculares de la curcumina.

La curcumina existe como un polvo de color amarillo brillante. El polvo extraído contiene típicamente aproximadamente un 75% de curcumina en adición a los derivados del compuesto original en forma de otros curcuminoides; 16% demetoxicurcumina (DMC), y 8% bisdemetoxicurcumina (BDMC).<sup>(10)</sup>

La molécula es lipofílica que consta de dos anillos aromáticos conectados por dos grupos carbonilos insaturados y, por tanto, tiene poca solubilidad en agua. La curcumina es fotosensible.<sup>(10)</sup>

La curcumina es inestable en condiciones alcalinas y se degrada en menos de 30 min. Bajo condiciones ácidas, la velocidad de descomposición se reduce significativamente, menos del 20 % de la curcumina total es degradada en 1h.

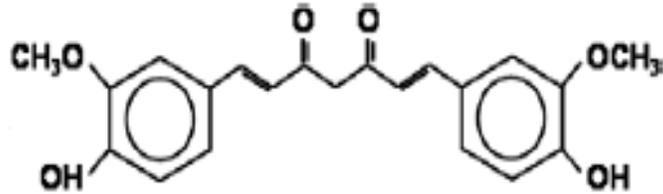
Esto puede explicar porque la curcumina parece ser estable dentro del tracto gastrointestinal en donde el intervalo de pH es 1-6.<sup>(10)</sup>

### 2.1.3. Monografía de la Curcumina.

Biodisponibilidad	Los estudios <i>in vivo</i> reportan una biodisponibilidad sistémica limitada de curcuminoides, con la mayor parte de la dosis oral excretada en las heces y las dosis intravenosas e intraperitoneales son excretadas en la bilis. La biodisponibilidad de la curcumina puede ser aumentada <i>in vivo</i> de diez veces con el uso de nanopartículas. <sup>(10)</sup>
Toxicidad	Poca toxicidad demostrable se observa <i>in vivo</i> en dosis de hasta 5 g / kg. <sup>(10)</sup>
Color	Polvo de color amarillo- naranja. <sup>(11)</sup>
Solubilidad	Escasa solubilidad en agua (0.0004 mg/ml a pH 7.3) <sup>(9)</sup> y éter, pero soluble en etanol, dimetilsulfóxido, y acetona. <sup>(11)</sup>
Punto de Fusión	183 °C. <sup>(11)</sup>
Fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> . <sup>(11)</sup>
Peso molecular	368.37 g /mol. <sup>(11)</sup>
Espectrofotometría	La máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ) en metanol se produce a 430 nm y en acetona entre 415-420 nm. Una solución al 1 % de curcumina presenta 1.65 unidades de absorbancia. <sup>(11)</sup>
Estabilidad a pH	La curcumina presenta un tono amarillo brillante entre un pH

de 2.5 a 7 y rojo a pH > 7. Es estable a pH ácido, pero inestable a pH neutro y básico.<sup>(11)</sup>

Estructura química  
de la Curcumina



## 2.2. La Sangre.

### 2.2.1. Generalidades

La sangre es un tejido con características particulares. Como tal, puede ser extraída del organismo y de ella se puede separar una gran cantidad de componentes.<sup>(12)</sup>

Es la muestra biológica de elección en general para detectar sustancias tóxicas y para realizar análisis cuantitativos. Las muestras deben ser obtenidas de vasos periféricos; de donde se obtienen los resultados más representativos de las concentraciones de cualquier sustancia, que en particular pueden ser detectadas en este fluido corporal.<sup>(13)</sup>

En general, para preservar las muestras de sangre se utilizan anticoagulantes particulares para cada análisis. Las muestras deben ser agitadas suavemente pero uniformemente para permitir la homogenización y adecuada mezcla con las sustancias preservantes.<sup>(13)</sup>

En general un perro puede donar 450mL de sangre.

### 2.2.2. Componentes de la sangre.

La sangre está formada por una parte líquida, el plasma (aproximadamente el 60%), y por una parte sólida (aprox. el 40%), formada por los eritrocitos, leucocitos y plaquetas (figura 1).<sup>(14)</sup>

## I. Parte sólida.

**Glóbulos Rojos:** Los glóbulos rojos o eritrocitos son responsables del transporte del oxígeno y dióxido de carbono.<sup>(15)</sup>

**Glóbulos blancos:** Los glóbulos blancos (o leucocitos) llevan a cabo los mecanismos de defensa del organismo contra infecciones.<sup>(15)</sup>

**Plaquetas:** Las plaquetas intervienen en el proceso de coagulación sanguínea y otras alteraciones.<sup>(15)</sup>

## II. El plasma.

El plasma del hombre, perro, caballo y buey; tiene la característica de ser un líquido homogéneo, incoloro o muy poco amarillento y algo viscoso.<sup>(16)</sup>

El pH del plasma de los perros es de 7.4.<sup>(17)</sup>

El plasma es un líquido compuesto en más del 90% por agua, que tiene la función de disolvente y medio de transporte. El resto del plasma está formado por proteínas plasmáticas, lípidos, glúcidos, sales minerales y otras sustancias disueltas.<sup>(12, 14)</sup>

**Proteínas:** Entre las proteínas plasmáticas encontramos la albumina (54%), sintetizadas en el hígado. Sus principales funciones son el transporte de ciertas sustancias y regular el volumen de sangre.<sup>(12, 14)</sup>

Otra de las proteínas importantes que encontramos son las globulinas (38%)

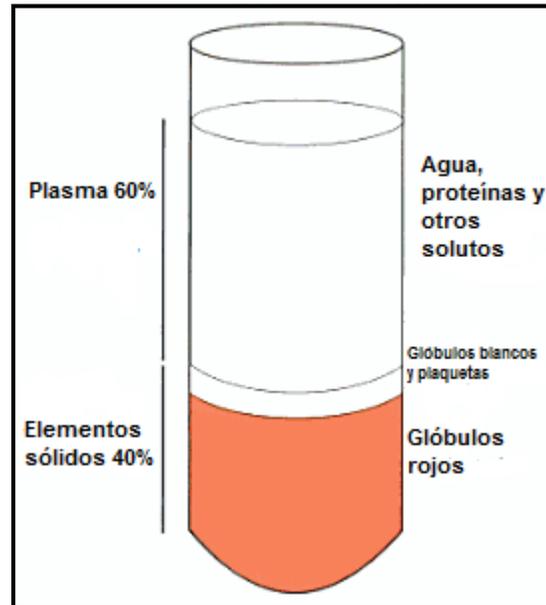
El fibrinógeno y los factores de coagulación son muy importantes en los procesos de reparación y de coagulación de la sangre.<sup>(12, 14)</sup>

**Productos de desecho:** El cuerpo tiene constantes procesos de fabricación y de degradación de sustancias como, por ejemplo, de proteínas.<sup>(14)</sup>

Los productos de las degradaciones son transportados hacia los órganos encargados de su expulsión o transformación.<sup>(14)</sup>

**Nutrientes:** La sangre es encargada de llevarlos a las células para que puedan nutrirse, repararse, obtener energía.<sup>(14)</sup>

**Electrolitos:** Se obtienen principalmente de las sales en nuestra dieta. Su función principal es mantener el equilibrio hidroelectrónico entre el medio y las células.<sup>(14)</sup>



**Figura 1. Componentes de la Sangre.**

En la tabla 1 se muestran los hemoderivados y algunos componentes que se pueden encontrar en algunos rangos de temperaturas.

**Tabla 1. Características y almacenamiento de hemoderivados.**<sup>(18)</sup>

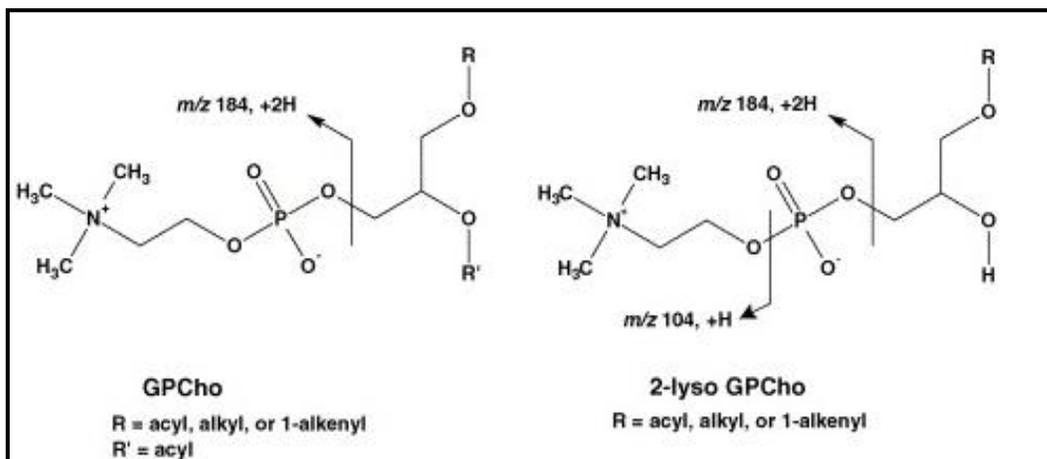
<b>Hemoderivados</b>	<b>Características</b>	<b>Almacenamiento</b>
<b>Sangre Completa</b>	Todos los componentes de la sangre	
<b>Sangre completa almacenada</b>	Se deterioran la función plaquetaria y los factores de coagulación	Se refrigera de 1°C a -6°C
<b>Plasma fresco</b>	Contiene albúmina, inmunoglobulinas, factores e inhibidores de la coagulación.	Se separa antes de 4 horas y se usa antes de 24 horas.
<b>Plasma almacenado</b>	Menor concentración de factores funcionales	Se refrigera de 1°C a -6°C
<b>Plasma congelado</b>	Carece de factores V, VII. Concentración adecuada de factores dependientes de la vitamina K, albúmina e inmunoglobulinas.	Se almacena en congelación de -20°C a -24°C

## 2.3. Componentes del plasma que afectan la lectura de analitos en Espectrometría de masas.

### 2.3.1. Fosfolípidos endógenos.

Los Fosfolípidos endógenos que están presentes en altas concentraciones en matrices biológicas, tales como en el plasma y que se han implicado en la causa de la supresión de iones.<sup>(19)</sup>

Hay una amplia variedad de Glicerofosfocolinas (GPCho) encontradas en el plasma (ratón, rata, conejo, perro, mono, y humano). El alquilo de lípidos, acilo, y éster de 1-alquenilo, tienen longitudes de cadena que puede variar desde 16 hasta 22 átomos de carbono y contienen de 0 a 6 sitios de insaturación (figura 2).<sup>(20)</sup>



**Figura 2. Estructuras para Glicerofosfocolinas.**

Los fosfolípidos son extremadamente abundantes en las membranas biológicas y se forman a partir de glicerol (fosfoglicéridos) o esfingosina (esfingomielinas). Los fosfoglicéridos se componen de glicerol, una o dos cadenas de éster de ácidos grasos, y un alcohol fosforilado; mientras que la esfingomielina se compone de esfingosina, una amida de ácido graso enlazado, y una fosfatidilcolina.<sup>(20)</sup>

Algunos investigadores han descrito la supresión de iones como un fenómeno que tiene efecto en la desolvatación o como resultado de la competencia por un

exceso de cargas en la superficie de la gotita. Bradamante (1990) caracterizó la composición de fosfolípidos de plasma. Las Glicerofosocolinas (GPCho) representan casi el 70% (expresado en % en moles de fósforo) de los fosfolípidos plasmáticos totales y los Lisofosfolípidos representan casi el 10 % del total de fosfolípidos.<sup>(19-21)</sup>

Algunas investigaciones de los efectos de la matriz actuales indican que estos fosfolípidos plasmáticos residuales son una fuente importante en la supresión de iones e identificaron fosfolípidos específicos que causan los efectos de la matriz. La Fosfatidilcolina contiene fosfolípidos que consisten tanto en un grupo de cabeza polar, que contiene un grupo fosfato cargado negativamente y un grupo amina cuaternaria con carga positiva, y uno o dos alquilo de cadena larga (s). El grupo de cabeza polar imparte fuerte carácter iónico a los fosfolípidos, mientras que las cadenas de alquilo largas los hacen extremadamente hidrofóbicos. Analitos no polares, corren un riesgo significativo de co-elución con estos fosfolípidos. Además, los fosfolípidos residuales, si no eluyen totalmente de la columna analítica, pueden acumularse en la columna y reducir significativamente la duración de la columna.<sup>(19)</sup>

Se han reportado estudios donde los fosfolípidos podrían eluir en una amplia gama de tiempos de retención y tenido efecto significativo en la matriz cuando coeluyen con el analito de interés. Por lo tanto, la columna analítica no siempre puede separar el analito de interferencias con el fin de evitar la supresión de iones. La eliminación de los fosfolípidos mediante el tratamiento de las muestras se convierte en una fase alternativa y crítica hacia la superación de iones y el efecto de la matriz.<sup>(21)</sup>

### **2.3.2. La Supresión de Iones.**

Un reto fundamental en la espectrometría de masas es la producción de iones en fase gaseosa, la producción de estos iones en fase gaseosa pueden dificultar el análisis por espectrometría de masas de ciertas de moléculas.<sup>(22)</sup>

La supresión de iones resulta en la reducción esporádica de la intensidad de la señal.<sup>(23)</sup> Diferentes muestras de plasma de la misma especie pueden producir

diversos efectos en las curvas de calibración y afectan la pendiente de la curva estándar y la precisión.<sup>(19)</sup> En consecuencia, el Límite inferior de cuantificación para los métodos bioanalíticos altamente sensibles podría ser difícil de lograr.<sup>(23, 24)</sup>

Las reacciones que ocurren durante la producción de iones en fase gaseosa pueden conducir a la pérdida de carga neta en el analito, probablemente este proceso no sea el más importante implicado en la supresión de la ionización, esto se debe a los cambios en las propiedades de las gotitas de la solución producidas por la presencia de solutos no volátiles<sup>(25)</sup> y a la falta de selectividad (coelución de compuestos endógenos, tales como lípidos, fosfolípidos, ácidos grasos)<sup>(19, 26)</sup> considerados como la principal causa de la supresión de la ionización en ionización por electrospray (ESI) de extractos biológicos.<sup>(25)</sup>

En la Fase móvil aditivos tales como trietilamina (TEA) y ácido trifluoroacético (TFA) también pueden conducir a la supresión de iones en aplicaciones de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. La trietilamina y el ácido trifluoroacético se utilizan a menudo para reducir el pico de colas en cromatografía líquida. Iones de supresión de trietilamina tiene lugar a través de la formación de un complejo con el analito con carga positiva, que conduce a un efecto de enmascaramiento. El uso de otros reactivos tales como el ácido fórmico, el ácido acético, el uso de TFA en conjunción con acetato de amonio 10 mM, o adición de 1 % de ácido propiónico a la fase móvil puede resolver este problema.<sup>(27)</sup>

King, R. (2000) evaluó la hipótesis de que la supresión de la ionización se debe a la presencia de soluto no volátil en solución con el analito, usando acetato de amonio como un soluto volátil, un aditivo común de fase móvil en cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas que no causa la supresión de ionización significativa, y sulfato de amonio como un soluto no volátil, una sal que causa la supresión de ionización significativa. Observando que el sulfato de amonio un soluto no volátil podría ser responsable de la supresión de iones en la ionización por electrospray.<sup>(25)</sup>

El material no volátil puede precipitar a medida que se evapora el disolvente y llevar analito en el precipitado como una impureza.<sup>(25)</sup>

Aunque disolventes y componentes de la fase móvil pueden causar supresión de iones, su impacto es relativamente insignificante en comparación con la supresión

de iones generados por la presencia de materiales endógenos en muestras biológicas, es decir, efectos de matriz.<sup>(28)</sup>

Es probable observar una supresión de iones en Ionización por Electrospray debido los fosfolípidos endógenos que han sido identificados como una fuente importante de los efectos de la matriz, es importante considerar la limpieza general de extractos de la muestra, lo que se refiere a la reducción de la concentración de material endógeno que puede depositarse sobre una columna analítica, que puede influir negativamente en la robustez del ensayo, minimizar el tiempo de vida de la columna y esto exige un mayor mantenimiento del espectrómetro de masa.<sup>(19)</sup>

### **2.3.3. Efectos de la matriz en la respuesta del Detector de Masas.**

Efectos de la matriz “se pueden describir como la diferencia entre la respuesta de espectrometría de masas para un analito en la solución estándar y la respuesta para el mismo analito en una matriz biológica, tal como el plasma”.<sup>(19, 29, 30)</sup>

Efectos de la matriz pueden por lo tanto limitar la utilidad de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas para el análisis cuantitativo, que incluye la supresión o mejora de iones, disminución o aumento de la sensibilidad de analito con el tiempo, el aumento de línea de base, la imprecisión de los resultados.<sup>(29, 30)</sup>

Efectos de la matriz también pueden ser causados por la elección de recipiente de almacenamiento de muestras y anticoagulante. Bakhtiar, R. (2007) realizó algunos estudios que han demostrado que Li-heparina se debe evitar para muestras de plasma que requieren de un análisis por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. Se recomienda un estudio inicial de la marca de envases plásticos y anticoagulantes, antes del desarrollo del ensayo. En el laboratorio, a menudo se utiliza EDTA de sodio como anticoagulante. También los estudios han demostrado que el EDTA mejora la tasa de éxito de la transferencia de plasma en los protocolos de procesamiento de muestras automatizadas debido a los incidentes relativamente más bajos de la formación de coágulos.<sup>(23)</sup>

Efecto de la matriz no sólo se relaciona con el proceso de ionización de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. También pueden ser

causados por técnica de extracción, procedimiento cromatográfico incluyendo constitución de la fase móvil, velocidad de flujo, la columna analítica. Esto también debe tenerse en cuenta al desarrollar los métodos, donde se requiere un análisis preciso, exacto y reproducible.<sup>(29, 30)</sup>

La forma más eficaz para eliminar el efecto de la matriz que afecta la veracidad y la precisión del método analítico es utilizar la técnica de adición estándar. Además el estándar es especialmente apropiado cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y afecta la señal analítica.<sup>(30)</sup>

### **2.3.3.1. La Hemólisis.**

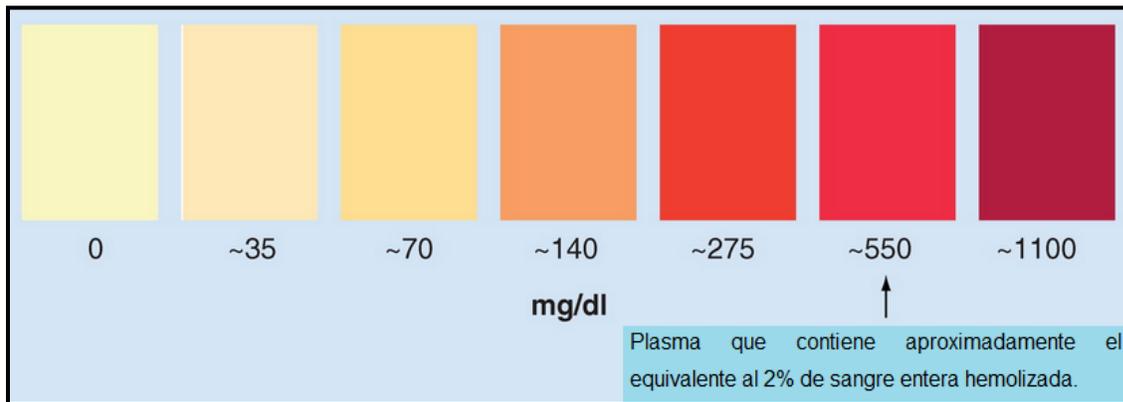
La hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva a la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición.<sup>(31)</sup>

La principal molécula intraeritrocitaria es la hemoglobina, que tiene un espectro de absorción característico del grupo Hem, con un pico de 405 nm y varios picos entre 500-600 nm, lo que produce un color rojizo en el plasma proporcional a la hemoglobina liberada. Se suele definir la hemólisis como la aparición en plasma de más de 0,3 g/l de hemoglobina, se considera esta concentración como la mínima detectable visualmente.<sup>(32)</sup>

La hemólisis, un tipo especial de efecto de la matriz, también puede tener un impacto en la cuantificación del analito.<sup>(33)</sup>

La hemólisis es un proceso que ocurre durante o después de la colecta de sangre, en el que la lisis de glóbulos rojos produce la liberación en el plasma de los pigmentos de la sangre tales como la hemoglobina y de bilirrubina y concentraciones de sal elevadas, tales como potasio, originando un color rosa y produce un color rojo en el plasma.<sup>(33, 34)</sup>

La cantidad de interferencia del analito dependerá del grado relativo de hemólisis o la intensidad del color de la muestra (Figura 3) y ha sido la razón para el rechazo de muestras en los laboratorios de diagnóstico clínico.<sup>(33)</sup>



**Figura 3. Escala utilizada para medir el grado de hemólisis en muestras de plasma.**

Durante la realización de un estudio clínico para el análisis de la farmacocinética del fármaco (PK), las muestras de sangre se extraen en diversos puntos de muestreo y se procesa normalmente el plasma o suero para el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Mientras se toman medidas para minimizar la hemólisis en el momento de la extracción de sangre (por ejemplo, el uso de un catéter de plástico, un manejo cuidadoso durante la toma de muestra sanguínea, procesamiento y transporte) algunas muestras hemolizadas son inevitables. El rechazo de muestras hemolizadas en un estudio de la farmacocinética del fármaco no es conveniente, ya que puede conducir a perfiles plasmáticos incompletos en concentración-tiempo que, sobre todo en torno a la  $C_{máx}$ , lo que potencialmente podrían afectar a los resultados del estudio. Por lo tanto el efecto de la hemólisis es un tipo especial de efecto de la matriz que incluye el impacto de los contenidos de las células rojas de la sangre lisadas en la cuantificación del analito. La hemólisis puede tener un impacto dramático en la cuantificación del analito y requerir la modificación de la extracción y/o técnicas cromatográficas para garantizar la aplicación de métodos de bioanálisis exactos, precisos y robustos para soportar los ensayos clínicos.<sup>(33)</sup>

## 2.4. Tratamientos para separación de proteínas plasmáticas en la cuantificación de fármacos (curcumina).

La importancia primordial de la correcta limpieza de la muestra es: el método más simple y más rápido para la preparación de muestras.<sup>(35)</sup>

En general, existen tres enfoques comúnmente utilizados para el procesamiento de muestras: Extracción en Fase sólida (EFS), Extracción Líquido-Líquido (ELL), y Precipitación de Proteínas (PP).<sup>(21, 36)</sup>

### 2.4.1. Precipitación de Proteínas.

La técnica de Precipitación de Proteínas es rápido, de bajo costo y fácil de aplicar a una amplia clase de pequeñas moléculas,<sup>(36)</sup> presenta varios inconvenientes. En un procedimiento de Precipitación de Proteínas, a menudo un volumen igual o superior (por ejemplo, 1:3) de acetonitrilo (o, metanol, etanol, acetona) se añade a una muestra de plasma, que contiene una muestra de prueba, así como un patrón interno. La muestra se mezcla y se centrifuga dando como resultado la formación de un gránulo de proteína y su correspondiente sobrenadante. El sobrenadante se transfiere, se seca, reconstituye, o directamente es inyectado en una columna de Cromatografía Líquida. Este procedimiento es fácilmente aplicable a una serie de diversos grupos de moléculas pequeñas. Sin embargo, la Precipitación de Proteínas carece de especificidad y selectividad comparada con Extracción en Fase sólida o Extracción Líquido-Líquido.<sup>(23)</sup> Es más probable que Precipitación de Proteínas pueda causar la supresión de iones en la Ionización por Electrospray, ya que este método no es eficiente para eliminar suficientemente los compuestos endógenos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, colesterol, péptidos endógenos, y las proteínas plasmáticas residuales) que compiten con el analito(s) durante la ionización o afectan el proceso de solvatación.<sup>(35)</sup> Además, los compuestos que se unen a la proteína pueden producir baja recuperación en el procedimiento de Precipitación de Proteínas.<sup>(4, 37)</sup> El procedimiento de Precipitación de Proteínas también es más exigente ya que el equipo requiere frecuente limpieza, debido a la interferencia de compuestos endógenos y contaminantes.<sup>(23)</sup>

### 2.4.2. Extracción líquido-líquido.

La Extracción líquido-líquido (ELL), ha sido útil para el análisis de xenobióticos en fluidos biológicos. La Extracción líquido-líquido puede ser diseñada para ser altamente selectiva, rentable, produciendo extractos de muestras más limpias. La Extracción líquido-líquido es un procedimiento de transferencia de masa donde una muestra acuosa (por ejemplo, fluido biológico que contiene analito) está en contacto con un disolvente inmiscible que exhibe selectividad preferencial hacia uno o más de los componentes en la muestra acuosa (por ejemplo, plasma o sangre entera). Uno de los factores determinantes en una alta recuperación en un proceso de Extracción líquido-líquido, es la neutralización del analito por la manipulación del pH y posterior extracción por un disolvente orgánico (por ejemplo, acetato de etilo, hexano, ciclo- hexano, metil ter-butil éter). Los valores típicos de pKa para los ácidos podrían abarcar de 3,0 a 5,0, por lo tanto, el pH puede ser manipulado de 1,0 a 3,0, con el fin de producir la conversión de un ácido a su forma neutra. Con el fin de evitar cualquier contaminación de pozo a pozo durante la Extracción líquido-líquido, el procesamiento de la muestra (por ejemplo, agitación y centrifugación), a menudo se utilizan PTFE / silicona esteras o esterillas de PTFE con liners de silicona moldeadas que han demostrado ser muy eficientes.<sup>(23)</sup>

A menudo la Extracción líquido-líquido (ELL) produce extractos más limpios, los procedimientos suelen ser engorrosos y tienen muchas dificultades. Generalmente se necesitan etapas de extracción múltiple para aumentar la recuperación del analito y obtener extractos más limpios.<sup>(35)</sup>

### 2.4.3. Extracción en Fase sólida.

En un procedimiento de Extracción en Fase sólida, un material sorbente sólido tal como sílice- alquilo unido se empaqueta en un cartucho, en un disco, o en un formato de placa de 96 pocillos, y realiza esencialmente la misma función que el disolvente orgánico en la Extracción líquido-líquido. Esto es particularmente crítico en la reducción de iones de supresión por los componentes matriciales que eluyen, cuando se usa una interfaz ESI para el análisis LC -MS. En general, el orden de

supresión de la respuesta de ESI es Precipitación de Proteínas > Extracción en Fase sólida > Extracción líquido-líquido, donde la extracción líquido-líquido produce la menor cantidad de pérdida de iones de analito. Dependiendo de la estructura del compuesto (hidrofobicidad y funcionalidades ionizables) se necesitan medidas específicas para optimizar la recuperación de la muestra.<sup>(23)</sup>

## 2.5. Espectrometría de Masas.

### 2.5.1. Generalidades.

En 1913 JJ Thomson, construye su famoso aparato de rayos positivos en Cambridge (Parábola Espectrográfica),<sup>(38)</sup> él descubrió que descargas eléctricas en gases producían iones y que estos rayos de iones podían adoptar diferentes trayectorias parabólicas de acuerdo a su masa cuando pasaban a través de campos electromagnéticos.<sup>(22)</sup> Su trabajo confirmó el concepto de isótopos y proporcionó una explicación de las desviaciones de los pesos atómicos determinados mediante técnicas químicas de la "regla del número entero". Este logro marca el inicio del campo de la espectrometría de masas. Su alumno Aston extendió este trabajo mediante la construcción de un instrumento que llamamos propiamente un espectrómetro de masas.<sup>(38)</sup> Aston fue quien diseño varios espectrómetros de masas (figura 4) en los cuales los iones eran dispersados por sus masas y enfocados de acuerdo a su velocidad. Esto permitió mejorar el poder de resolución de masas y el posterior descubrimiento de isótopos de diferentes elementos que están presentes en la naturaleza Thomson recibió el Premio Nobel de Física en 1906 y Aston el Premio Nobel de Química en 1922.<sup>(22)</sup>

En la década de los 40's se construyeron los primeros espectrómetros de masas disponibles comercialmente por medio de diferentes compañías de Europa y Estados Unidos. En esta década también se desarrolló el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, *TOF*), un concepto propuesto como un analizador más barato y simple, en el cual los iones son separados en base a sus diferencias en velocidad cuando son acelerados en un tubo de vuelo lineal.<sup>(22)</sup>



**Figura 4. Una réplica del tercer espectrómetro de masas de Aston.**

### **2.5.2. Fundamento de la Espectrometría de Masas.**

Un Espectrómetro de Masas es un instrumento que mide las masas de moléculas individuales que han sido convertidas en iones a partir de moléculas en fase gaseosa (ionización). Un espectrómetro de masas no mide la masa molecular directamente, pero mide la relación masa/carga de los iones formados de las moléculas.<sup>(22, 39)</sup> El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son “clasificados” de acuerdo a su relación  $m/z$  (masa/nº de cargas del ión). El espectrómetro de masas no solo clasifica los fragmentos, sino que además mide la cantidad que se forman de ellos.<sup>(40)</sup>

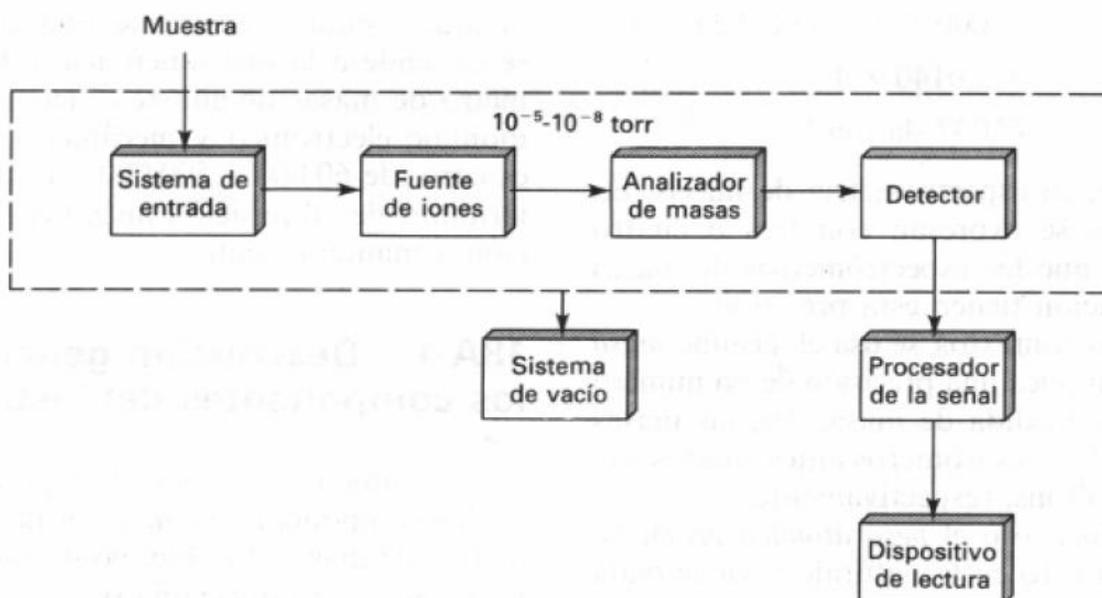
Cuando a una molécula se le suministra una determinada energía la molécula se descompone siguiendo un patrón concreto en el que se obtienen siempre los mismos fragmentos y en la misma relación de intensidad. Este patrón concreto se representa gráficamente en el espectro de masas, al que denomina por esta razón “huella digital de la sustancia”.<sup>(40)</sup>

### **2.5.3. Componentes del Espectrómetro de Masa.**

La Espectrometría de masa es una de las más poderosas herramientas analíticas disponibles, que es capaz de proveer información acerca de<sup>(41)</sup>:

- 1) La composición elemental de las muestras.
- 2) La Estructura de moléculas orgánicas y biológicas.
- 3) El análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas.
- 4) La estructura y composición de átomos en las muestras.
- 5) La proporción isotópica de átomos en las muestras.

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes mayores (figura 5): un sistema de entrada, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, procesador de señal y un sistema de datos. El sistema de entrada, junto con la fuente de iones y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema. <sup>(22, 39)</sup>



**Figura 5. Componentes de un Espectrómetro de Masas.**

#### 2.5.4. Introducción de la muestra.

De acuerdo con la naturaleza de la muestra a estudiar, se utiliza principalmente tres métodos para la introducción de muestras. <sup>(22, 38, 39, 41)</sup>

- I) Introducción indirecta
- II) Introducción directa
- III) Introducción a partir de un cromatógrafo.

I.-Introducción indirecta: En este sistema, la vaporización de la muestra se realiza en un recipiente externo al espectrómetro; un balón de vidrio o de metal esmaltado interiormente que se mantiene a temperatura elevada.<sup>(22, 38, 41)</sup>

Este método de introducción es aplicable para el análisis de gases, líquidos de punto de ebullición inferior a 200 °C, o sólidos sublimables. El balón utilizado para la introducción indirecta debe tener una capacidad de un litro aproximadamente.<sup>(22, 41)</sup>

II.-Introducción directa. En este sistema, se introduce la muestra directamente en la fuente de iones por medio de una varilla metálica, que lleva en la punta un capilar conteniendo la muestra (figura 6).<sup>(22, 41)</sup>

La muestra se calienta en el capilar, bien directamente a través de la varilla, o bien indirectamente por medio de una resistencia de válvulas para evitar alterar el vacío que se mantiene en el interior del aparato.<sup>(22, 41)</sup>

El sistema de introducción directa, presenta como principal problema el hecho de que las muestras cristalinas no vaporicen de manera continua, lo que origina que la presión en el interior del equipo no permanezca constante. Otro inconveniente que presenta este sistema, es que si la muestra va acompañada de impurezas volátiles, éstas se vaporizarán antes que la muestra, de forma que existe el riesgo de obtener el espectro de la impureza.<sup>(22, 41)</sup>



**Figura 6. Sonda de introducción directa.**

III.-Introducción a partir de métodos cromatográficos. Este sistema de introducción de la muestra se ha popularizado para el análisis por espectrometría de masas de mezclas de compuestos, ya que realiza la separación de los diversos componentes de la mezcla.<sup>(22, 41)</sup>

Las separaciones cromatográficas son esenciales en el análisis de mezclas complejas compuestas de diferentes analitos o componentes de la matriz. Esto es para proporcionar la detección de analitos individuales sin interferencia de otros analitos o componentes de la matriz. Esto puede proporcionar la mejora de los límites de detección y evitar la no detección de analitos presentes en concentraciones bajas causadas por enmascaramiento de analitos de alta concentración. Una segunda razón para aplicar separaciones cromatográficas es diferenciar entre isómeros, que tienen el mismo peso molecular y por lo tanto son detectadas con la misma  $m/z$ . La cuantificación o identificación de los isómeros separados requiere la separación antes de la detección.<sup>(39)</sup>

#### **2.5.5. Fuentes de ionización.**

Existen técnicas de ionización en las que la energía impartida hace que las moléculas sólo adquieran carga (ionización suave), y técnicas de ionización en las que la energía impartida es de mayor magnitud, por lo que la molécula se rompe y forma fragmentos cargados. Las moléculas que sólo adquirieron carga sin ser fragmentadas se conocen como iones moleculares; las moléculas que además de ionizarse se fragmentaron se conocen como productos o fragmentos iónicos.<sup>(39, 41)</sup>

La función de la fuente de ionización en un equipo de Espectrometría de Masas es aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente, ya que para medir las moléculas por espectrometría de masas éstas deben estar “eléctricamente cargadas” (iones).<sup>(38, 42)</sup>

Cuando el sistema de introducción de muestra es un acoplamiento a Cromatografía de Gases (GC), la muestra se encuentra en estado vaporizado y la única función de la fuente de ionización es ionizar las moléculas neutras

(conferirles carga) por aplicación de una determinada energía. En este tipo de acoplamientos la ionización se produce en estado de vacío.<sup>(39)</sup>

En el caso de los acoplamientos a Cromatografía de Líquidos (LC), las fuentes de ionización son interfases más sofisticadas que han tardado casi más de 30 años en ser desarrolladas. Este lento desarrollo se ha debido a que en el acoplamiento a Cromatografía de Líquidos, la muestra se encuentra disuelta en el efluente procedente del sistema. Esto resulta incompatible con el alto vacío requerido en la espectrometría de masas. Por esta razón, las interfases o fuentes de ionización desarrolladas han tenido la doble función de eliminar el disolvente (normalmente presente en ordenes de 0.05-0.5 ml/min), y vaporizar la muestra e ionizarla. En este acoplamiento, la ionización se produce a presión atmosférica.<sup>(22, 39)</sup>

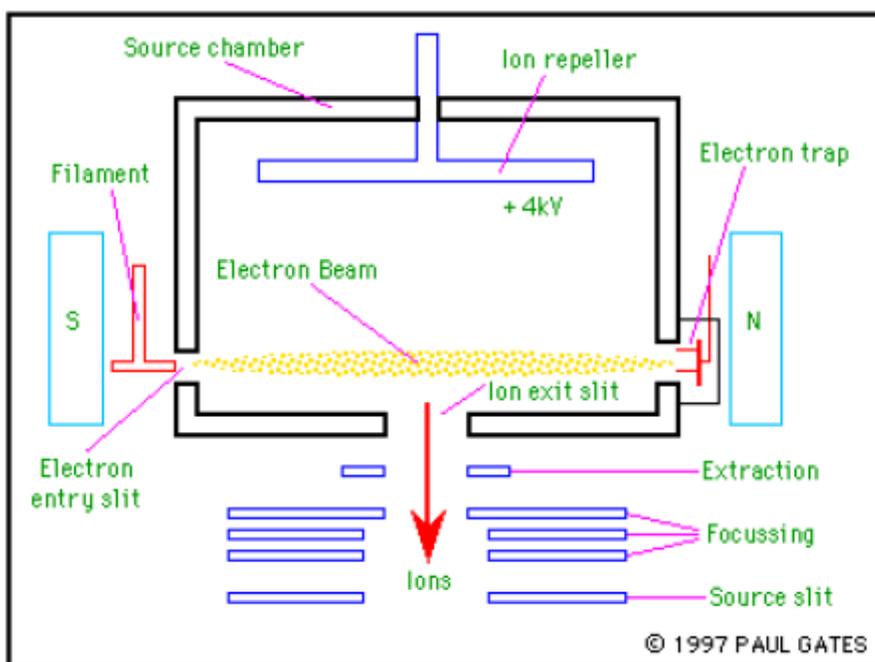
**I. El Impacto Electrónico** (*Electron Impact EI*) o comúnmente llamado Ionización Electrónica (*Electron Ionization EI*) es un método clásico de generación de iones en espectrometría de masas. El analito es introducido dentro de la fuente de ionización que esta al vacío ( $<10^{-6}$  mbar) y subsecuentemente ionizado por colisiones con un flujo de electrones.<sup>[13,17]</sup>

Los electrones son producidos por emisión termiónica desde un filamento de tungsteno o renio. Una corriente típica de un filamento es del orden de  $1 \times 10^{-4}$  amperios. Estos electrones salen desde la superficie del filamento y son acelerados hacia la cámara fuente de iones la cual es mantenida a un potencial positivo (igual al voltaje de aceleración). Los electrones adquieren una energía igual al voltaje entre el filamento y la cámara fuente (típicamente 70 electronvoltios, eV). La trampa de electrones se mantiene a un potencial fijo positivo con respecto a la cámara fuente. Una porción del haz de electrones golpeará la trampa de electrones produciendo la corriente de la trampa. Esta es usada como un circuito de retroalimentación para estabilizar el haz de electrones.<sup>(22, 38, 39)</sup>

Un imán permanente se coloca a lo largo de la cámara fuente para producir un flujo magnético paralelo al haz de electrones. Esto causa que el haz de electrones tome una dirección de espiral desde el filamento hasta la trampa, aumentando la probabilidad y la eficiencia para ionizar el analito. Las moléculas

de analitos gaseosos son introducidas en la vía del haz de electrones en donde son ionizados por interacciones electrónicas con el haz de electrones. La ionización puede realizarse también por impacto directo de un electrón con una molécula de analito.<sup>(40)</sup>

La muestra es introducida por medio de una sonda directa (*direct probe*) operada de 20 a 500°C o por medio de un cromatógrafo de gases. Las muestras deben ser de polaridad baja o media y con cierta estabilidad térmica, además de que deben ser evaporadas antes de su ionización. El proceso de Impacto Electrónico causa mucha fragmentación de las moléculas lo cual puede tener ventajas en la deducción de su estructura (Figura 7).<sup>(41)</sup>



**Figura 7. Esquema de una fuente de Ionización Electrónica**

**II. La Ionización Química (*Chemical Ionization CI*)** es un método de ionización relativamente suave, y es el primer método de ionización suave introducido a la espectrometría de masas. La ionización es afectada por reacciones sobre la molécula con iones de un reactivo gaseoso generados por

medio de ionización de impacto electrónico (*EI*) con moléculas del analito neutras.<sup>(22, 41)</sup>

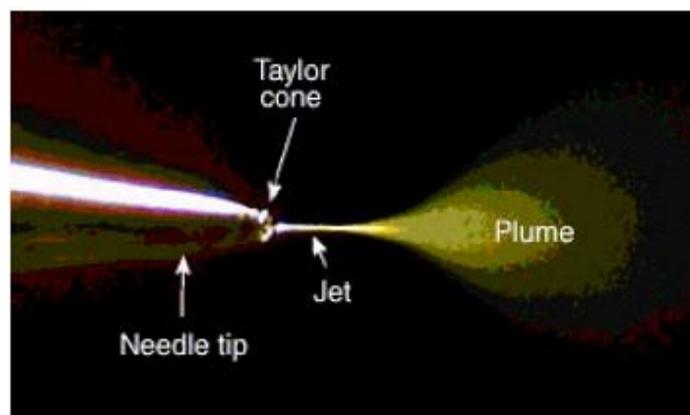
El reactivo gaseoso es empleado con un exceso de 103-104 veces la molaridad del analito. Esto puede ser logrado al usar un volumen de iones bastante pequeño en comparación a las condiciones de impacto electrónico. El volumen de reactivo gaseoso se controla por medio de una válvula. Entre los agentes gaseosos utilizados se incluyen el metano, el isobutano y el amoníaco, formando iones  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9^+$ , y  $\text{NH}_4^+$  respectivamente como especies predominantes.<sup>(38)</sup>

La muestra es introducida por medio de una sonda directa (*direct probe*) a una temperatura de operación de 20 a 500°C (para sólidos y líquidos de baja volatilidad, así como líquidos y gases) o por medio de un cromatógrafo de gases (mezclas). Los analitos deben tener polaridad baja o media, así como estabilidad térmica. La ionización química genera iones de energía interna relativamente baja, exhibiendo un bajo nivel de fragmentación, la evaporación del analito antes de su ionización es el paso crítico.<sup>(22)</sup>

**III. La Ionización por Electrospray (ESI)** es uno de los métodos de ionización más recientemente desarrollados en espectrometría de masas. El diseño y operación de fuentes de ionización por electrospray usadas comúnmente en los espectrómetros de masas están basados en diseños descritos por Fenn y colaboradores en 1985. Este método, es llevado a cabo a presión atmosférica a diferencia de otros métodos, por lo que se le conoce también como un método de ionización a temperatura ambiente (atmospheric pressure ionization API). La ionización por Electrospray es ampliamente utilizada en aplicaciones de ciencias bioquímicas y biomédicas debido a su capacidad de analizar moléculas altamente polares tales como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos.<sup>(22, 41)</sup>

En el proceso general de Electrospray (figura 9), que ocurre en la punta del emisor (capilar o aguja), una solución acuosa ácida o básica (dependiendo de la muestra) diluida del analito ( $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  molar) es rociada desde la punta del emisor en el cual se aplica un potencial de 3 - 4 kV, la solución debe proveer conductividad eléctrica que puede ser obtenida por el uso de analitos iónicos o aditivos iónicos tales como buffers o por algún grado de disociación electrolítica

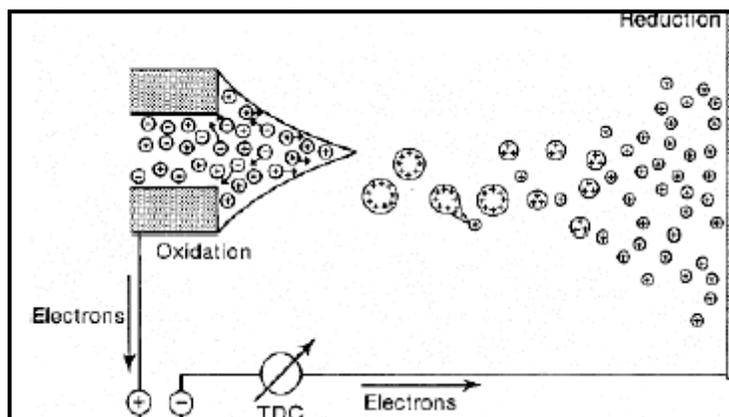
del solvente. El líquido comienza a salir de la aguja, incrementa su carga y asume una forma cónica, llamada cono de Taylor (figura 8), en honor a G.I. Taylor quien describió este fenómeno en 1964. El líquido asume esta forma cuando incrementa su carga ya que una forma cilíndrica puede retener más carga que una esfera. En la punta del cono, el líquido cambia de forma a una línea fina, que se vuelve inestable ya que es forzado a retener más y más carga, y finalmente llega a un punto crítico donde no puede soportar más carga eléctrica y la solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas (de menos de 10 mm de diámetro) altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta. Debido a que las gotas están altamente cargadas con la misma carga eléctrica se repelen fuertemente, las gotas vuelan y se dispersan cubriendo un área cada vez mayor y se van reduciendo de tamaño ya que las moléculas de solvente se evaporan en su superficie, y la distancia entre las moléculas cargadas disminuye dramáticamente (figura 9). Si la gota no encuentra donde disipar su carga, las cargas eléctricas llegan a un estado crítico y la gota explota violentamente. Este proceso fue originalmente observado por el físico John Zelany en 1914.<sup>(22, 39)</sup>



**Figura 8. Cono de Taylor**

Aún no existe una explicación 100% aceptada de lo que le sucede a las gotas, pero algunas de las teorías son:<sup>(22, 39)</sup>

1. Modelo de Residuo Cargado (*charged residue model*) de Dole. Las gotas sufren repentinamente explosiones coulombicas produciendo gotas más pequeñas y más pequeñas que finalmente contendrán solo una molécula cargada y quizá algunas moléculas de solvente.
2. Modelo de Evaporación Iónica (*ion evaporation model*) de Iribarne y Thomson. Ocurre la expulsión de moléculas cargadas para reducir la densidad de carga de la superficie.
3. La gota original sobrevive después de haber expulsado algunas microgotas cargadas.



**Figura 9. Reducción de tamaño de gota en Ionización por Electro spray.**

De cualquier forma, el proceso termina con moléculas cargadas que pueden todavía llevar moléculas de solvente. El proceso de evaporación y rompimiento de gotas se repite hasta que el tamaño y carga de las gotas desorba moléculas protonadas dentro de la fase gaseosa, donde pueden ser dirigidas en el espectrómetro de masas por medio de campos eléctricos apropiados (figura 10).<sup>(22)</sup>

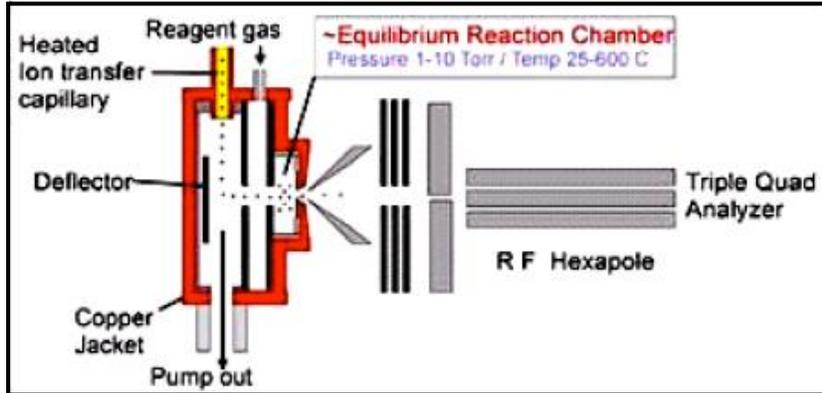


Figura 10. Esquema de una fuente de Ionización por Electro spray.

**IV. Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).** En la ionización APCI el procedimiento de formación del spray es el mismo que en la Ionización por Electro spray pero ahora lo que se produce es una fuerte descarga en la fuente que produce un plasma de iones reactivos del disolvente que origina el mecanismo de ionización de la muestra por ionización química (CI), normalmente por adición o cesión de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones  $(M+H)^+$  positivos, y  $(M-H)^-$  negativos (figura 11). (22, 38)

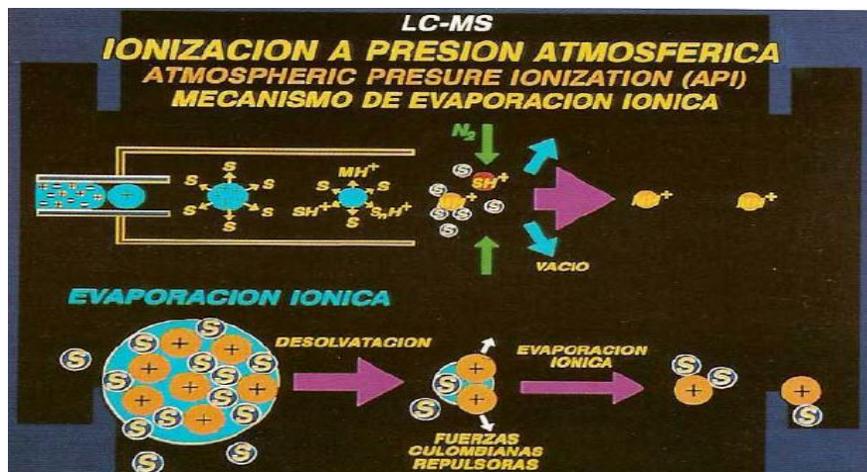


Figura 11. Esquema de una fuente de Ionización a Presión Atmosférica.

En la tabla 2 se muestra algunas características y limitaciones de las diferentes técnicas de ionización acopladas a los diferentes equipos Cromatográficos (Cromatografía de Líquidos y Cromatografía de Gases)

**Tabla 2. Técnicas de ionización más habitualmente empleadas en los acoplamientos GC y LC.**

Tipo	Características	Limitaciones
<b>Acoplamiento GC</b>  Ionización por Impacto Electronico (EI)	1.-Universal (ioniza gran variedad de moléculas). 2.-Muy reproducible (permite creación de librerías espectrales). 3.-Moléculas se ionizan por bombardeo de un haz de electrones con carga de 70eV (generalmente).	1.-En algunos casos, excesiva fragmentación de moléculas. 2.- Moléculas termolábiles se degradan al vaporizarse. 3.-Solo EM de iones positivos. 4.-Poco selectivo.
	1.-Es más suave y más controlable. (Menor descomposición de moléculas). 2.-Obtención de iones quasimoleculares. Permiten determinar peso molecular. 3.-Moléculas se ionizan por colisión con un gas reactivo. (metano, amoniaco). 4.-En función gas seleccionado, la ionización puede ser universal o selectiva.	1.-Poco reproducible. Las abundancias relativas de los iones presentan mayor variabilidad. Dificulta creación librerías espectrales. 2.-Ionización en estado gaseoso: Moléculas termolábiles se degradan.
<b>Acoplamiento LC</b>  Ionización por Electrospray (ESI)	1.-Permite obtener iones multicargados (posibilidad análisis péptidos y proteínas) 2.-Funciona bien con ácidos y bases preformados en disolución y con compuestos a los que se les pueda inducir carga (analitos polares o con heteroátomos). 3.-No utiliza temperaturas elevadas (permite análisis moléculas lábiles). 4.-Se pueden obtener espectro de masas de iones positivos y negativos.	1.-Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). 2.-Suelen formarse aductos con los tampones utilizados en la fase móvil de LC. 3.-La sensibilidad es muy dependiente del flujo de fase móvil del LC y del pH de esta.
	1.-Es una ionización química mediante reacciones ión-molécula a presión atmosférica. 2.-Permite análisis de moléculas con bajo peso molecular no volátiles. 3.-Su sensibilidad no depende el pH ni del flujo de fase móvil. 4.-Más sensible que ESI. 5.-Permite obtener EM de iones positivos y negativos.	1.-Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). 2.-Ionización se produce en fase gaseosa: algunas moléculas lábiles pueden descomponerse por la temperatura.

### 2.5.6. Analizadores de Masas.

El **analizador** es la parte del espectrómetro de masa donde tiene lugar la separación (o clasificación) de los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga. Esta separación se produce por aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos.<sup>(22, 39)</sup>

Existen diferentes tipos de analizadores que poseen unas características diferentes en lo que se refiere a sensibilidad, rango de masas que se puede separar y capacidad de separar masas que se diferencian solo en decimales (resolución).<sup>(22, 39, 41)</sup>

Los tipos de analizadores más utilizados son:

- I) Cuadrupolo (*quadrupole*).
- II) Trampa de iones (*ion-trap*).
- III) Tiempo de vuelo (*time-of-flight*).

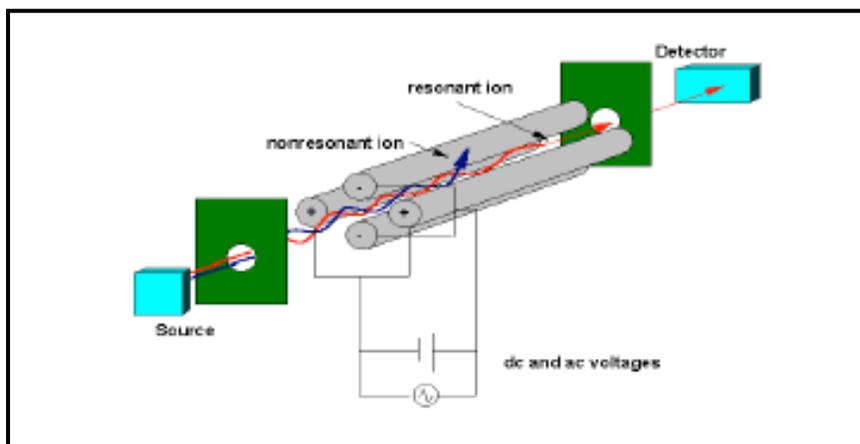
El principio de los analizadores en espectrometría de masas, se inicia con una mezcla de iones que tienen diferentes relaciones masa/carga y diferentes abundancias relativas. Campos electromagnéticos separan los iones de acuerdo a sus relaciones masa/carga, y una hendidura es usada para seleccionar cuales iones llegan al detector. Las diferentes relaciones masa/carga son entonces analizadas en la salida del detector y las corrientes de iones son registradas como una función del tiempo.<sup>(39)</sup>

#### I.-Analizador de masas de cuadrupolo.

En un analizador de masas de Cuadrupolos, se usan campos eléctricos solamente para separar los iones de acuerdo a su relación carga-masa. Un cuadrupolo consiste en cuatro varillas paralelas o polos a través de los cuales se hacen pasar los iones a separar. Los polos reciben una corriente directa fija y voltajes de radio frecuencia (RF) alternantes. Dependiendo del campo eléctrico producido, solamente iones con cierta relación de carga-masa serán dirigidos hacia el detector; todos los demás iones serán desviados hacia los polos.<sup>(40, 43)</sup>

Se aplica para (a) proporcionar límites de detección más bajos y mayor selectividad en los estudios de cuantificación o (b) proporcionar la fragmentación en fase gaseosa para la identificación de analito (figura 12).<sup>(22, 39)</sup>

El analizador cuadrupolo ofrece alta reproducibilidad, además de costos relativamente bajos de manejo y mantenimiento del sistema, pero puede llegar a tener una resolución limitada, puede no adaptarse a algunos métodos de ionización. Este analizador esta frecuentemente acoplado a sistemas de cromatografía de gases/espectrómetro de masas (GC/MS).<sup>(22)</sup>



**Figura 12. Analizador de masas de Cuadrupolo (*quadrupole*).**

## II.-Trampa de iones (*ion-trap*).

El analizador de masas con cuadrupolo y trampa iónica consiste de tres electrodos hiperbólicos: el electrodo circular, el electrodo de tapa de entrada y el electrodo de tapa de salida. Estos electrodos forman una cavidad en la que es posible atrapar y analizar iones. Los dos electrodos de tapa tienen un pequeño orificio en su centro a través de los cuales los iones pueden pasar. El electrodo circular se encuentra a la mitad entre los dos electrodos de tapa (figura 13).<sup>(39, 40, 44)</sup>

La trampa de iones es operada al aplicar un potencial sinusoidal (*rf* a una frecuencia determinada) al electrodo circular, mientras que los de los extremos se mantienen constantes (frecuentemente en cero), o mantenidos a un potencial oscilante. La variedad de potenciales posibles que pueden aplicarse a los electrodos de los extremos permite atrapar los iones dentro de un rango  $m/z$  específico, es decir atrapar iones por encima de un valor  $m/z$  específico, atrapar iones solo de un valor  $m/z$  seleccionado, o expulsar iones de un valor  $m/z$  específico.<sup>(39, 40)</sup>

Como fue originalmente concebido, la trampa de iones puede ser ajustada para almacenar iones de un valor  $m/z$  dado. Al cambiar las condiciones de operación, iones de un valor  $m/z$  especificado podrán salir o ser expulsados de la trampa.<sup>(40)</sup>

El Analizador de trampa de iones proporciona una ventaja significativa sobre muchos otros instrumentos. Los iones se pueden almacenar de forma indefinida, y la fragmentación múltiple en fase gaseosa (MSN) se pueden realizar "en tiempo" para proporcionar información estructural no sólo del ión molecular, sino también de fragmentos resultantes de iones de para construir árboles espectrales de masas.<sup>(39)</sup>

Este sistema posee alta sensibilidad además de ser equipos relativamente compactos, pero ofrecen poca capacidad en análisis cuantitativos, pueden sufrir de efectos por cargas y reacciones de los iones, muchos parámetros influyen la calidad del espectro obtenido por este método (excitación, atrapado y detección de los iones) por lo que debe contarse con sistemas de control sumamente precisos. Puede acoplarse a sistemas cromatográficos.<sup>(40)</sup>

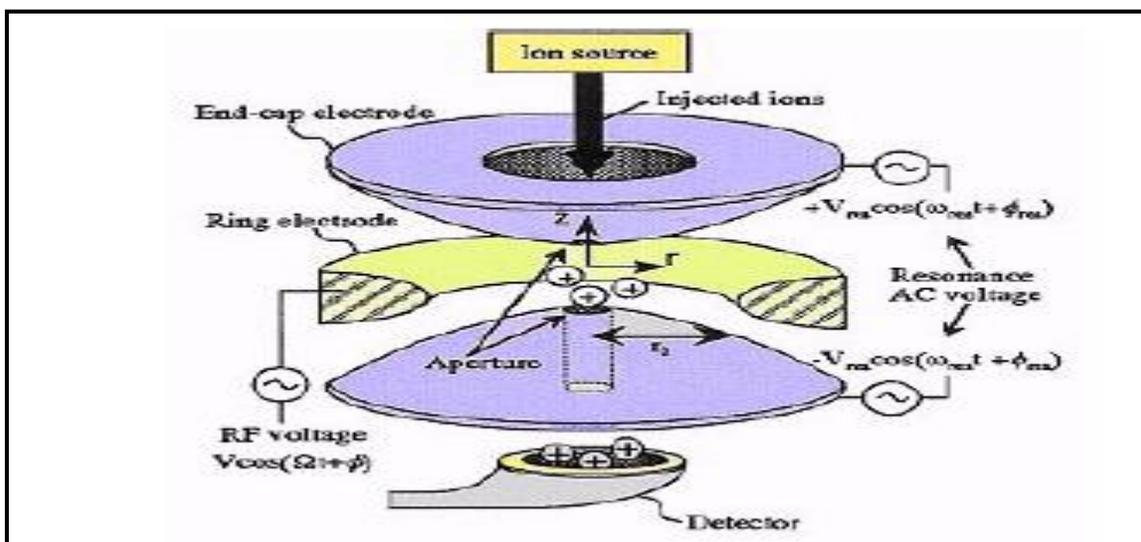


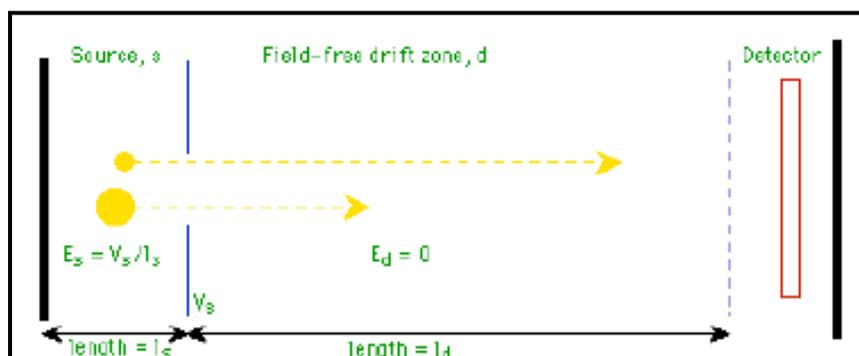
Figura 13. Analizador de masas Trampa de iones (*ion-trap*).

### III.-Tiempo de vuelo (TOF).

El principio de operación del analizador de tiempo de vuelo (time-of-flight, *TOF*) involucra la medición del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente

de iones hasta el detector de la fuente. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea (3000 eV), pero debido a que tienen diferentes valores de  $m/z$ , se separan en grupos de acuerdo a su velocidad (por lo tanto  $m/z$ ) como van recorriendo la región libre de campo entre la fuente de iones y el detector. Los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de  $m/z$ . Los iones de baja  $m/z$  llegan al detector antes que aquellos con  $m/z$  alta debido a que entre más  $m/z$  tengan los iones tendrán una velocidad menor (figura 14).<sup>(22, 41, 45)</sup>

El analizador *TOF* es el analizador de masas más rápido, puede adaptarse a los métodos de ionización por pulsos (*MALDI*), tiene alta transmisión de iones y el rango de masas más grande de todos los analizadores de masas. Algunas limitantes son que en muchas ocasiones requieren exclusivamente de un método de ionización por pulsos y que la selectividad de los iones puede limitarse en algunos experimentos.<sup>(22)</sup>



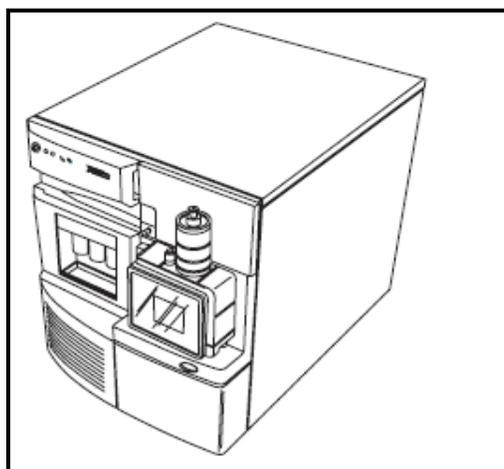
**Figura 14. Analizador de masas de Tiempo de Vuelo (time-of-flight, *TOF*).**

### 2.5.7. Cuidados y limpieza del espectrómetro de masas.

El espectrómetro de masas Xevo™ TQ MS de Waters® es un espectrómetro de masas de ionización a presión atmosférica (API) con cuadrupolos en tándem (figura 15).

Diseñado para análisis sistemáticos de UPLC™/MS/MS para aplicaciones cuantitativas y cualitativas, puede funcionar a velocidades de adquisición elevadas compatibles con UltraPerformance LC®.

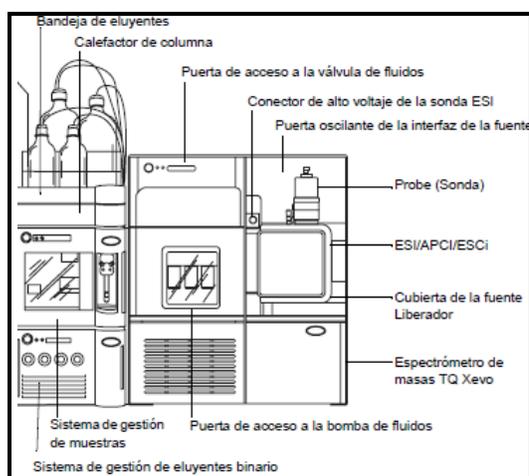
El Espectrómetro de masas TQ Xevo está equipado con la fuente de ionización por electrospray (ESI).



**Figura 15. Espectrómetro de masas TQ Xevo de Waters.**

### I. Sistema ACQUITY UPLC

El sistema ACQUITY UPLC incluye un sistema de gestión de eluyentes binario, un sistema de gestión de muestras, un horno para columnas, un organizador de muestras opcional, detectores opcionales (figura 16). El software de espectrometría de masas MassLynx de Waters controla el sistema.



**Figura 16. Sistema ACQUITY Espectrómetro de masas TQ Xevo UPLC/MS de Waters.**

## **II. Sensores de fugas**

Los sensores de fugas de las bandejas de recogida del Espectrómetro de masas TQ Xevo controlan de forma continua la existencia de fugas en los instrumentos. Un sensor de fugas detiene el flujo del sistema cuando el sensor óptico detecta 1.5 mL de líquido acumulado proveniente de fugas en el depósito que lo rodea. Al mismo tiempo, la Consola del módulo muestra un mensaje de error que avisa al usuario de la existencia de una fuga.

## **III. Sistema de vacío**

Una bomba rotatoria (de paletas giratorias) externa (existe la opción de usar una bomba sin aceite) y dos bombas turbomoleculares internas crean el vacío de la fuente. Las bombas turbomoleculares evacúan el analizador y la zona de transferencia de iones.

Las fugas de vacío, y los fallos eléctricos o de la bomba de vacío pueden producir una pérdida de vacío. Los bloqueos de protección evitan que esto ocurra. El sistema supervisa las velocidades de la bomba turbomolecular y mide constantemente la presión de vacío mediante manómetros Pirani y Penning integrados. Los manómetros también funcionan como interruptores para detener el funcionamiento cuando se detecta una pérdida de vacío.

Una válvula de aislamiento aísla la fuente del analizador de masas, lo que permite realizar el mantenimiento habitual de la fuente sin tener que efectuar la salida de los gases.

## **IV. Plan de Mantenimiento**

La tabla 3 muestra los planes de mantenimiento periódico que garantizan un funcionamiento óptimo del instrumento.

**Tabla 3. Mantenimiento del Espectrómetro de Masas.**

Procedimiento	Frecuencia	Información.
<b>Limpiar la superficie exterior del instrumento.</b>	Cuando sea necesario.	No se deben utilizar abrasivos ni disolventes para limpiar la superficie exterior del instrumento. Limpiar las superficies exteriores del espectrómetro de masas con un paño suave humedecido con agua.
<b>Vaciar la botella trampa de la salida de nitrógeno.</b>	Comprobar diariamente; vaciar cuando sea necesario	Inspeccionar cada día la botella trampa de la salida de nitrógeno en el conducto de evacuación del instrumento y vaciarla antes de que se llene más de un 10%, aproximadamente.
<b>Comprobar y ajustar el nivel de aceite de la bomba rotatoria</b>	Una vez por semana	Para garantizar el funcionamiento correcto de la bomba rotatoria Varian™, no se debe utilizar con un nivel de aceite inferior al 30% del nivel máximo. El nivel del aceite de la bomba rotatoria aparece en el indicador de nivel correspondiente. El nivel de aceite se debe inspeccionar semanalmente; con la bomba en funcionamiento, el nivel de aceite es normalmente del 30% al 60% respecto al nivel de aceite máximo. Es decir, se corresponde aproximadamente al nivel de aceite máximo cuando la bomba no está en funcionamiento. Si el nivel de aceite se encuentra por debajo de estos valores, añadir aceite a la bomba.
<b>Cambiar el aceite de la bomba rotatoria y el filtro de vapores de aceite.</b>	Una vez al año.	Cambiar anualmente el aceite de la bomba rotatoria y el filtro de vapores de aceite. Este procedimiento no es necesario para una bomba rotatoria Edwards sin aceite.
<b>Limpiar los componentes de la fuente.</b>	Cuando estén visiblemente sucios, cuando el fondo o los picos de los contaminantes sean inaceptablemente altos, o cuando la sensibilidad disminuya a niveles inaceptables.	Limpiar el cono de la muestra y la boquilla del gas del cono cuando se cumplan estas condiciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• El cono de la muestra y la boquilla del gas del cono están visiblemente sucios.</li> <li>• Se han descartado causas relacionadas con la cromatografía líquida (LC) y las muestras que expliquen la disminución de la intensidad de la señal.</li> </ul>
<b>Sustituir el extremo de la sonda ESI.</b>	Cuando disminuya la sensibilidad a niveles inaceptables.	Sustituir el extremo de la sonda ESI si se produce una obstrucción en la protección metálica interna por la que pasa el capilar de acero inoxidable o si el extremo de la sonda está dañado.
<b>Sustituir el capilar de la sonda ESI.</b>	Cuando disminuya la sensibilidad a niveles inaceptables o varíe el flujo de la muestra.	Sustituir el capilar de muestras de acero inoxidable de la sonda ESI si se obstruye y no se puede desatascar, o si se contamina o se daña.
<b>Sustituir el</b>	Si el calefactor no calienta	Sustituir el calefactor de la fuente del bloque de ionización si no

<b>cartucho del calefactor del bloque de ionización.</b>	cuando se está haciendo vacío (evacuando el aire) del instrumento.	se calienta al hacer vacío en el módulo (evacuarlo).
<b>Sustituir las juntas de la Bomba (espiroidal) sin aceite.</b>	Una vez al año.	Consultar el documento de Edwards <i>XDS35i Instruction Manual A730-01-880</i> .
<b>Sustituir el filtro de aire.</b>	Una vez al año.	Hay que cambiar el filtro de aire una vez al año

## V. Materiales de fabricación que están expuestos a eluyentes.

Los elementos que aparecen en la tabla 4 pueden estar expuestos al eluyente. Se deben evaluar los problemas de seguridad si los eluyentes que se utilizan en la aplicación son diferentes de los que se utilizan normalmente con estos elementos.

**Tabla 4. Elementos Expuestos a Eluyentes.**

<b>Artículo.</b>	<b>Material.</b>
<b>Recipientes de ajuste automático.</b>	Polietileno de alta densidad.
<b>Conducto de salida de gases.</b>	Acero inoxidable.
<b>Conjunto del bloque de ionización.</b>	Acero inoxidable y PEEK.
<b>Tornillos del bloque de ionización.</b>	Acero inoxidable chapado en oro.
<b>Soporte del bloque de ionización.</b>	PEEK.
<b>Válvula de aislamiento.</b>	Acero inoxidable y PEEK.
<b>Juntas tóricas.</b>	Viton® o Viton con encapsulado de PTFE.
<b>Fuelles del regulador de la sonda.</b>	Viton.
<b>Regulador de la sonda.</b>	Aluminio anodizado, acetal relleno de vidrio, Xylan® y acero inoxidable.
<b>Eje de la sonda.</b>	PEEK.
<b>Cámara de bombeo.</b>	Aluminio alocromado y Xylan.
<b>Control de fugas/desecho de eluyente.</b>	Tubo de Tygon.
<b>Cubierta de la fuente.</b>	Aluminio alocromado.
<b>Ventana de observación de la cubierta de la fuente.</b>	Cristal endurecido.
<b>Botella trampa.</b>	Polipropileno.
<b>Conectores a presión de la botella trampa.</b>	Caucho de nitrilo butadieno, acero inoxidable, polibutilén tereftalato y polioximetileno.

## **VI. Eluyentes utilizados para preparar Fases Móviles cumplen con la normativa.**

Estos eluyentes son los componentes más habituales utilizados en la preparación de fases móviles para LC/MS (API) de fase inversa:

- Agua
- Metanol
- Acetonitrilo
- Ácido fórmico (< 0.1%)
- Ácido acético (< 0.1%)
- Ácido trifluoroacético (< 0.1%)
- Acetato de amonio (< 10 mM)
- Formiato de amonio (< 10 mM)

No se espera que estos eluyentes produzcan problemas con los materiales identificados en “Elementos expuestos a eluyentes”.

## **VII. Modificación de las Superficies de la Cámara de Ionización.**

Se han hecho varios esfuerzos para reducir la degradación de la muestra en contacto con las superficies en espectrómetros de masas mediante la modificación de las superficies de la cámara de ionización. Partes de la cámara se han hecho de acero inoxidable electropulido, el cromo o cromo oxidado, o de acero inoxidable electropulido posteriormente electrolíticamente con oro. Las piezas también se han recubierto con una fina capa de un aislante de materiales conocidos para la resistencia a la corrosión o inercia (tales como el oro, el níquel y rodio), no metálico inerte o material semiconductor (tales como sílice fundida, de aluminio óxido o nitruro de silicio), con molibdeno, y con materiales de nitruro de conductor inorgánico o disulfuro. Además, las partes han sido tratadas con agentes de pasivación, como alquilclorosilanos, para enmascarar sitios activos. El metal de titanio y sus aleaciones se han utilizado ya sea como un recubrimiento o como material a granel para los componentes de transferencia de iones, y otros han recubierto con un skimmer de acero inoxidable con un nitruro conductor inorgánico.<sup>(46)</sup>

## **VIII. La precipitación en la Ionización por Electropray y la Ionización Química a Presión Atmosférica.**

Hay muy pocas posibilidades de que el analito pase a través de la región de vaporización y permanecen en solución, pero parece probable que el mecanismo de la supresión en la Ionización por Electropray y en la Ionización Química a Presión Atmosférica es la formación de sólido. El precipitado se puede formar cuando aumenta la concentración de analito (ya sea como el analito puro o como un coprecipitado sólido) y otros componentes de la muestra no volátiles con la evaporación del disolvente.<sup>(25)</sup> . Por esta razón es muy importante el lavado del cono. Para evitar lesiones por quemaduras, hay que evitar tocar con la mano el conjunto del bloque de ionización de la fuente cuando se trabaja o se realizan operaciones de mantenimiento en el instrumento.<sup>(47)</sup>

### **2.5.8. Requerimientos de las muestras a introducir a un sistema cromatográfico acoplado a un detector de espectrometría de masas.**

Debido al rápido ritmo de descubrimiento y desarrollo de fármacos, los ensayos utilizados para el análisis de preclínica, clínica y toxicocinético de muestras, requieren corto tiempo de entrega. Con la apropiada optimización de los diferentes componentes de un sistema de Cromatografía Líquida acoplada a un espectrómetro de masas una gran mayoría de los problemas analíticos pueden ser resueltos. En casos sencillos, con el peso molecular (MW), la calibración adecuada del analizador de masas por sí sola es suficiente. El control de variables en el análisis cuantitativo de las concentraciones de trazas de fármacos y metabolitos en una matriz biológica (sangre entera, orina, plasma, suero, hueso, fluido espinal, pelo, uñas, médula ósea, etc.), puede dictar el éxito del método. Estas variables incluyen la estabilidad de las muestras, la limpieza del material a inyectar, número de compuestos por análisis, el límite inferior de cuantificación, la resolución cromatográfica, resolución de masa , y el rendimiento del ensayo.<sup>(23)</sup>

EL pH de la solución , la concentración de electrolitos , y solución de propiedades de las gotitas de electropray dependerá de la composición exacta de la gotita que puede variar de muestra a muestra.<sup>(25)</sup>

La selección de pretratamiento de la muestra para cada biofluido es dependiente de las concentraciones de analito esperadas y del límite de detección. Para la orina, la alta concentración de metabolitos permite una simple dilución de la muestra antes del análisis. En el caso de fluido oral, las concentraciones de analito esperadas son mucho más bajas y se necesita una preconcentración. La precipitación de proteínas con acetonitrilo proporciona la suficiente preconcentración y eliminación de proteínas para el análisis cuantitativo de los analitos de interés en el fluido oral. Finalmente, los datos de supresión de la matriz indican que la extracción en fase sólida se usa para analitos de interés en el plasma.<sup>(4)</sup>

### **3. Objetivos.**

#### **3.1. Objetivo General:**

**3.1.1.** Comparar diversos tratamientos de muestras de plasma de perro para separar proteínas a fin de poder cuantificar Curcumina por espectrometría de masas.

#### **3.2. Objetivos Particulares:**

**3.2.1.** Hacer una revisión documental sobre los tratamientos que se les da a las muestras de plasma para separar proteínas a fin de evaluar curcumina por espectrometría de masas sin interferencias.

**3.2.2.** Realizar ensayos observando los porcentajes de recobro para evaluar los diversos tratamientos reportados para la separación de proteínas del plasma y cuantificar curcumina.

**3.2.3.** Optimizar el procedimiento de tratamiento de muestras de plasma con el mayor porcentaje de recobro y estabilidad de la curcumina.

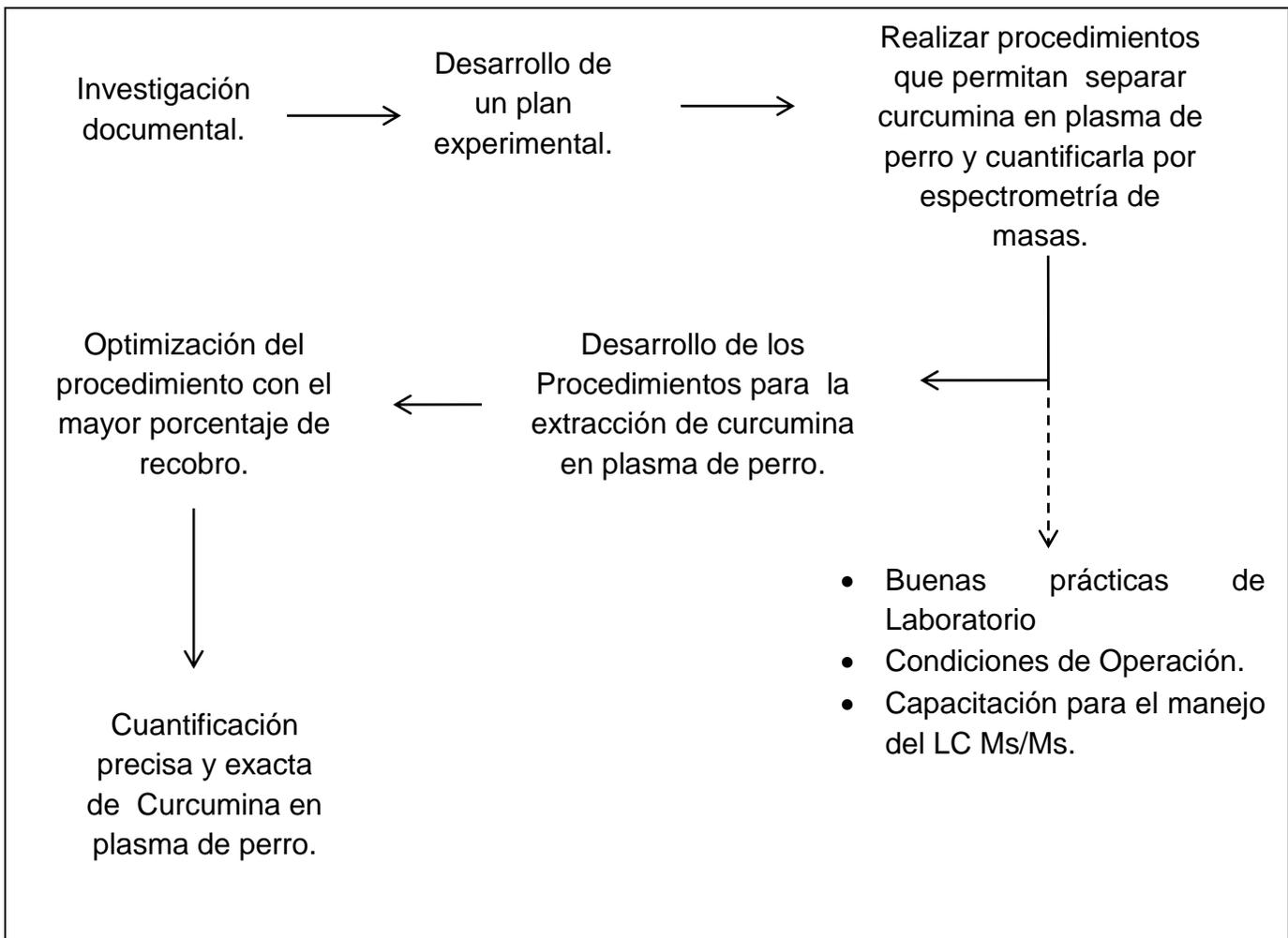
### **4. Hipótesis**

Si se optimizar el procedimiento de tratamiento de muestras de plasma para separar proteínas y cuantificar Curcumina por espectrometría de masas, entonces se logrará conocer la concentración precisa y exacta de curcumina en plasma de perro.

## 5. Plan de Trabajo.

### 5.1. Diagrama de Flujo.

En la figura 17 se muestra en un diagrama de flujo las actividades que se llevaron a cabo durante el desarrollo del trabajo.



**Figura 17. Diagrama de flujo de las actividades implicadas en el trabajo.**

## 6. Materiales y Metodología.

### 6.1. Materiales, Equipos e instrumentos.

Durante el desarrollo de este trabajo experimental se utilizó curcumina (analito de interés, la cual se administró en una suspensión de nanocapsulas) y clopidogrel (estándar interno) (tabla 5), así como diferentes reactivos (tabla 6) y materiales (tabla 7), también durante el proceso se llevó a cabo la capacitación de diversos equipo, así como también del cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (tabla 8), para poder cumplir con los objetivos propuestos.

**Tabla 5. Sustancias Químicas.**

Materias Primas					
Sustancia Química	Grado	Ensayo	Marca	No de Lote	Condición de almacenamiento.
Curcumina	HPLC	70%	SIGMA-ALDRICH	081M1611V	-20 <sup>0</sup> C
Clopidogrel Bisulfato	Materia Prima	98-101%	TEVA	659501809	8 <sup>0</sup> C

**Tabla 6. Reactivos.**

Solventes	Grado	Ensayo	Marca	No de Lote
Acetato de etilo	HPLC	R.A.	Productos Químicos Monterrey	UN1173
Acetonitrilo	HPLC	99.98%	J.T. Baker	M23C61
n-Propanol	HPLC	99.9%	J.T. Baker	A05C70
Diclorometano	HPLC	99.5%	EMD	UN1593
Metanol	HPLC	99.95%	J.T. Baker	L48C11
Acido Fórmico	HPLC	88%	J.T. Baker	UN1776
Cloroformo	HPLC	99.9%	J.T. Baker	K18C70
Acetato de Etilo				
Acetona	HPLC	99.7%	J.T. Baker	K22C52
Agua Milli-Q	-----	-----		-----
Ácido acético 2N	-----	-----	-----	-----

**Tabla 7. Materiales.**

Material	Especificaciones	Marca
Pipetas volumétricas	0.5,1,2,3,4,5,6,7 ml	KIMAX
Micropipetas	100-1000 µL	Fit Pipette
Micropipetas	50 µL	Fit Pipette
Vasos de precipitados	50,100,250 ml	KIMAX
Matraces volumétricos	10,20,100 mL tipo A	KIMAX
Matraces volumétricos	25,200 mL tipo B	BLAU BRAND
Matraces volumétricos	50 mL tipo B	KIMAX
Probetas	100 mL tipo B	BLAU BRAND
Piseta		
Tubos de ensaye	7.5 cm h, 1cm D	
Tubos eppendorf	2 mL con tapa transparente	CRM GLOBE
Acrodiscos	Millex-Hv Millipore PVDF de 0.4µm.	Waters
Cartuchos Sep-Pack C18 Cartridges	No Lot. W1173C1	Waters
Celdas de Cuarzo	0.01cm	VARIAN
Columna Acquity UPLC Bech Shield RP <sub>18</sub> 1.7 µm 2.1X10 mm	No. de serie 01473231515596	Waters
Vial con tapa	L/N5666512520 9 mm	Waters
Placa para vial de 2 mL	48 pozos	Waters
Placas redondas de 1 mL	No Lot. 12010640	Waters
Tapas para placas redondas	No Lot. 12008642	Waters
Jeringas	5,3 mL	BD
Jeringas	1 mL	Heggoline
Tubos para centrifuga	15 mL	
Pipeta Pasteur de plastico	7 mL	

**Tabla 8. Equipos.**

Equipo	Marca	No. de Inventario
Balanza analítica	Ohaus	114050584
Acquity UPLC	Waters	
Xevo TQ ESI	Waters	
Bomba Rotatoria Edwards	Waters	
Potenciómetro	Mettler Toledo	02228926
Termometro-Higrometro	UNAM	1581109
Centrifuga	S.A.	10465
Agitador Vortex-Genie	S.A.	K-550-G
Espectrofotómetro UV-Visible	VARIAN	2077800
Microcentrifuga	Beekman Couter	

	Microfuge 22R	
Equipo para purificación de agua de osmosis inversa	MILLIPORE	
Refrigerador compacto capacidad 104.77 dm	LG	
Campana de Extracción		
Evaporador para 16 muestras.		
Baño de María.	SEDIL	13-AE-2
Ultracentrífuga Optima XL-100K	Beckman Coulter	COXO417

## 6.2. Obtención del plasma de perro.

Lugares de venopunción en perros.

	Vena Cefálica	Vena de la Oreja	Vena yugular	Vena Femoral	Vena safena
<b>Perro</b>	+++	-	+++	+	+++

Donde:

-No recomendado

+ Alternativa posible

++ Vía aceptable

+++ Vía preferente

Los tamaños de las agujas han de ser del orden de 18, 22,25 o 38 mm de largo y 14 a 26 mm según el diámetro de la vena y el volumen de sangre requerido.

La cantidad de muestra obtenida a través de la punción debe tenerse en cuenta en las diferentes especies, es así como para las especies mayores puede obtenerse por punción sin causar trastornos hasta 15 ml de sangre, y en pequeñas especies la muestra no se puede exceder de 10 ml.

Para el desarrollo de los Procedimientos para la extracción de curcumina se empleó plasma de perro proporcionado por el Hospital de pequeñas Especies ubicado en FESC-C4. El plasma donado presentaba hemolisis por lo que nuevamente se centrifugo a 3500 rpm durante 60 minutos antes de utilizarlo, el sobrenadante se almaceno a -20°C. También se utilizo sangre entera de perro donada de la Unidad Quirúrgica de Enseñanza ubicada en FESC-C4. La sangre

entera se centrifugo en Ultracentrífuga Optima XL-100K a 15000 rpm durante 15 minutos a 4<sup>0</sup>C, el plasma obtenido se almaceno a -20°C.

### 6.3. Definición de Condiciones de trabajo para la Cuantificación de Curcumina por Espectrometría de Masas.

#### 6.3.1 Ionización.

Se determinaron las siguientes condiciones para una mayor intensidad de la respuesta en espectrometría de masas (tabla 10).

**Tabla 9. Parámetro de fragmentación del ion de Curcumina.**

Parámetro	Curcumina
Energías de colisión (eV)	30
Voltaje de cono (V)	26
Temperatura de solvatación (°C)	350
Flujo de gas de Desolvatación (L/Hr)	650
Flujo de gas de cono (L/hr)	0
Flujo de gas de colisión(mL/Min)	20

#### 6.3.2. Las condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes:

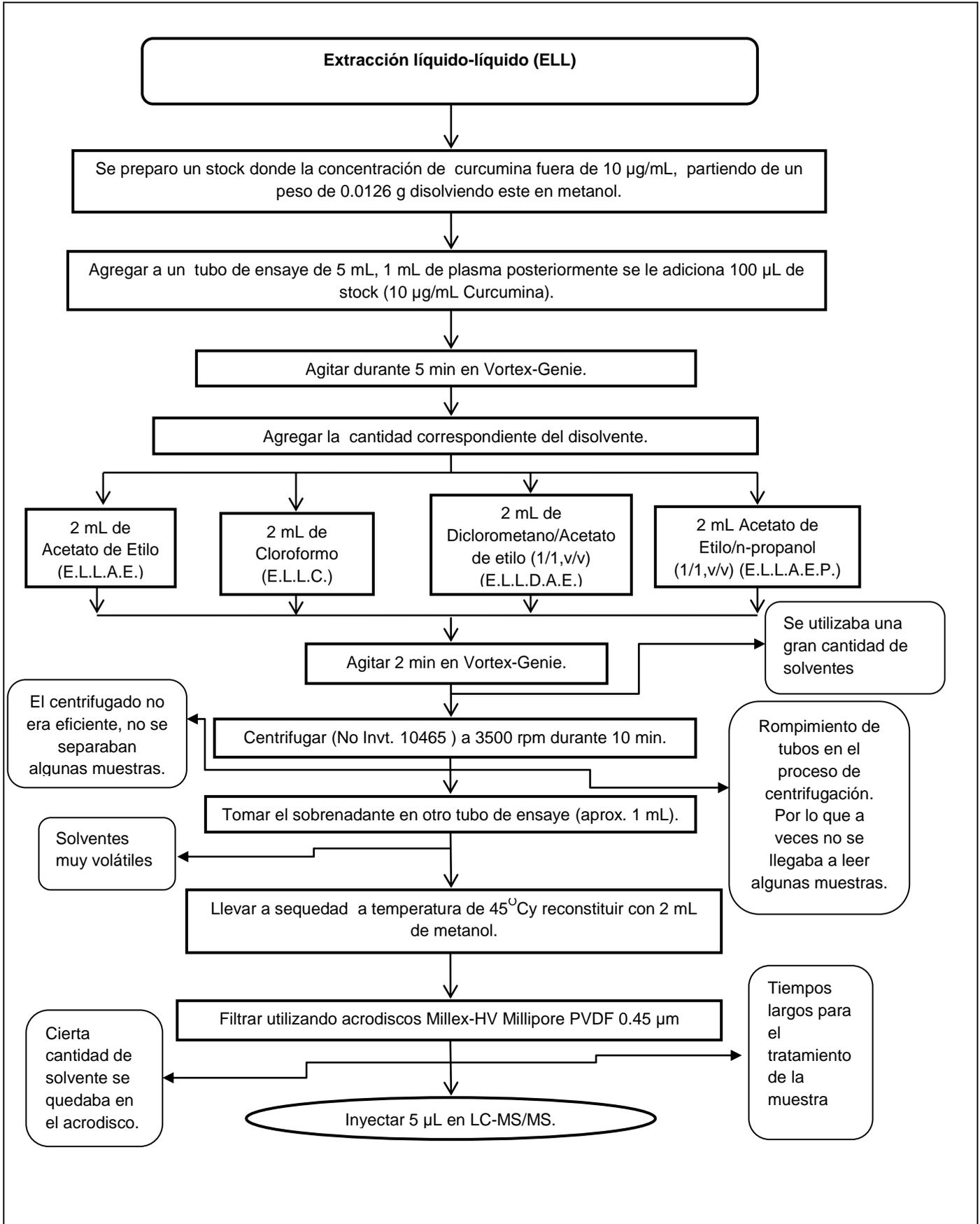
Fase móvil:	Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo y solución acuosa de ácido fórmico al 0.1% en proporción de 60:40 respectivamente.
Velocidad de Flujo:	0.25 ml/min.
Columna cromatográfica:	Acquity UPLC BECH Shield RP 18 1.7 µm 2.1 X 100 mm
Volumen de inyección:	7.5 µL
Tiempo de corrida:	5 minutos
Temperatura de horno de columna:	30°C
Temperatura de automuestreador:	25°C

#### **6.4. Tratamientos de Extracción de Curcumina en muestras plasmáticas para la cuantificación por espectrometría de masas.**

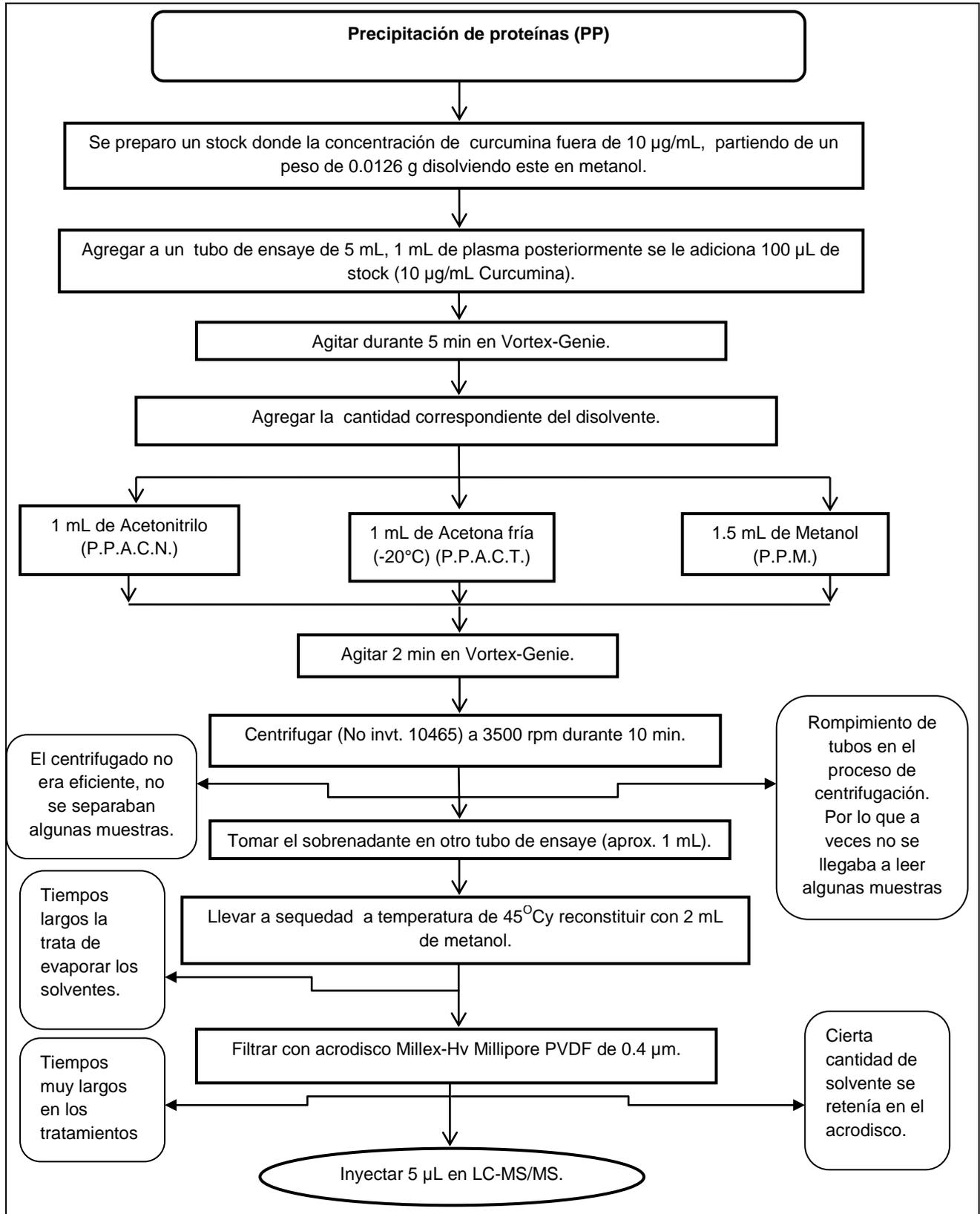
Para seleccionar la técnica de extracción se empleó una solución stock que contiene mezcla de curcuminoides (10 µg/mL de curcumina).

Se realizaron las primeras inyecciones de las técnicas de tratamiento de muestras plasmáticas para cuantificar curcumina en el espectrómetro de masas para saber cuál nos permitía recuperar la mayor cantidad y evaluando algunas características de los cromatogramas (ruido en la línea base, la resolución del pico) (figura 21 a la 28). Así también se evaluaron algunos factores y puntos críticos de las técnicas durante el proceso del tratamiento de la muestra.

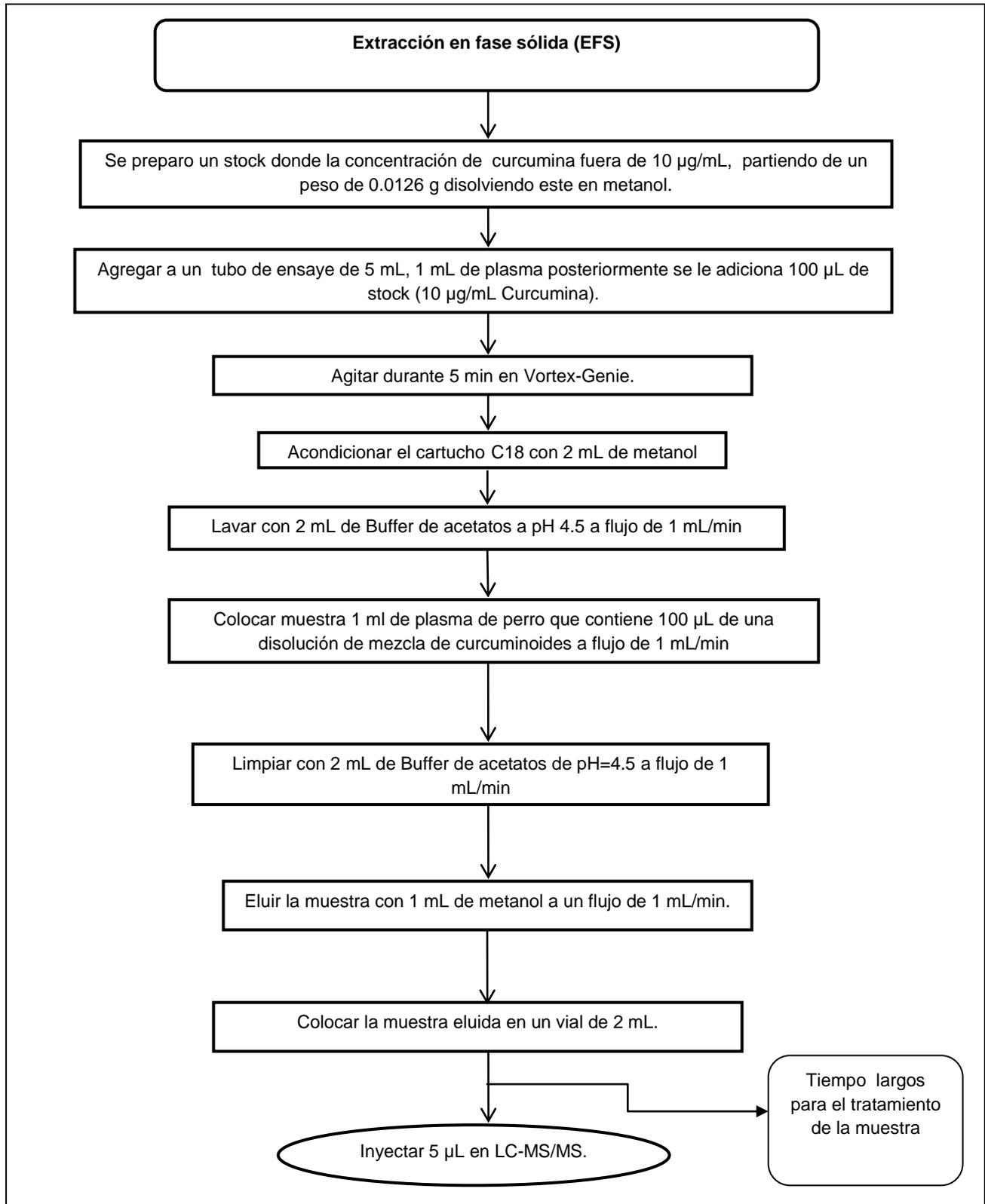
Se utilizaron tres técnicas de tratamiento de muestras: extracción líquido-líquido con: acetato de etilo (E.L.L.A.E.), cloroformo (E.L.L.C.), una mezcla de diclorometano con acetato de etilo (E.L.L.D.A.E.) y una mezcla de acetato de etilo con n-propano (E.L.L.A.E.P.) (figura 18); precipitación de proteínas con: acetonitrilo (P.P.A.C.N.), acetona fría (P.P.A.C.T.) y metanol (P.P.M.) (figura 19); y la extracción en fase sólida con: cartuchos Sep-Pack C18 Cartridges (figura 20).



**Figura 18. Condiciones de trabajo para la técnica de Extracción líquido-líquido.**



**Figura 19. Condiciones de trabajo para la técnica de Precipitación de Proteínas.**



**Figura 20. Condiciones de trabajo para la técnica Extracción en Fase Sólida.**

## 6.5. Estándar Interno.

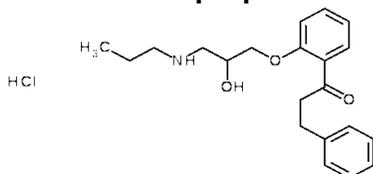
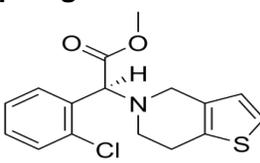
La selección de un estándar interno adecuado (EI) es uno de los factores determinantes en el establecimiento de un ensayo bioanalítico en cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. En el desarrollo del ensayo bioanalítico en la etapa donde se pretende usar fármacos, a menudo se utiliza un análogo estructural como estándar interno. El estándar interno se utiliza a menudo para apoyar estudios de desarrollo (por ejemplo, evaluación de la seguridad). En general, algunos de los siguientes puntos se deben considerarse antes de la elaboración y validación de un bioensayo por espectrometría de masas (tabla 10):

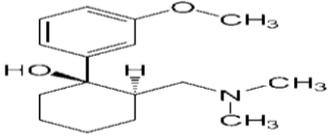
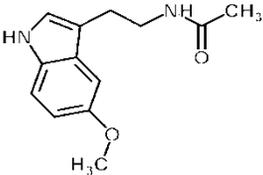
El estándar interno no debe tener ningún rastro significativo de analito (tolerado dentro de un pequeño tanto por ciento). Típicamente, la contribución debe ser menor que 20 % del Límite inferior de cuantificación del analito.

El estándar interno debe tener una masa de al menos 4 o 5 Da y más alta en megavatos que el analito.

La concentración que se utiliza para la preparación de muestras debe estar en la parte media de la curva de calibración. La optimización de la concentración del estándar interno es fundamental para evitar la supresión de iones por la coelución del analito, esto lleva a que la curva estándar no sea lineal.

**Tabla 10. Características de los Patrones Internos.**

Molécula	Propiedades fisicoquímicas	Ion padre/Ion hijo en ESI +
<p><b>Clorhidrato de propafenona</b></p>  <p>HCl</p>	<p><math>C_{21}H_{27}NO_3 \cdot HCl</math>  <b>PM:</b> 377.9g/mol  <b>pka:</b> 8.8  <b>Log P :</b> 3.93  <b>Solubilidad:</b> Agua caliente o alcohol;  ligeramente soluble en agua fría.</p>	<p><b>342 -324 m/z</b></p>
<p><b>Clopidogrel Bisulfato</b></p> 	<p><math>C_{16}H_{16}ClNO_2S</math>  <b>PM:</b> 321.82g/mol  <b>pka:</b> 5.14  <b>Log P :</b> 4.23±0.53  <b>Solubilidad:</b> Agua (50.78mg/L)</p>	<p><b>321.9 – 211.9 m/z</b>  <b>321.05 – 212 m/z</b></p>

<p style="text-align: center;"><b>Tramadol</b></p> 	<p style="text-align: center;"> <math>C_{16}H_{25}NO_2</math>  <b>PM:</b> 263.18g/mol  <b>pka:</b> 9.41  <b>Log P :</b> 2.4  <b>Solubilidad:</b> soluble en            diclorometano, metanol, agua         </p>	<p style="text-align: center;"><b>264.2-58.1 m/z</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>Melatonina</b></p> 	<p style="text-align: center;"> <math>C_{13}H_{16}N_2O_2</math>  <b>PM:</b> 232.28g/mol  <b>pka( ácidos fuertes):</b> 15.18  <b>pka(bases fuertes):</b> -0.94  <b>Log P :</b> 1.6  <b>Solubilidad:</b> Alta solubilidad en            solventes polares         </p>	<p style="text-align: center;"> <b>233.2-174.1m/z</b>  <b>233.2-159.1 m/z</b> </p>

### 6.6. Supresión Iónica.

Demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación de al menos 6 unidades de ésta. Analizar la matriz biológica normal y la hemolizada. Considerando posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que pueden estar presentes en la matriz biológica.

### 6.7. Efecto de matriz.

Analizar individualmente, al menos 6 unidades de matriz blanco, adicionalmente considerar al menos matriz biológica hemolizada.

Extraer cada muestra blanco de matriz, posteriormente adicionar el analito y el estándar interno en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente. Comparar las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y el estándar interno en solución. Para cada unidad se debe obtener un FMN (factor matriz normalizado) por el estándar interno, conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{[Respuesta\ del\ analito\ en\ la\ matriz / Respuesta\ del\ estándar\ interno\ en\ la\ matriz]}{[Respuesta\ del\ analito\ en\ solución / Respuesta\ del\ estándar\ interno\ en\ solución]}$$

El CV% del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15. Esta determinación debe ser realizada con la MCB (muestra control baja) y MCA (muestra control alta).

## 7. Resultados.

### 7.1. Cromatogramas de los Diferentes Tratamientos.

De la figura 21 a la figura 28 se muestran los cromatogramas obtenidos de las diferentes técnicas de tratamiento.

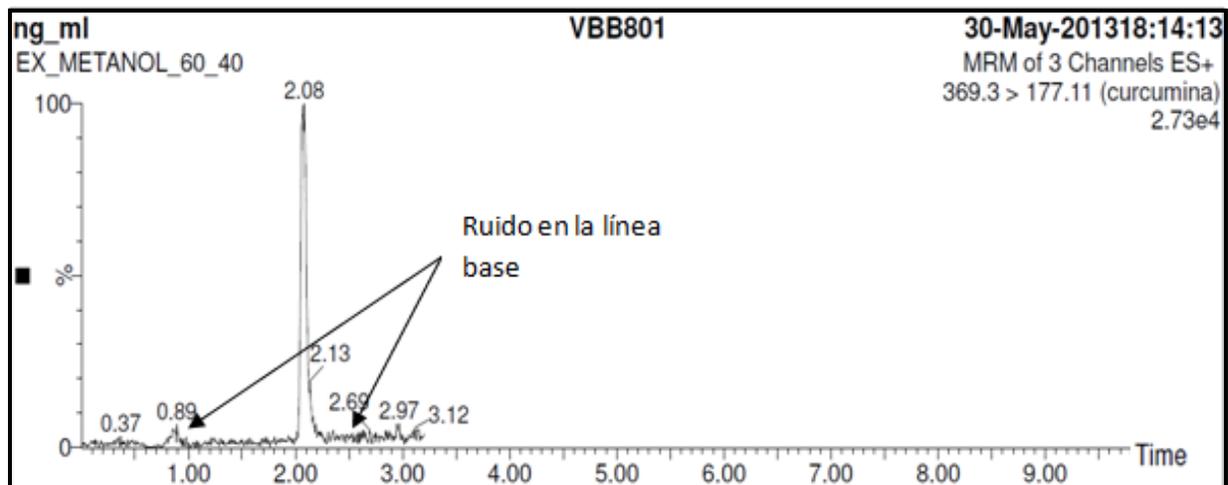


Figura 21. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con metanol.

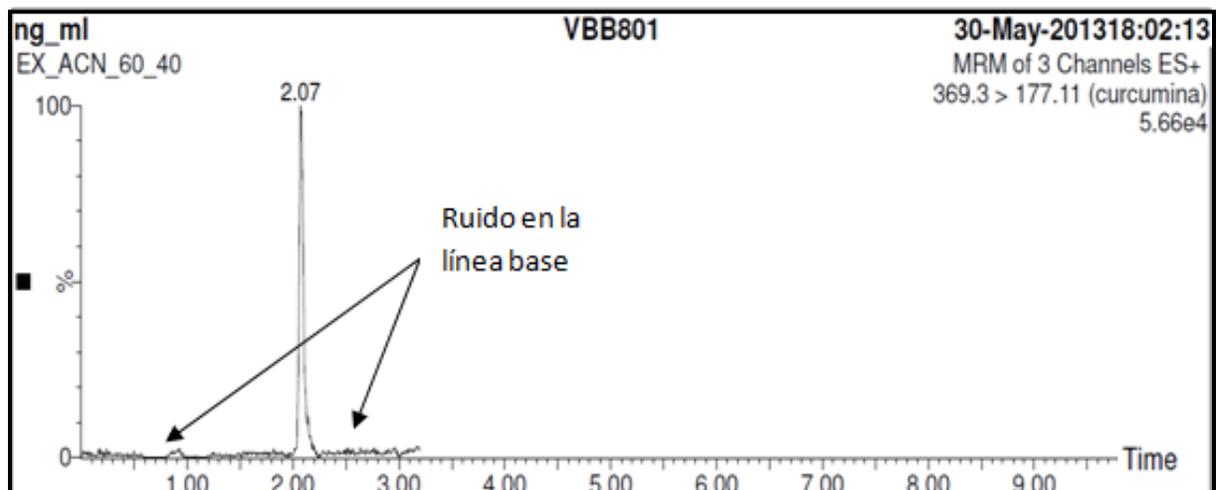


Figura 22. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con Acetronitilo.

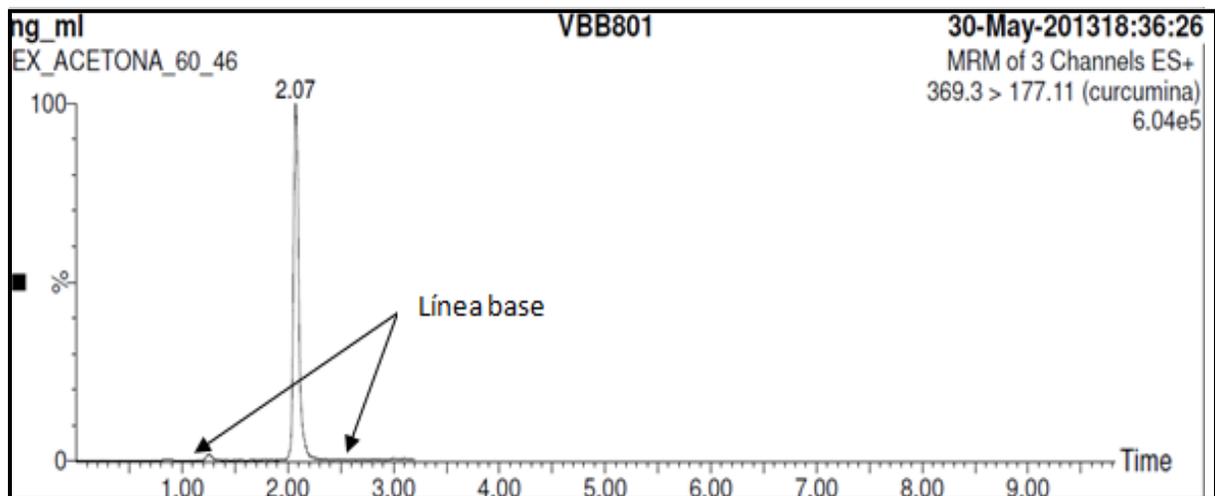


Figura 23. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica precipitación de proteínas con acetona fría (-20°C).

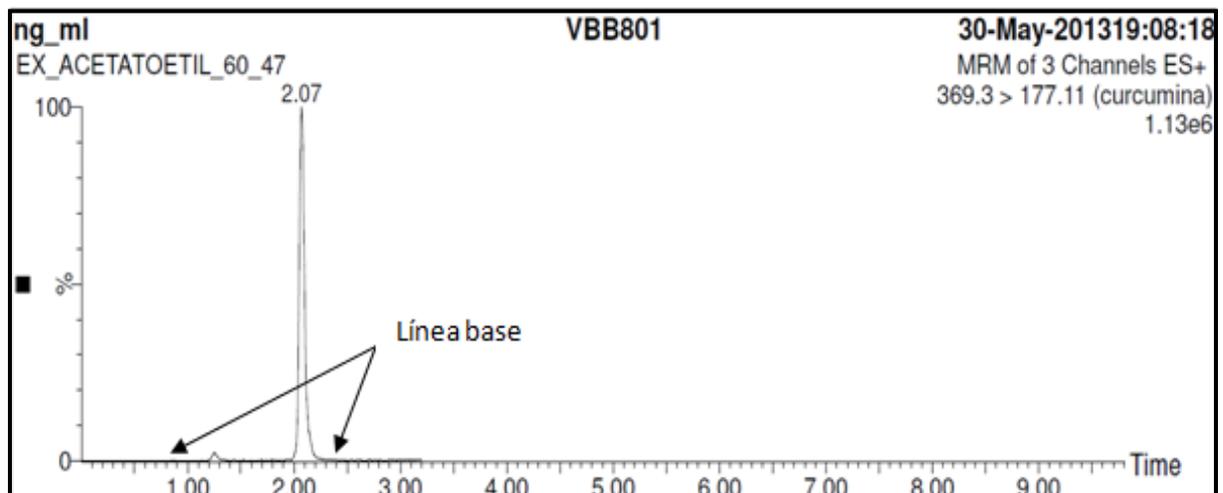


Figura 24. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Liquido-Liquido con Acetato de Etilo.

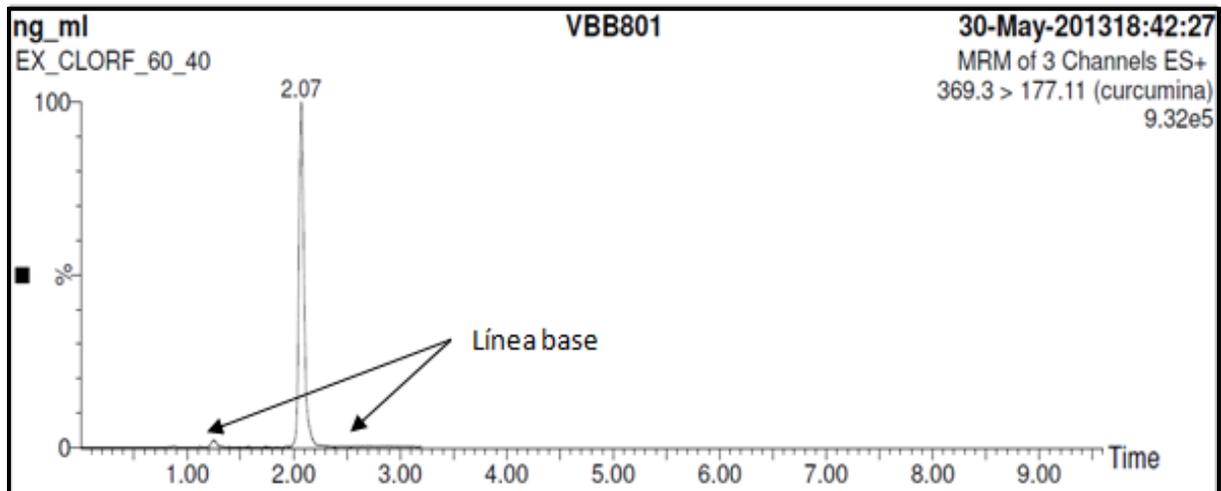


Figura 25. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Cloroformo.

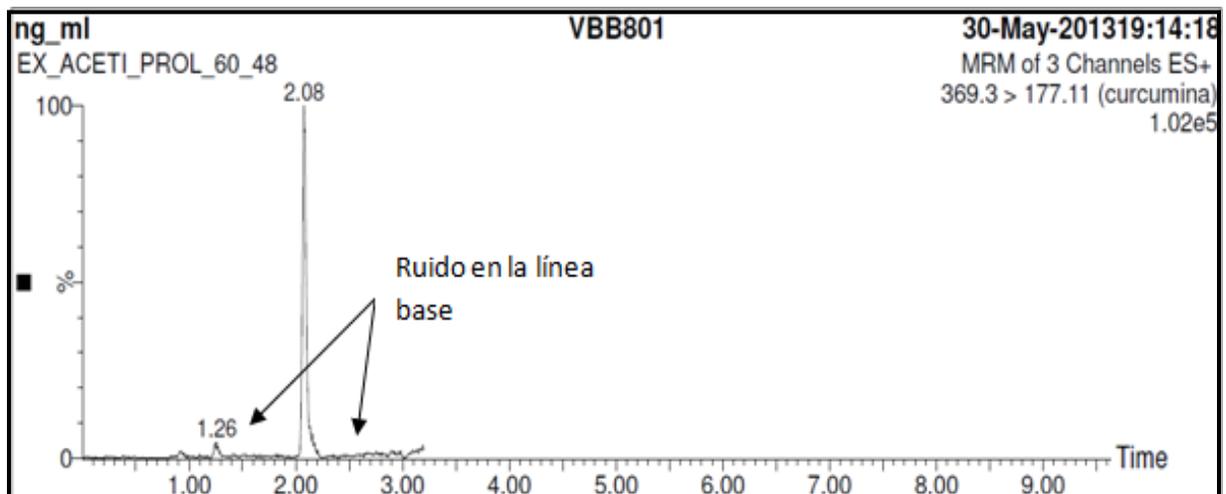


Figura 26. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo/n-propanol.

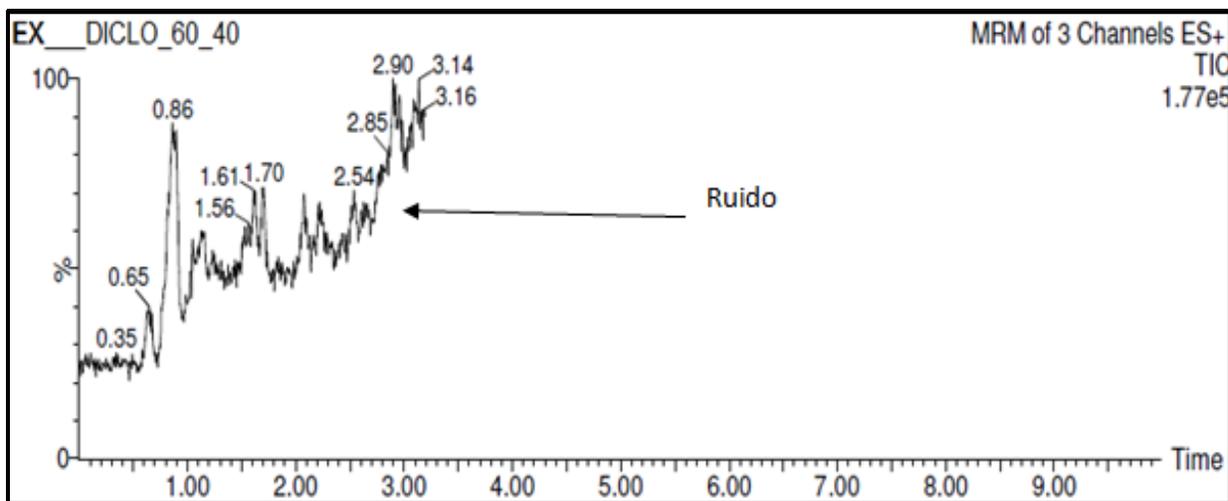


Figura 27. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción Líquido-Líquido con Diclorometano.

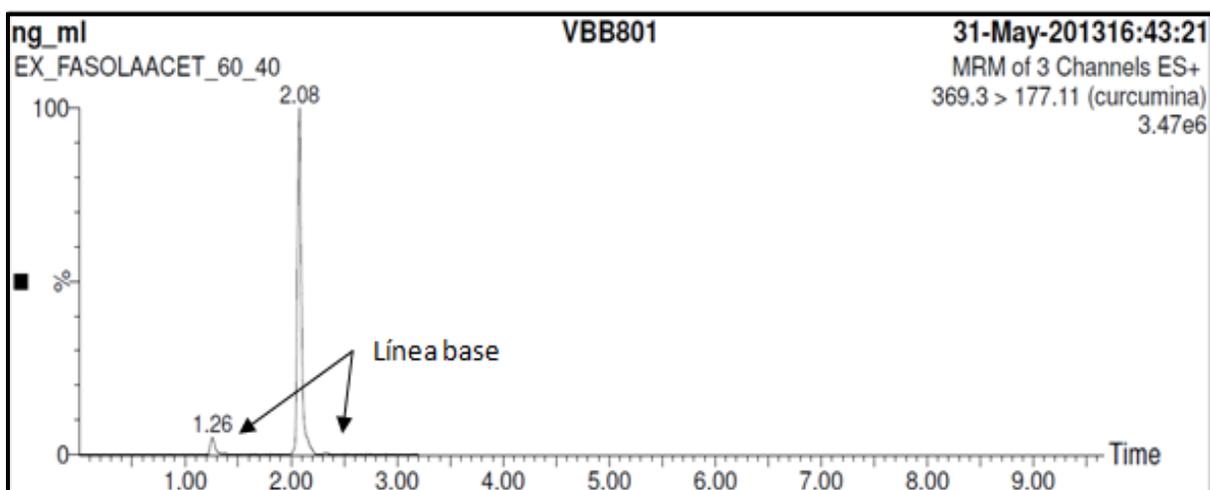


Figura 28. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina, realizada con la técnica Extracción fase sólida.

## 7.2. Evaluación de los Tratamientos para la extracción de curcumina en plasma.

### 7.2.1. Evaluación del procedimiento de las diferentes técnicas de tratamiento.

La tabla 11 muestra la evaluación de los procedimientos de los tratamientos de muestras.

**Tabla 11. Evaluación del procedimiento de las técnicas para separación de proteínas.**

<b>Punto crítico</b>	<b>Optimización</b>
<b>Cantidad de disolvente utilizados</b>	Se redujo al utilizar tubos eppendorf
<b>Tubos rotos</b>	Se soluciono al utilizar tubos eppendorf
<b>Separación de fases no adecuada</b>	Se soluciono al utilizar una microcentrifuga y las siguientes condiciones: 14000 rpm a 4°C, 15 minutos
<b>Homogenización de fases.</b>	Se redujo el tiempo de agitación en vortex de 5 min, 1 <i>speed</i> a 30 segundos, 9 <i>speed</i> , para asegurar una mejor homogenización de las dos fases.
<b>Se sustituyo la placa para vial de 2mL de 48 pozos y los viales con tapa</b>	Ya que se redujo las cantidades de solventes y la cantidad de plasma, se opto por usar las placas redondas de 1 mL.

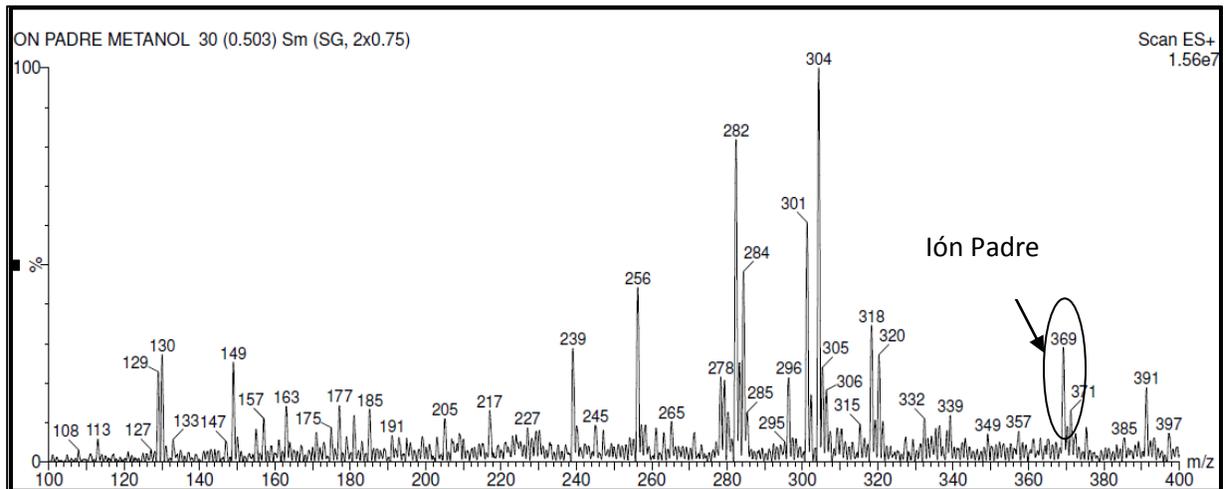
### 7.2.2. Preparación de una Solución Diluyente.

Esta solución diluyente se utilizo para reemplazar el metanol que se utilizaba para disolver la curcumina (figuras 29-32) y como fase móvil.

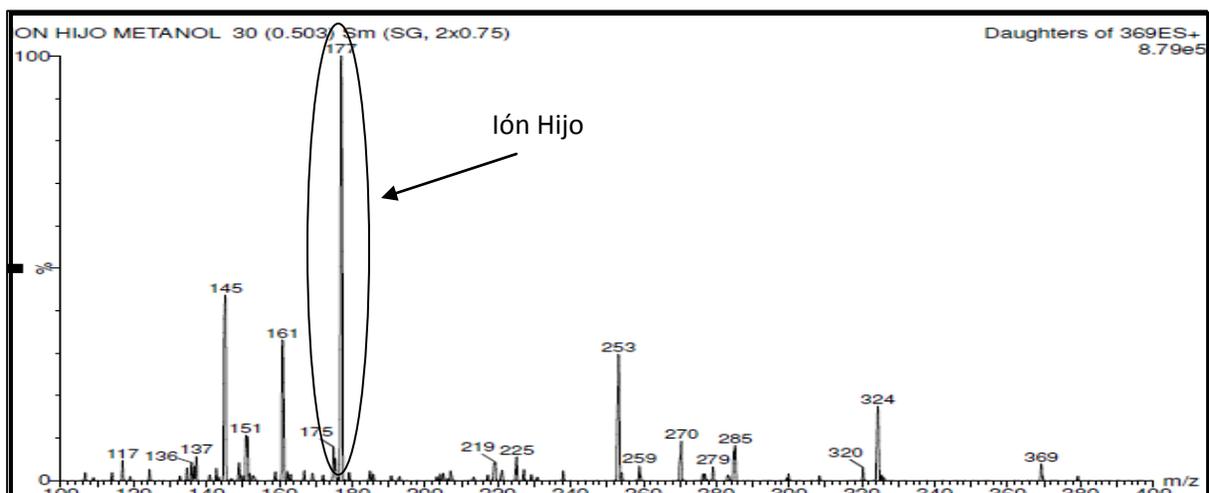
Preparación de la solución diluyente:

- Agregar a un matraz de 200 mL, 225 µL de Ácido Fórmico y aforar con agua Milli-Q (sol. A).
- Agregar a un matraz de 200 mL, 225 µL de Ácido Fórmico y aforar con acetonitrilo (sol. B).

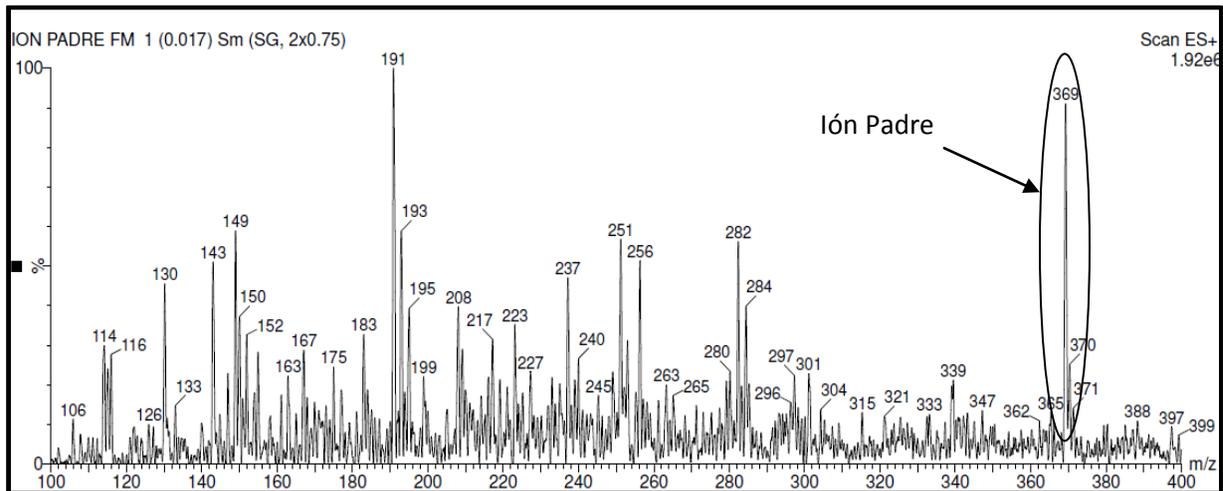
Se realiza una mezcla manual al 40 % de la solución A y 60% de la solución B.



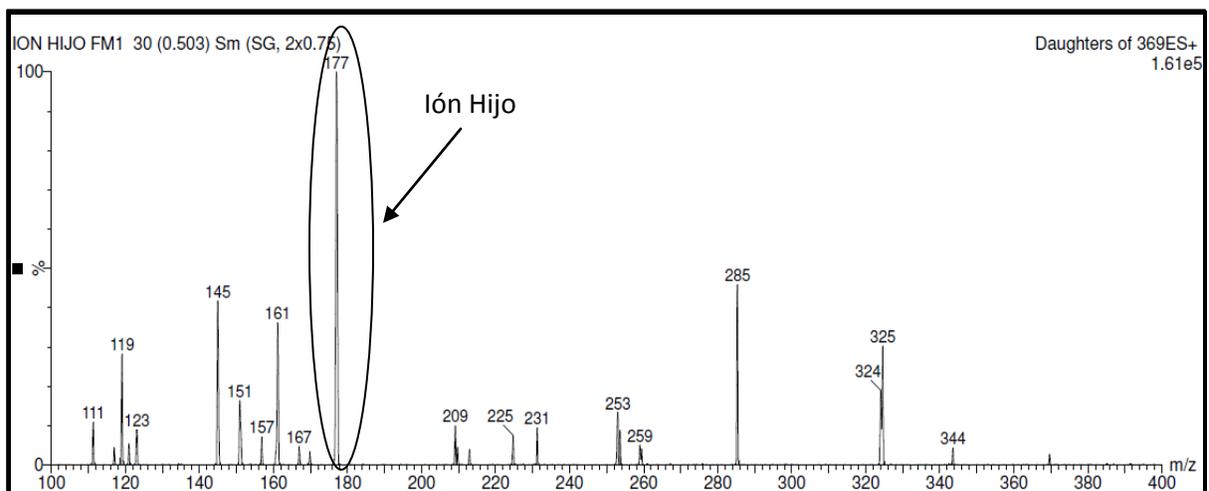
**Figura 29.** Espectro de masas que muestra la respuesta del Lón Padre que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio de disolución metanol.



**Figura 30.** Espectro de masas que muestra la respuesta del Lón Hijo que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio de disolución metanol.



**Figura 31. Espectro de masas que muestra la respuesta del Lón Padre que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente)**



**Figura 32. Espectro de masas que muestra la respuesta del Lón Hijo que existe en mayor proporción de la curcumina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).**

### 7.2.3. Determinación de proteínas en muestras plasmáticas por método espectrofotométrico.

La tabla 12 muestra el cociente  $A_{260}/A_{280}$  que se emplea para calcular la pureza de ácidos nucleicos o eliminación de proteínas en las muestras, dado que las proteínas absorben a 280 nm y la concentración de ácidos nucleicos en plasma suele determinarse a 260 nm.

**Tabla 12. Determinación del cociente de absorbancias para las técnicas de Precipitación de Proteínas y Extracción líquido-líquido.**

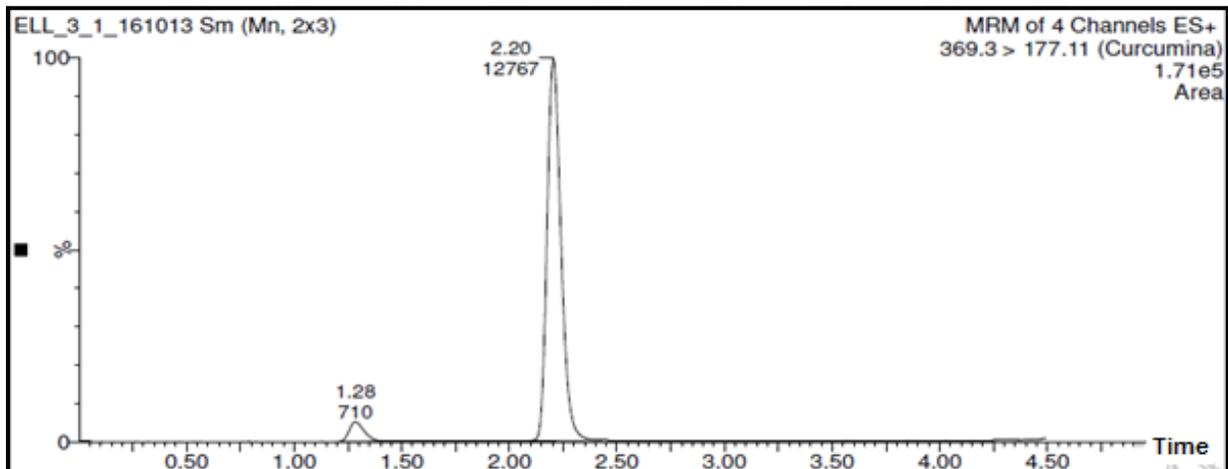
Tipo de extracción	Agente precipitante	ABS 260nm	ABS 280nm	Cociente $A_{260}/A_{280}$
Precipitación de proteínas	Metanol	1.5128	1.6526	0.9154
		2.3212	2.470	0.9397
	Acetonitrilo	0.1280	0.1409	0.9084
		0.1326	0.1453	0.9125
	Acetona fría a -20°C	0.0299	0.8605	0.0347
		0.0658	0.0887	0.7418
Extracción líquido-líquido	Cloroformo	0.1778	0.2249	0.7905
		0.1051	0.1266	0.8301
	Acetato de etilo	-0.4105	-0.4625	0.8875
		-0.4550	-0.5326	0.8542
	Diclorometano	0.1057	0.1233	0.8572
		0.1118	0.1365	0.8190
	Acetato de etilo /Diclorometano	0.1482	0.1625	0.912
		0.2680	0.3147	0.8516

### 7.2.4. Evaluación de temperatura para la Técnica de Extracción Líquido-Líquido.

En las figuras 33 – 35 se observa el área del pico y la tabla 13 muestra los resultados de la evaluación del tiempo en que tarda la temperatura en secar la muestra con respecto al porcentaje recuperado para el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.

**Tabla 13. Evaluación del tiempo y la temperatura con respecto al porcentaje recuperado.**

Temperatura (°C).	Tiempo de Evaporación.	Respuesta del estándar de Curcumina (Área)	Respuesta de curcumina en la muestra (Área)	% Recuperado
50	52 min,54 seg	23713	12767	53.840
		23191	12324	53.141
		23206	13551	58.394
70	2 min,43 seg	23713	17792	75.031
		23191	25951	111.901
		23206	26732	115.194
79	1 min,33 seg	23713	17731	74.773
		23191	28933	124.760
		23206	28665	123.524



**Figura 33. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 50°C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.**

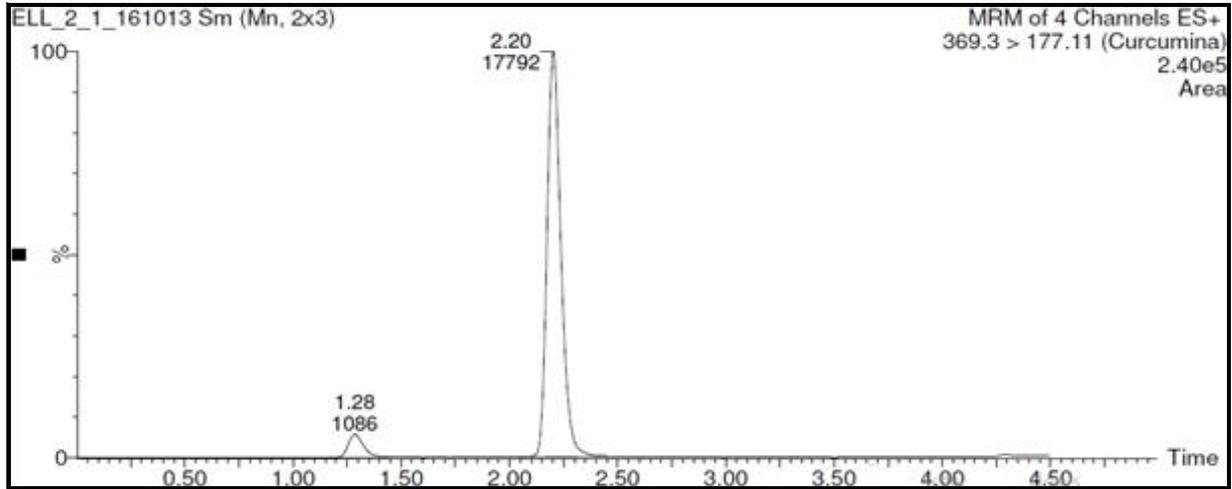


Figura 34. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 70°C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.

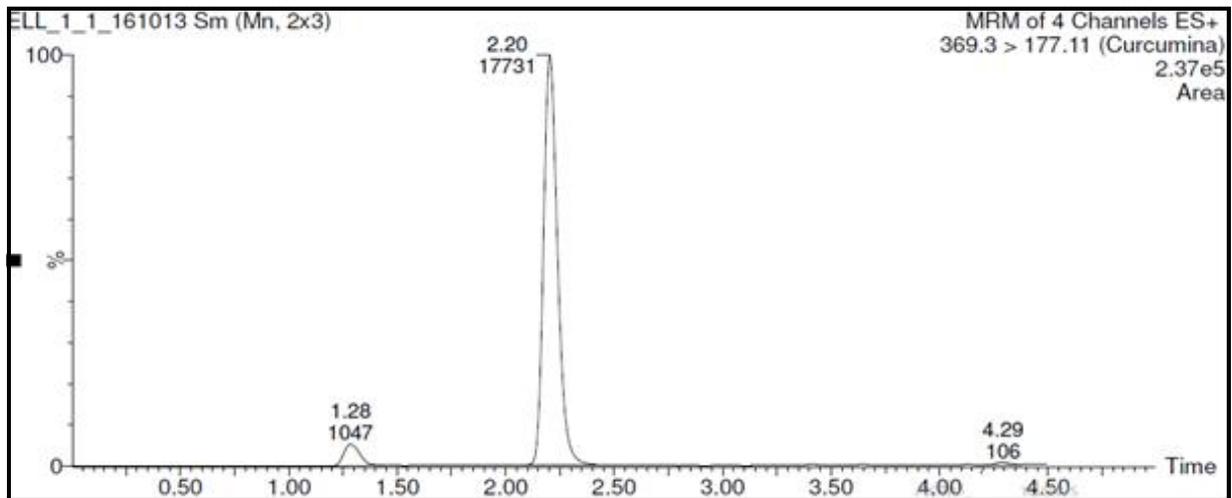
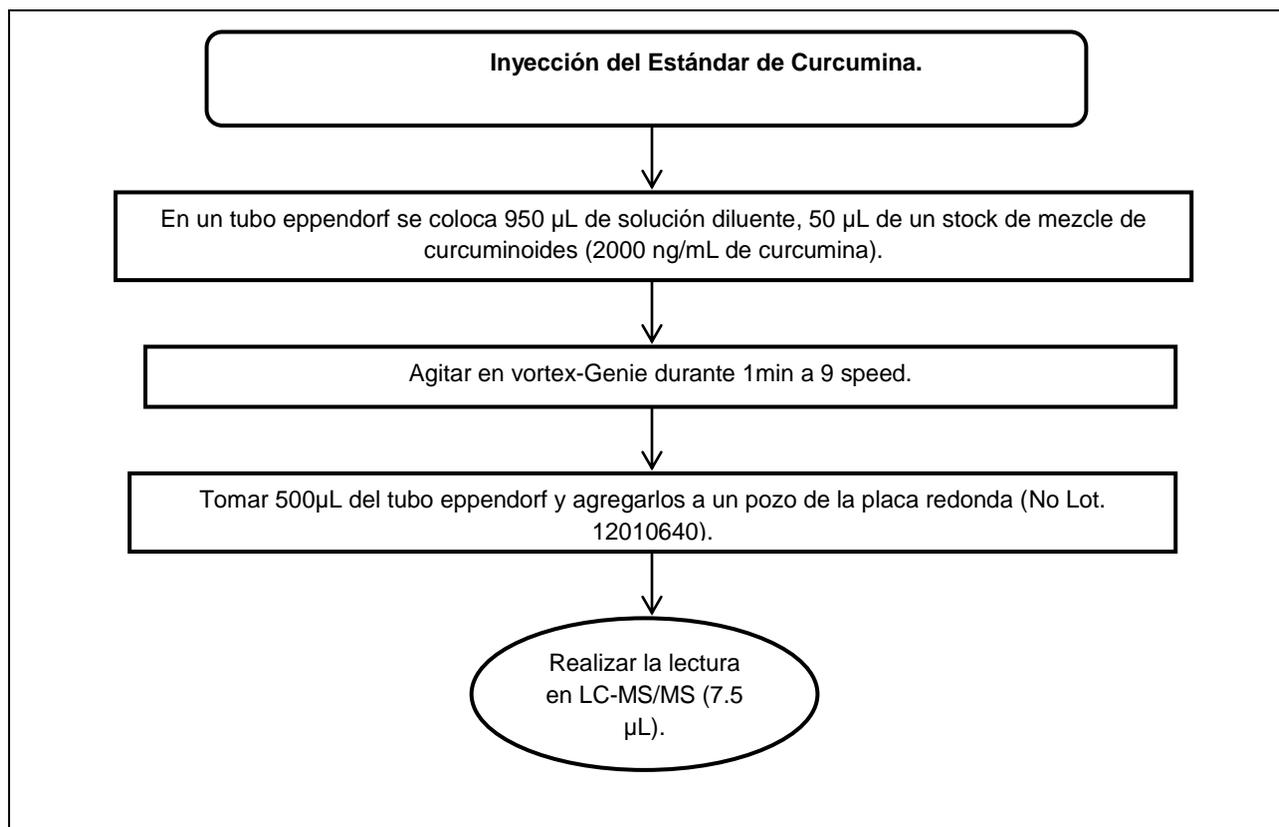


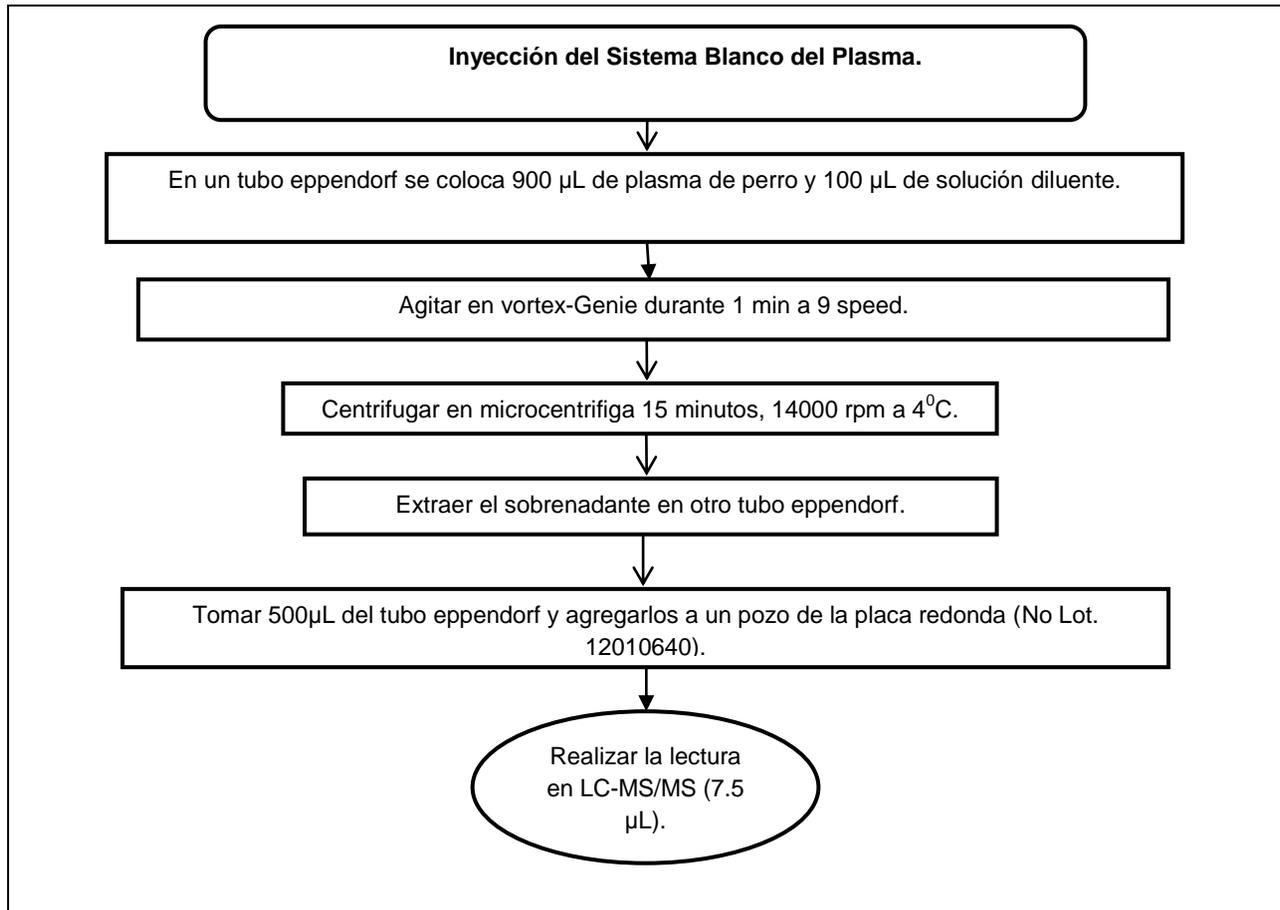
Figura 35 Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina a temperatura de 79°C con el tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.

### 7.3. Elección de la Técnica para la extracción de Curcumina en muestras plasmáticas.

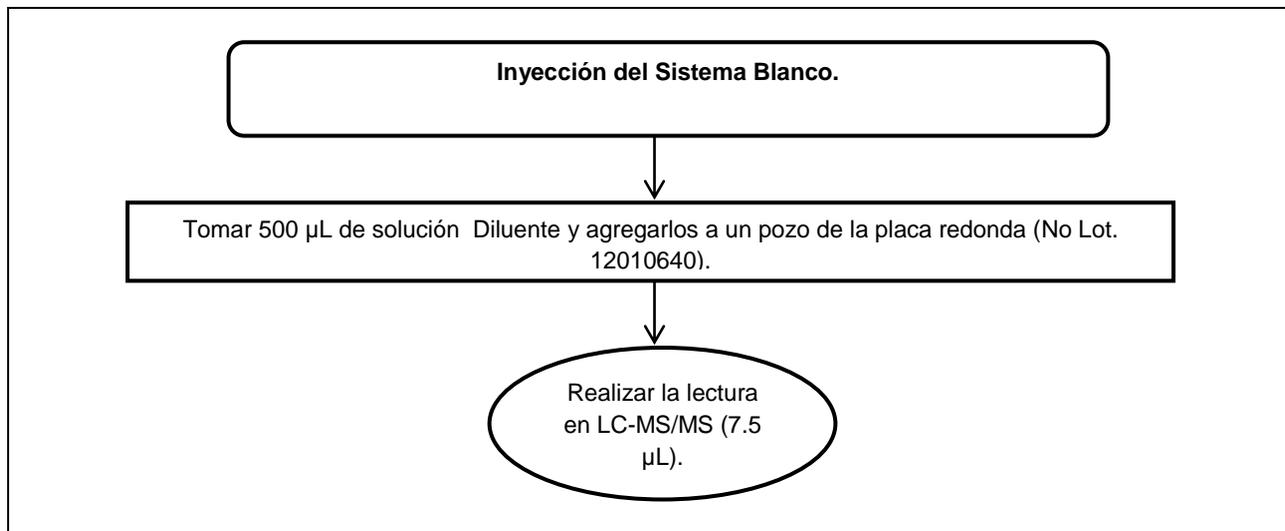
Una vez evaluado los diferentes tratamientos (precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido) se prosiguió a seleccionar la mejor técnica para extracción de curcumina en plasma, proponiendo los procedimientos para la inyección del estándar de curcumina (figura 37), la inyección del sistema blanco (figura 39) y la inyección del sistema blanco de plasma (figura 38) (figura 42 y 45). La elección solo se realizó entre las técnicas de precipitación de proteínas con: acetonitrilo (P.P.A.C.N.) (figura 46) y acetona fría (P.P.A.C.T.) (figura 47) (figura 40); y extracción líquido-líquido con: cloroformo (E.L.L.C.) (figura 43) y acetato de etilo (E.L.L.A.E.) (figura 44) (figura 41), (se descarto extracción en fase solida, véase análisis de resultados). De las tablas 14 a la 17 se pueden observar los respectivos porcentajes de recobro.



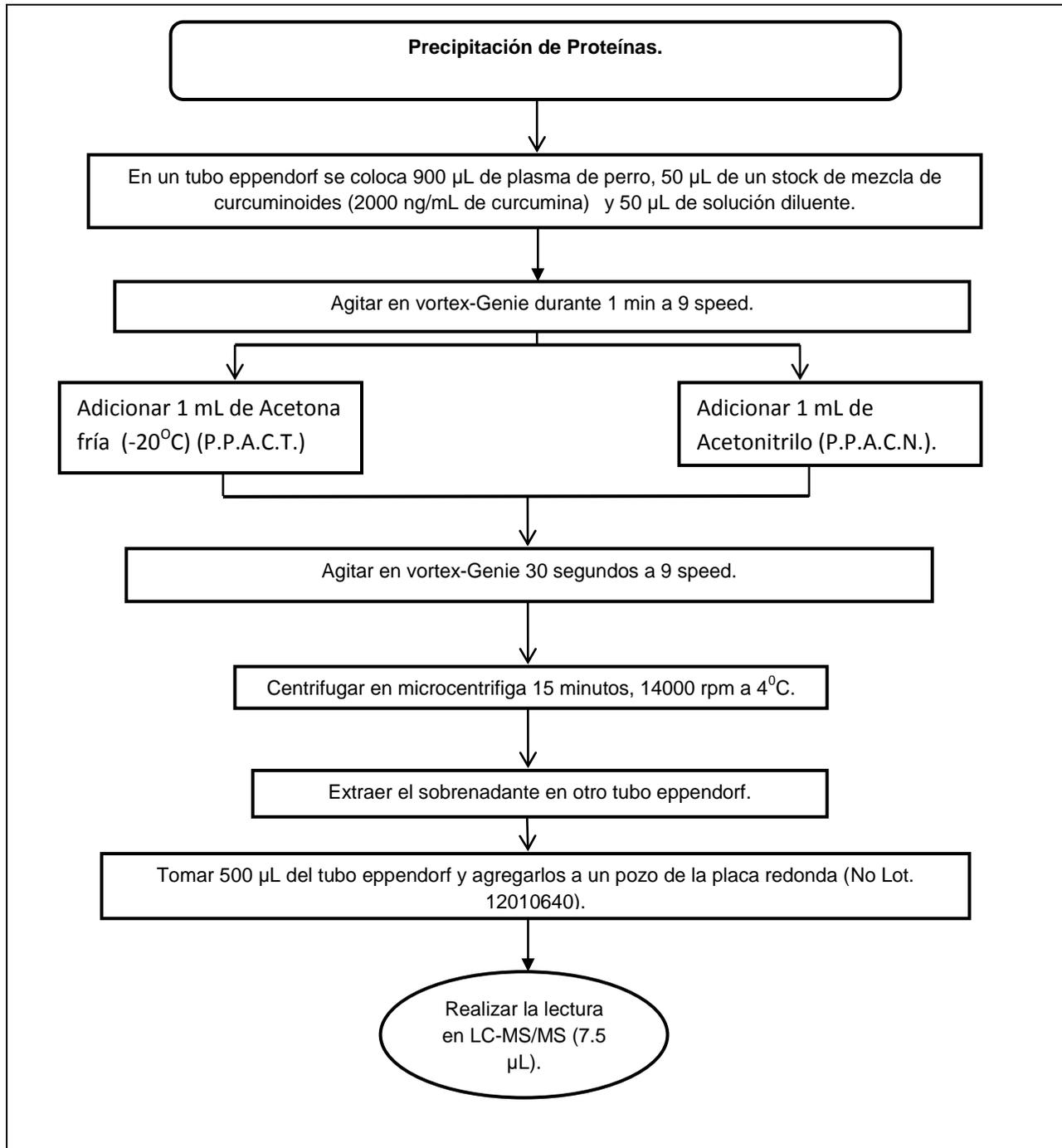
**Figura 37. Procedimiento para la Inyección del Estándar de Curcumina.**



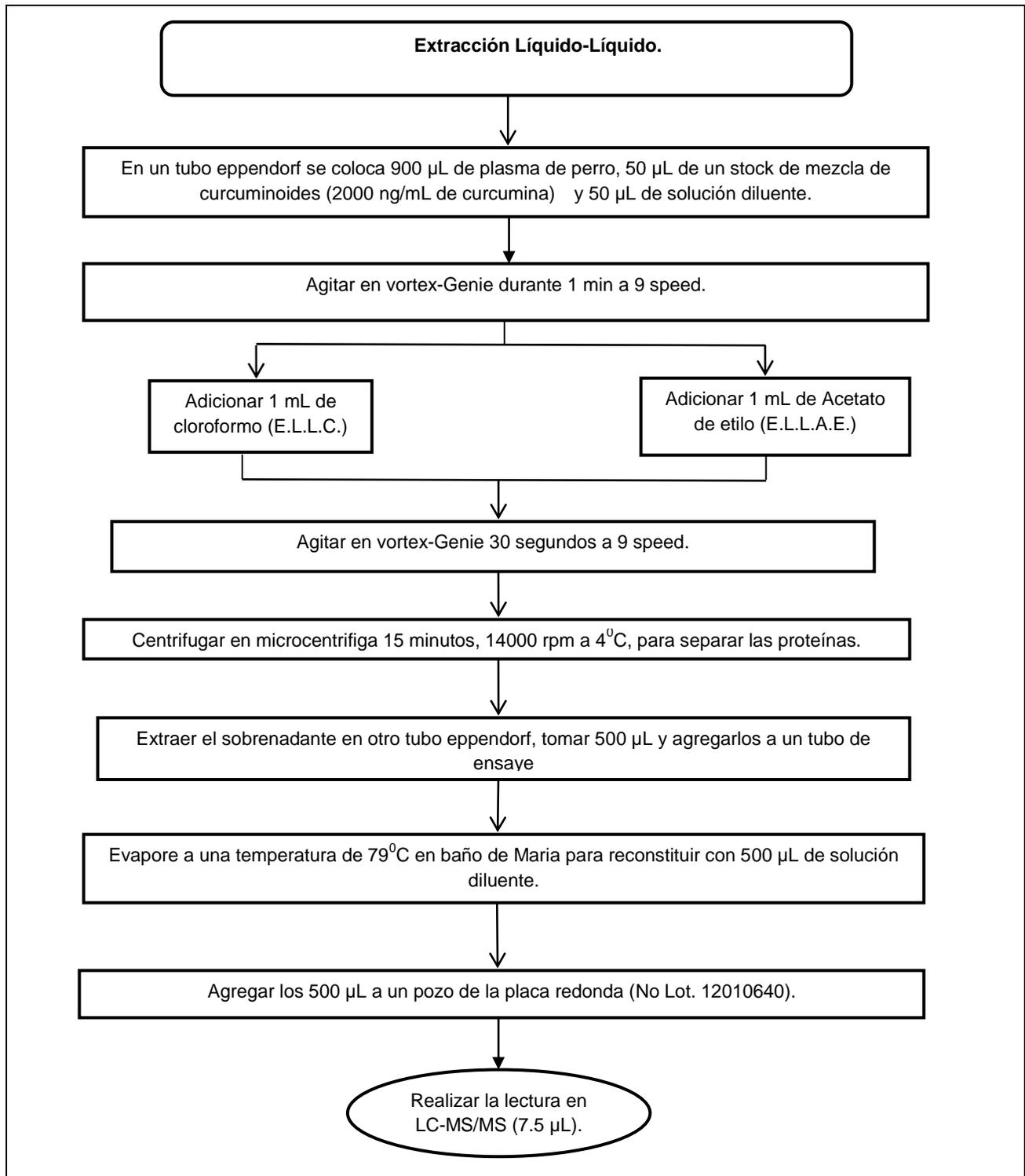
**Figura 38. Procedimiento para la Inyección del Sistema Blanco del Plasma.**



**Figura 39. Procedimiento para la Inyección del Sistema Blanco.**



**Figura 40. Procedimiento para de Técnica de Precipitación de Proteínas.**



**Figura 41. Procedimiento para de Técnica de Extracción Líquido-Líquido.**

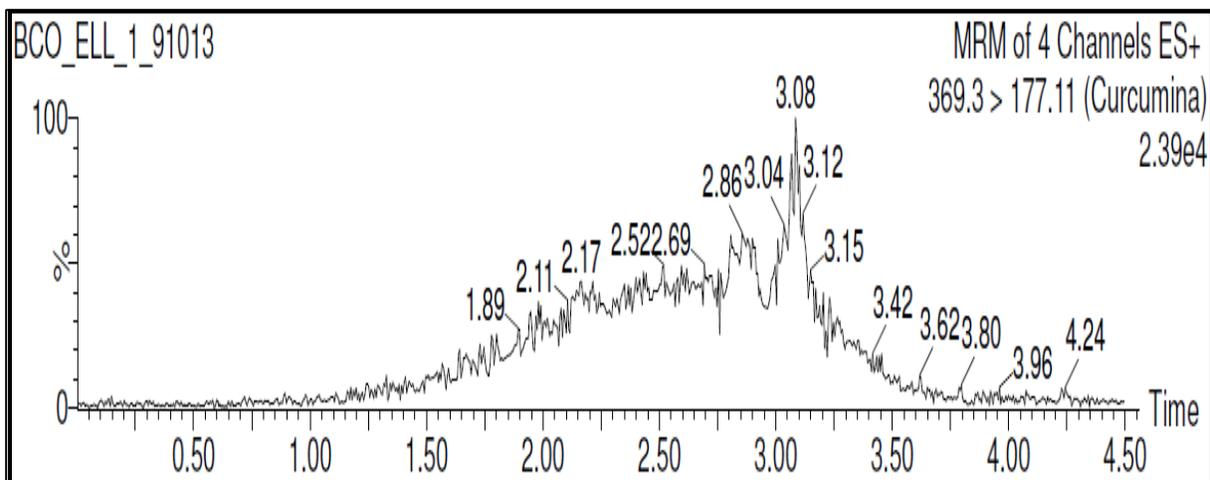


Figura 42. Cromatograma del Sistema blanco para la técnica extracción Líquido-Líquido.

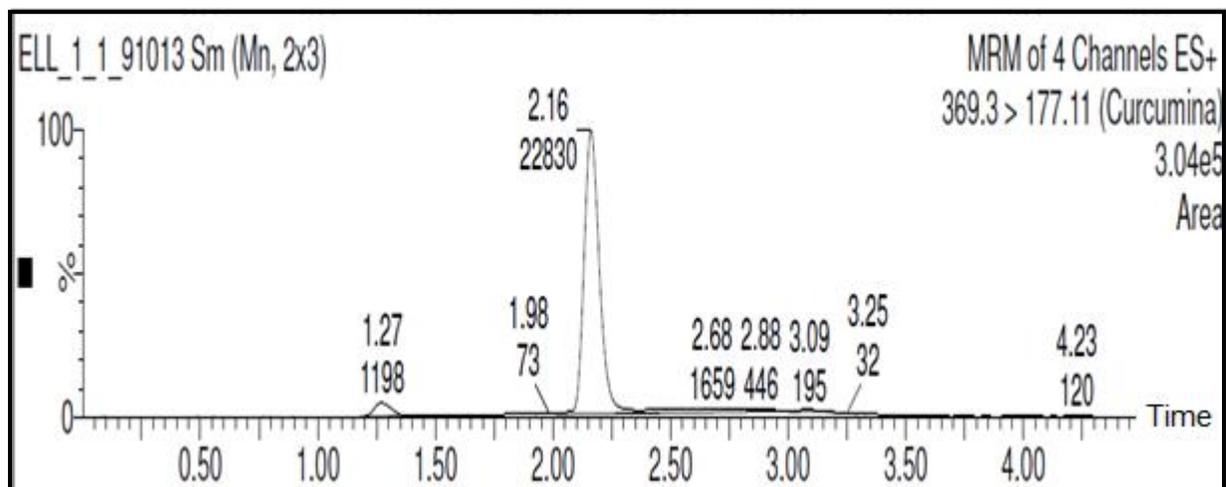
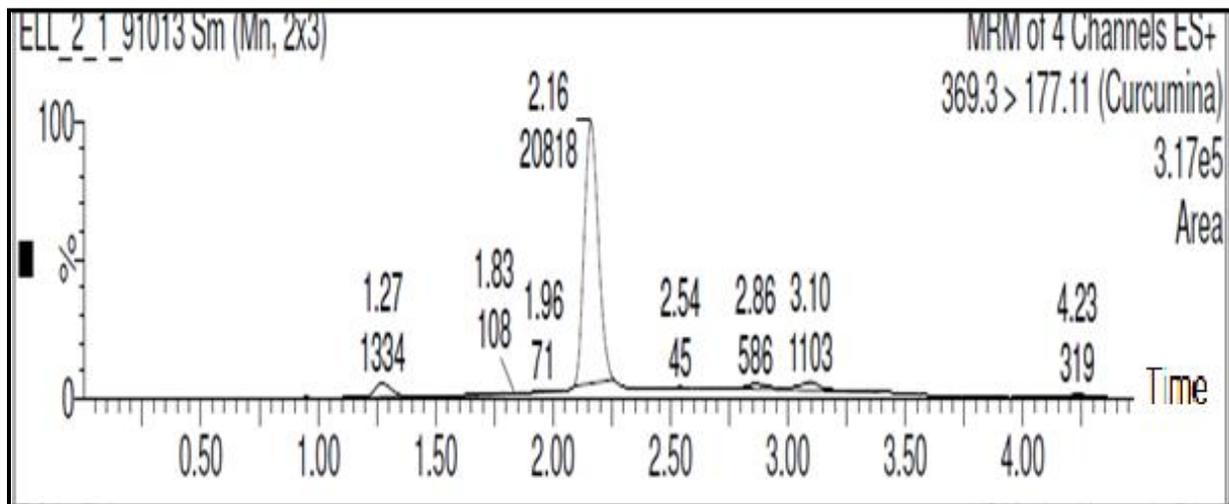
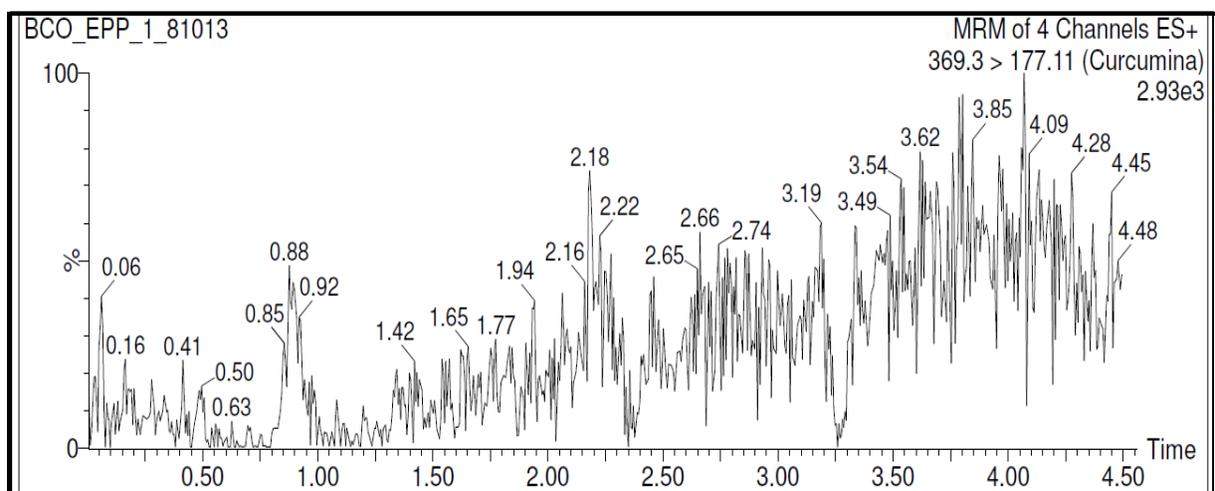


Figura 43. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica extracción Líquido-Líquido con cloroformo.



**Figura 44. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo.**



**Figura 45. Cromatograma del Sistema blanco para la técnica Precipitación de Proteínas.**

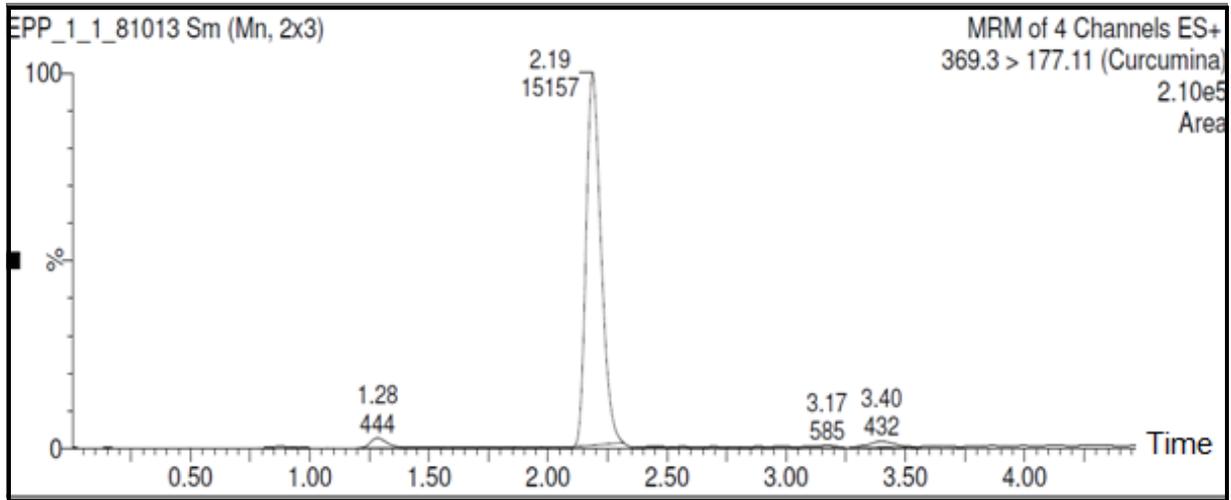


Figura 46. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica Precipitación de Proteínas con Acetonitrilo.

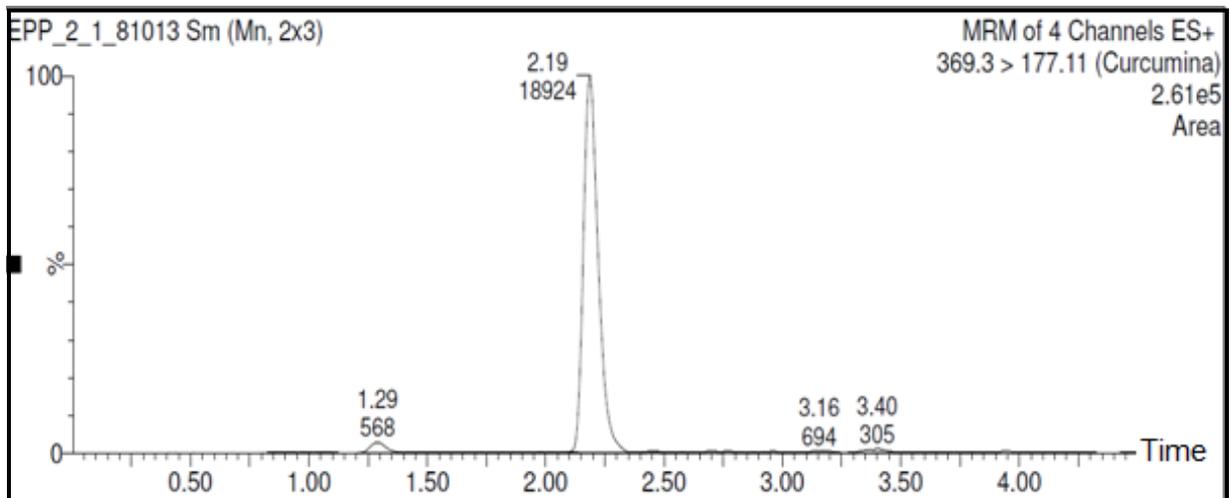


Figura 47. Cromatograma que muestra la respuesta de Curcumina para la técnica Precipitación de Proteínas con Acetona Fría (-20°C).

**Tabla 14. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Precipitación de Proteínas con Acetonitrilo.**

Concentración de curcumina	Área de la estándar de curcumina	Área del curcumina en la muestra	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	23713	15157	64.86
	23191	16733	71.60
	23206	15715	67.24
<b>Promedio</b>	23370.00	15868.33	67.90
<b>Desviación estándar</b>	297.14	799.11	3.42
<b>Coefficiente de variación</b>	1.27	5.04	5.04

**Tabla 15. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Precipitación de Proteínas con Acetona.**

Concentración de curcumina	Área de la curcumina en muestra	Área del curcumina en estándar	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	18924	23713	80.98
	19839	23191	84.89
	18856	23206	80.68
<b>Promedio</b>	19206.33	23370.00	82.18
<b>Desviación estándar</b>	548.96	297.14	2.35
<b>Coefficiente de variación</b>	2.86	1.27	2.86

**Tabla 16. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Extracción Líquido-Líquido con Cloroformo.**

Concentración de curcumina	Área de la curcumina en muestra	Área del estándar de curcumina	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	22830.00	23015	99.19
	24100.00		104.71
	28818.00	23002	125.21
	20468.00		88.93
	28552.00	23030	124.05
	32014.00		139.10
<b>Promedio</b>	26130.33	23015.67	113.53
<b>Desviación estándar</b>	4353.90	14.01	18.92
<b>Coefficiente de variación</b>	16.66	0.06	16.66

**Tabla 17. Porcentaje Recuperado de Curcumina en Extracción Líquido-Líquido con Acetato de Etilo.**

Concentración de curcumina	Área de la curcumina en muestra	Área del estándar de curcumina	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	20818.00	23015	90.45
	29256.00		127.11
	32933.00	23002	143.09
	21429.00		93.11
	25544.00	23030	110.99
	26669.00		115.87
<b>Promedio</b>	26108.17	23015.67	113.44
<b>Desviación estándar</b>	4626.02	14.01	20.10
<b>Coefficiente de variación</b>	17.72	0.06	17.72

### 7.3.1. Técnica seleccionada para la extracción de curcumina en plasma.

En la tabla 18 se muestra un resumen de los porcentajes de recobro para cada técnica evaluada. La selección de la técnica se realizó mediante el mayor porcentaje de recobro.

**Tabla 18. Resumen de los resultados de las diferentes Técnicas para la extracción de curcumina.**

	Acetato de Etilo	Cloroformo	Acetona Fría	Acetonitrilo
<b>Promedio del % recuperado</b>	113.44	113.53	82.18	67.90
<b>Desv. Del % recuperado</b>	20.10	18.92	2.35	3.42
<b>C.V. del % recuperado</b>	17.72	16.66	2.86	5.04

La técnica con mayor porcentaje de recobro es la de Extracción líquido-líquido con cloroformo, que tiene un C.V de 16.66% tiene un % de recuperación del 113.53.

## 7.4. Estándar Interno (EI).

### 7.4.1. Fragmentación del ión molecular

Se realizó una infusión directa de la solución de cada Estándar Interno (EI) (100 ng/mL) en solución diluyente, del cual se obtuvo el patrón de fragmentación del ión molecular (figuras 48, 50, 52 y 54) y posteriormente se obtuvo el tiempo de retención (figuras 49, 51, 53 y 54).

- I. Fragmentación del ión molecular del Clorhidrato de Propafenona 342.26m/z.

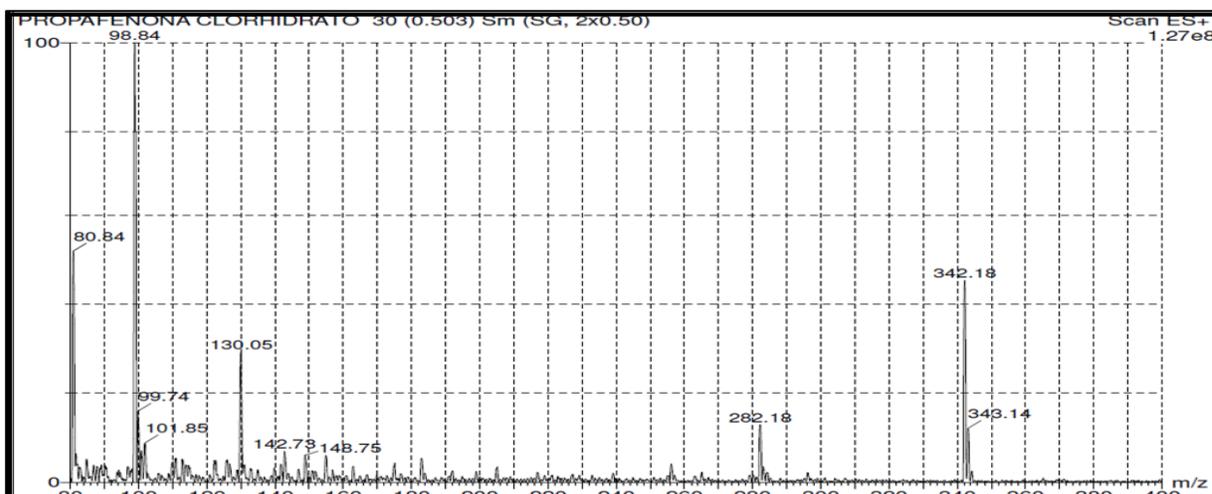


Figura 48. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre del clorhidrato de propafenona empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).

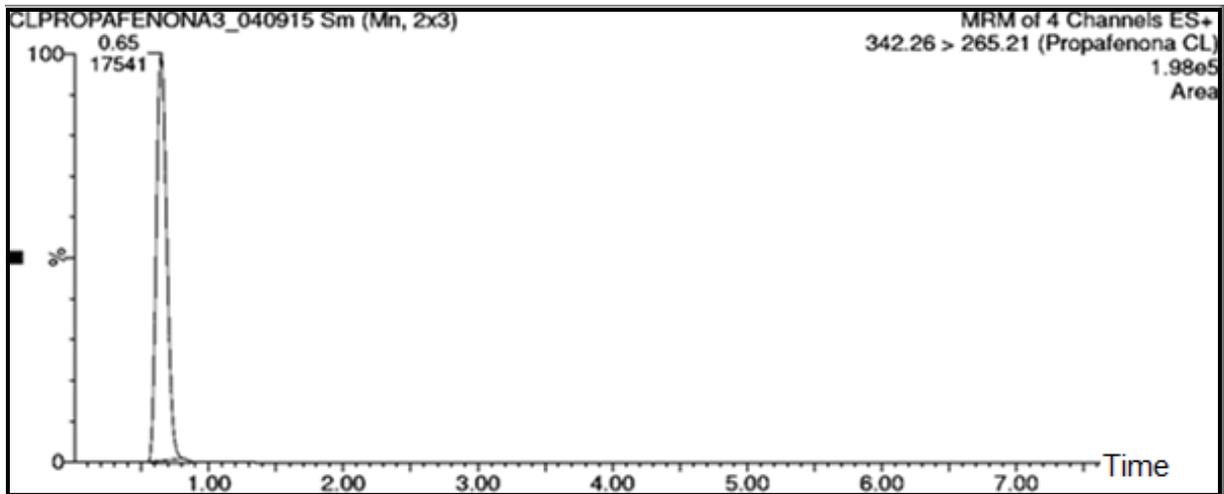


Figura 49. Cromatograma que muestra el tiempo de retención del clorhidrato de propafenona.

## II. Fragmentación del ión molecular del Clopidogrel Bisulfato 322 m/z.

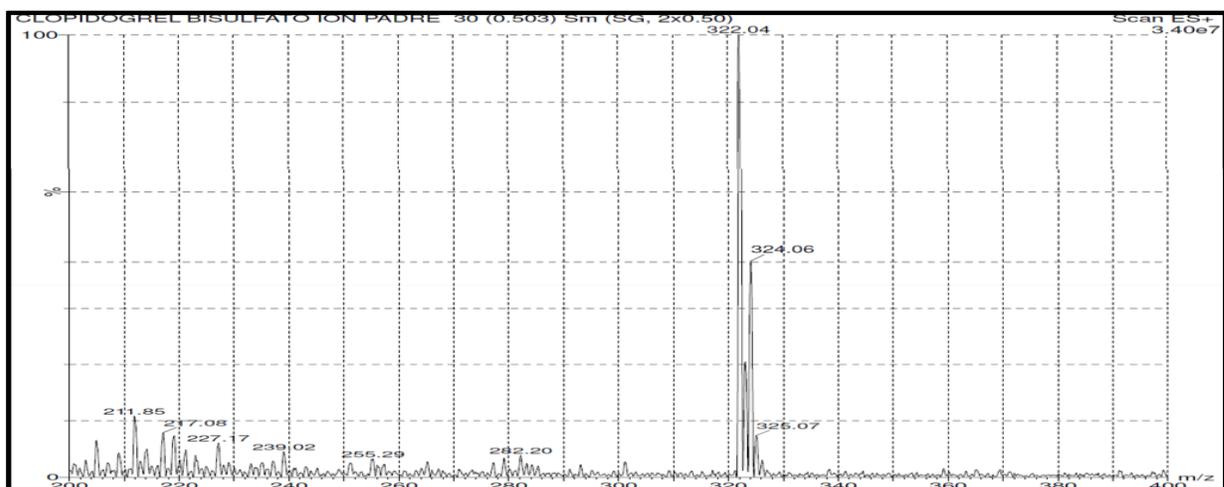


Figura 50. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre de Clopidogrel bisulfato empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).

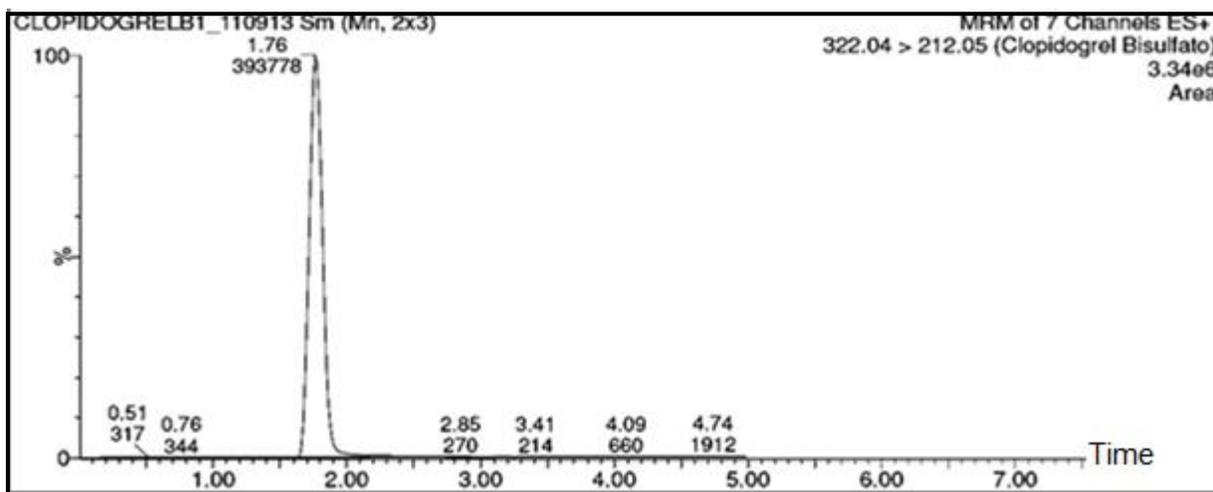


Figura 51. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Clopidogrel bisulfato.

III. Fragmentación del ión molecular del Tramadol 264.2 m/z.

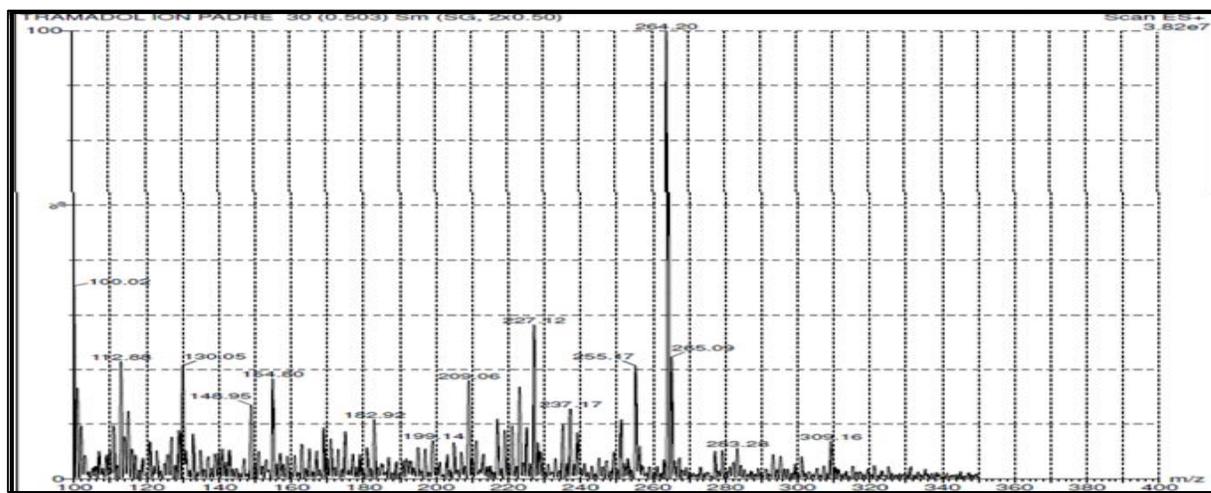


Figura 52. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre del Tramadol empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).

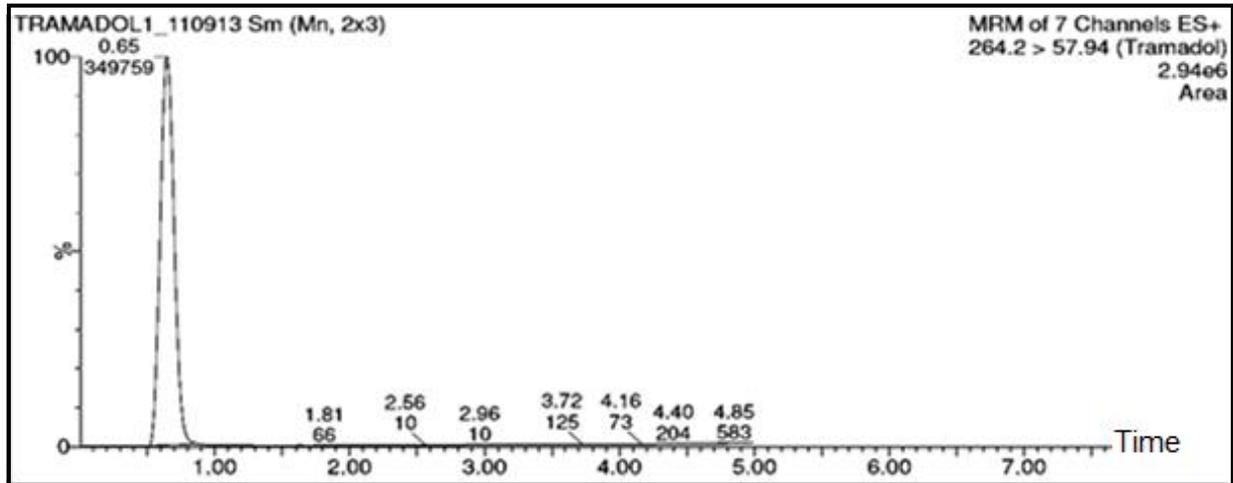


Figura 53. Cromatograma que muestra el tiempo de retención del Tramadol.

#### IV. Fragmentación del ión molecular de Melatonina 233.11m/z.

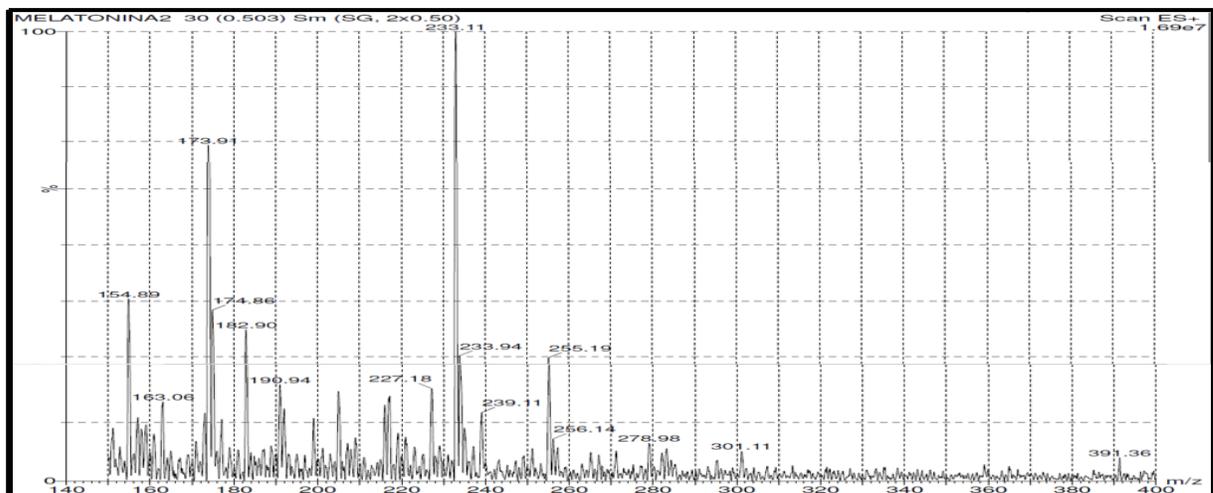
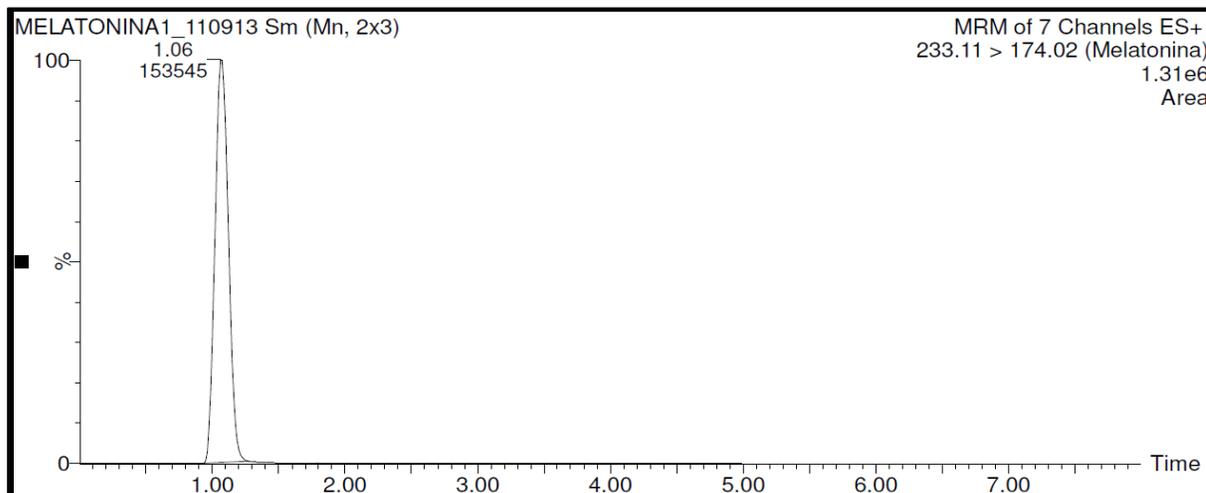


Figura 54. Espectro de masas que muestra la fragmentación del Ión Padre de Melatonina empleando como medio una mezcla de 60:40, AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q, respectivamente (solución diluyente).



**Figura 55. Cromatograma que muestra el tiempo de retención de Melatonina.**

#### 7.4.2. Elección del Estándar Interno.

La tabla 19 presenta un resumen de los patrones de fragmentación de los Estándares Interno.

**Tabla 19. Características cromatográficas de los Estándares Internos.**

Estándar interno	Tiempo de retención (rt)	Área	Intensidad del Ión	m/z
Clorhidrato de propafenona	0.65	17541	1.98e5	342.26 > 265.21
Clopidogrel Bisulfato	1.84	393778	3.34e6	322 > 212.05
Tramadol	0.65	349759	2.94e6	264.2 > 57.94
Melatonina	1.06	153545	1.31e6	233.11 > 174.02

Se procedió a realizar una curva de calibración con diferentes proporciones de melatonina, con y sin curcumina, ya que se observó que la respuesta de la melatonina no permanecía constante. La tabla 20 muestra los resultados de la curva de calibración.

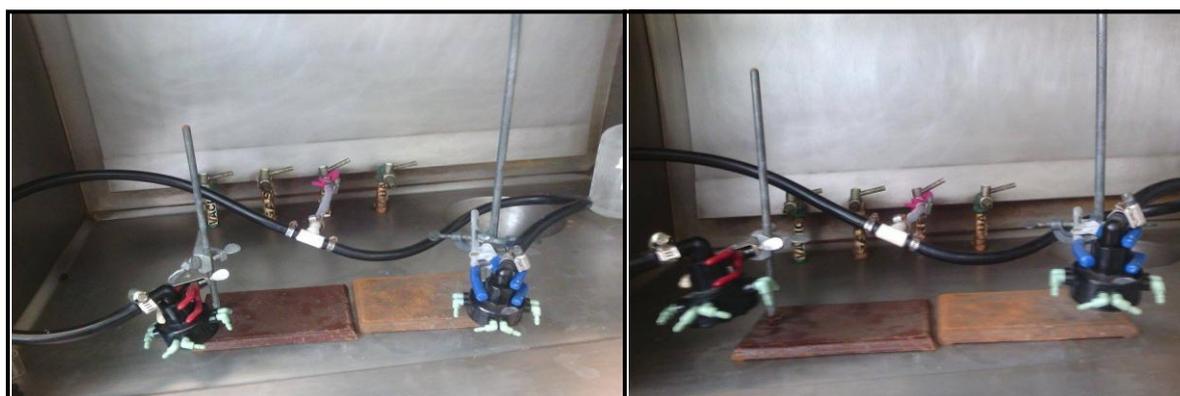
**Tabla 20. Curva de calibración de Malatonina con adición de curcumina (100 ng/mL).**

Concentración de melatonina (ng/ml)	Concentración de curcumina (ng/mL)	Área de melatonina sin Curcumina	Área de curcumina sin melatonina	Área de curcumina con melatonina	Área de melatonina con curcumina
0.1	100 ng/mL	841	26280	25753	13195
0.25		1586		28746	18035
0.5		6957	26585	12535	
0.75		9124	26632	11088	
1		15079	22957	26046	10161
2		47363		24174	41135

Se pensó que la temperatura pudiera estar relacionada con la inestabilidad de los Estándares Internos en los sistemas, se elaboró un mejor sistema de secado de la muestra sin tener que utilizar temperatura (figura 56).

El sistema consta de:

1. Dos sistemas de riego.
2. Manguera negra de polietileno.
3. Dos soportes universales
4. Dos pinzas con nuez.
5. Sistema de aire.
6. Una pieza en T



**Figura 56. Sistema de secado de las muestras.**

## 7.5. Optimización de la Técnica de Extracción Líquido-Líquido con Cloroformo y el Estándar Interno.

Una vez que se montó el sistema de secado de muestras se observó que el estándar interno (EI) que es estable en el cloroformo y no mostró comportamientos de degradación o problemas de supresión como los otros estándares internos evaluados fue el Clopidogrel Bisulfato.

Se realizó la optimización de procedimiento para la Extracción líquido-líquido (figura 57).

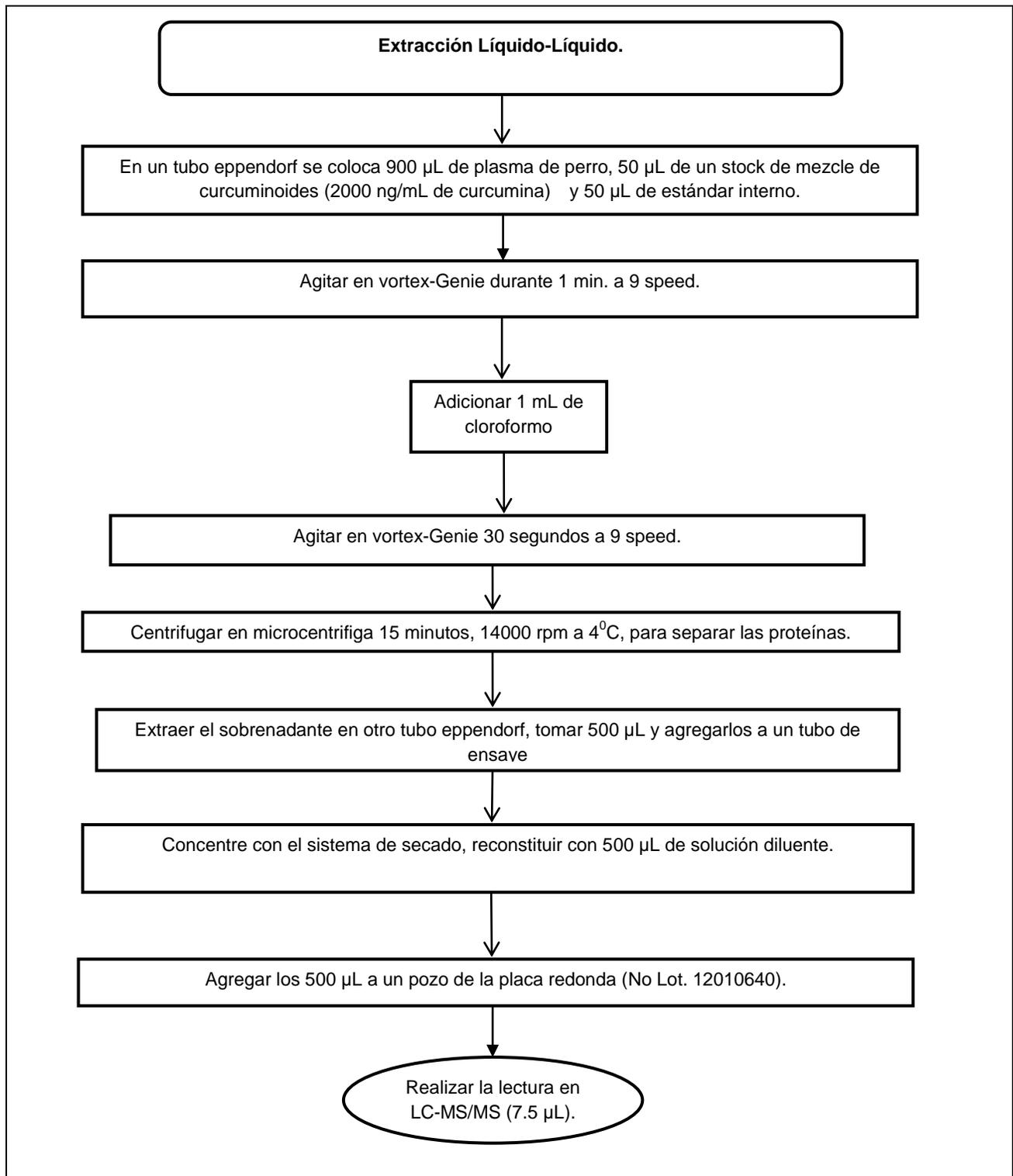
Se preparó una curva, por triplicado, al menos con 5 puntos de concentración, sin incluir el punto cero para la evaluación del estándar interno y la técnica de extracción (figura 58).

En la tabla 21 se presentan los valores individuales de la concentración recuperada de la curva de calibración, así como su promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el % de desviación absoluta.

Para obtener la concentración de Curcumina se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Area Curcumina} * \frac{\text{Concentracion EI}}{\text{Area EI}} = \text{Concentracion de Curcumina.}$$

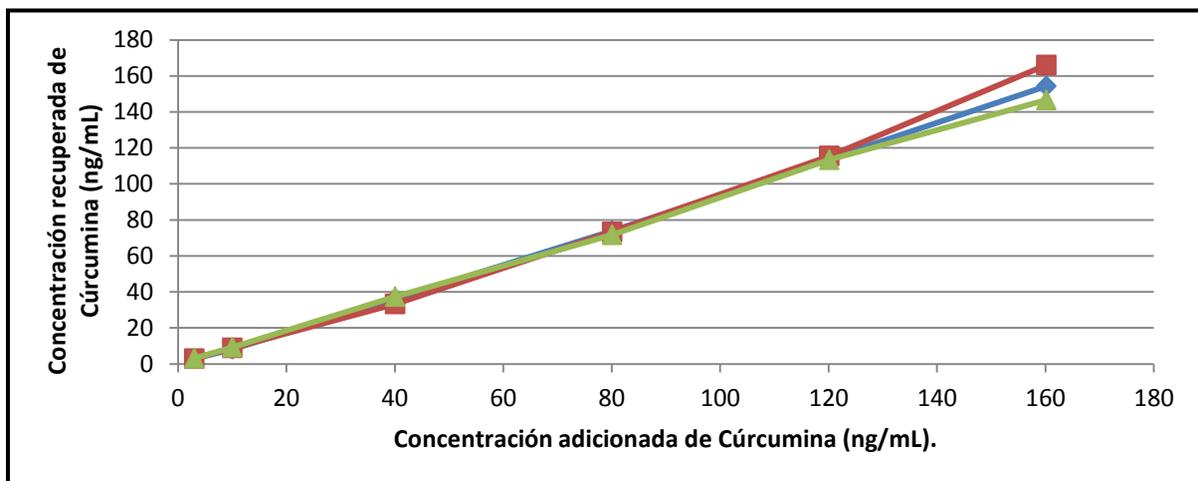
Criterios de aceptación: El método es lineal si el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las curvas y de todos los datos (global) es igual o mayor que 0.98 y los valores del coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración deben ser menores o iguales al 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo, el cual puede tener un porcentaje de desviación absoluta menor o igual al 20%.



**Figura 57. Optimización de la Técnica de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo.**

**Tabla 21. Curva que evalúa la Técnica de Extracción líquido-líquido con cloroformo.**

Concentración real de curcumina (ng/mL)							
	3.00	10.01	40.04	80.08	120.12	160.16	
Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)							
Curva	2.90	8.20	36.20	73.9	113.90	154.30	
	2.90	8.9	33.3	73.3	115.50	166.0	
	3.10	9.3	37.4	71.7	113.40	146.6	
Promedio	2.97	8.80	35.63	72.97	114.27	155.63	
Desv.std	0.12	0.56	2.11	1.14	1.10	9.77	
%C.V.	3.89	6.33	5.92	1.56	0.96	6.28	
%D.ABS.	1.12	13.75	12.37	9.75	5.12	2.91	
$\Sigma r^2$							0.9972



**Figura 58. Cantidad adicionado de curcumina en función de la cantidad recuperada de curcumina contenido en los placebos cargados de plasma.**

### 7.6. Supresión iónica.

Se evaluó la supresión de iones que pudiera existir por efecto de los anticoagulantes como la heparina (figuras 67-71) y el EDTA (figuras 62-66), se realizó un blanco de plasma de los mismos, posteriormente se infundió Curcumina a dos concentraciones (3 ng/mL y 160 ng/mL) (figuras 60 y 61) y Clopidogrel Bisulfato (40 ng/mL) (figura 59).

### 7.6.1. Inyección de la Curcumina y del Estándar Interno.

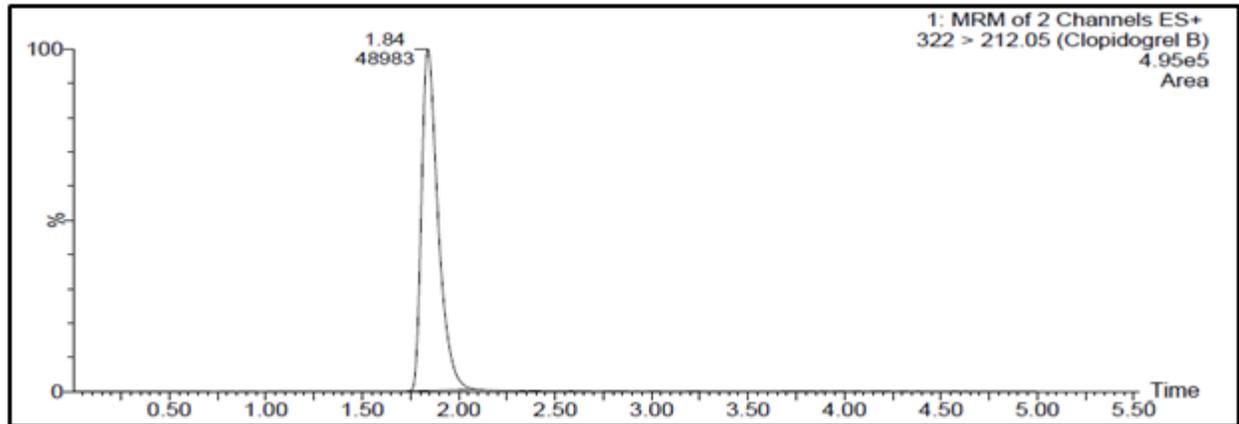


Figura 59. Cromatograma del Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.

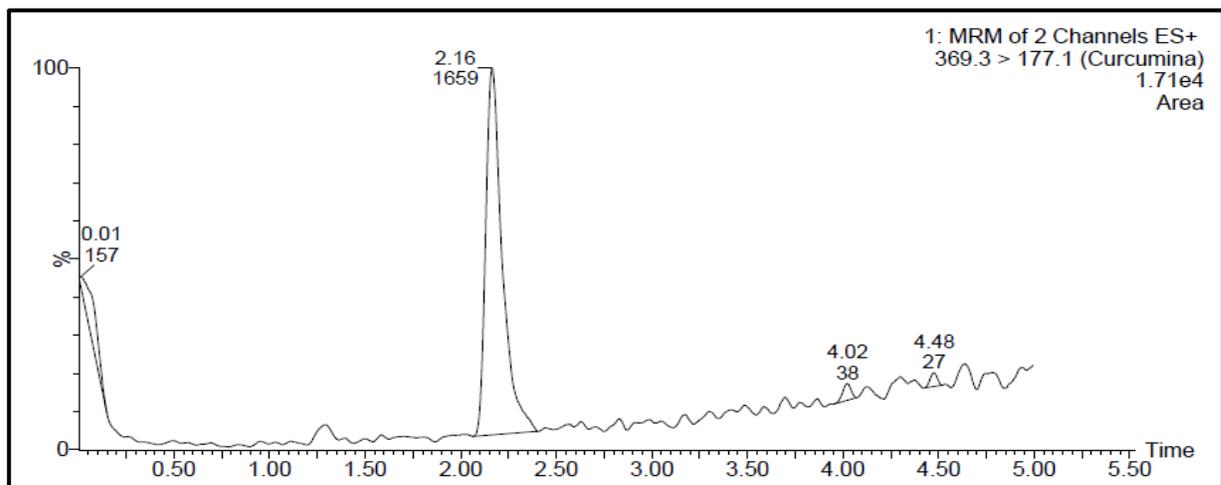
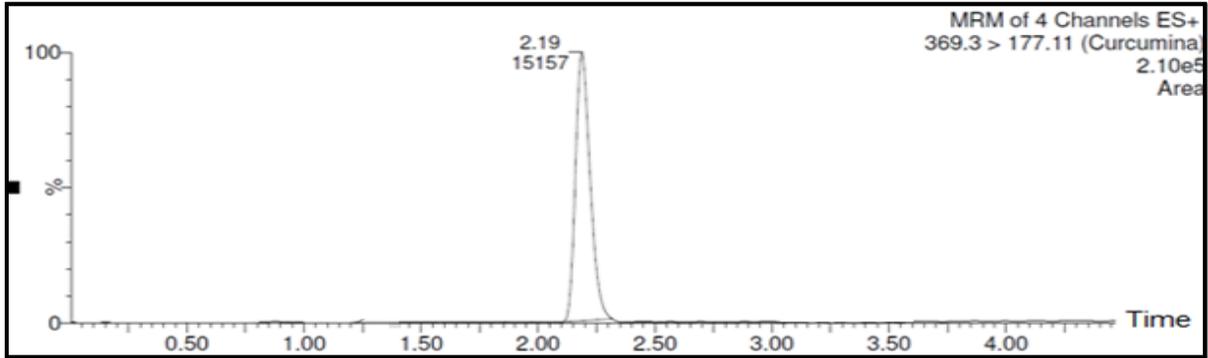
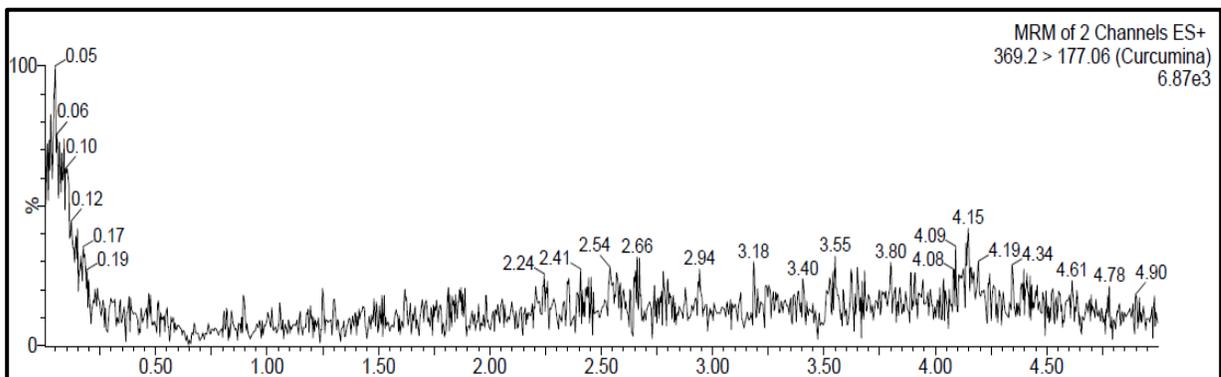


Figura 60. Cromatograma del Estándar de Curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente.

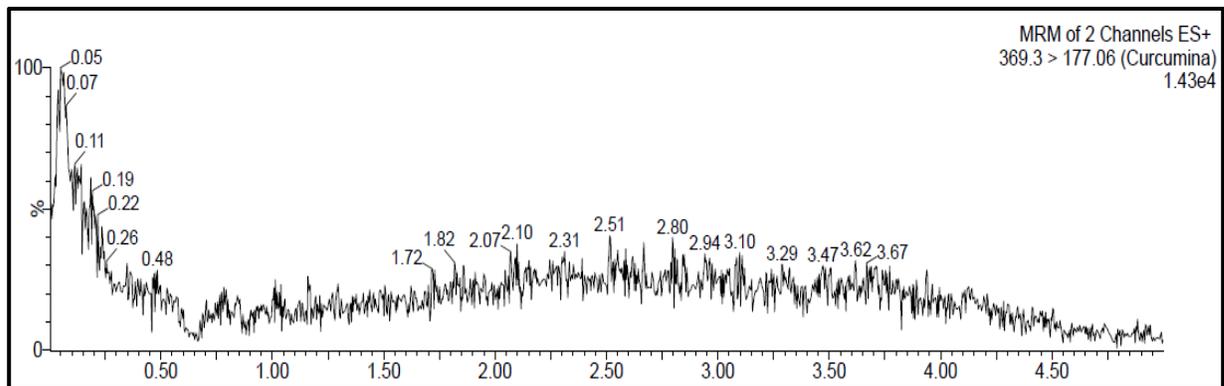


**Figura 61. Cromatograma del Estándar de Curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente.**

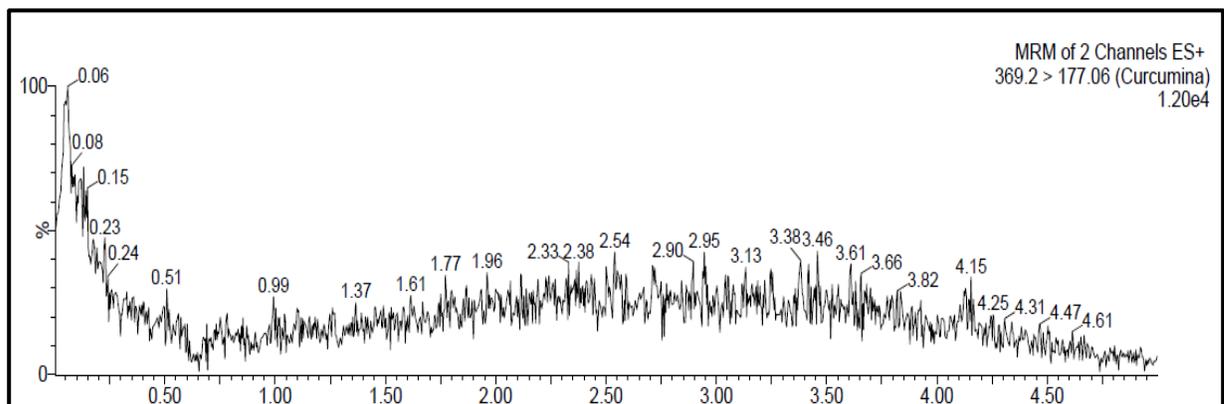
**7.6.2. Evaluación de la supresión de iones con EDTA.**



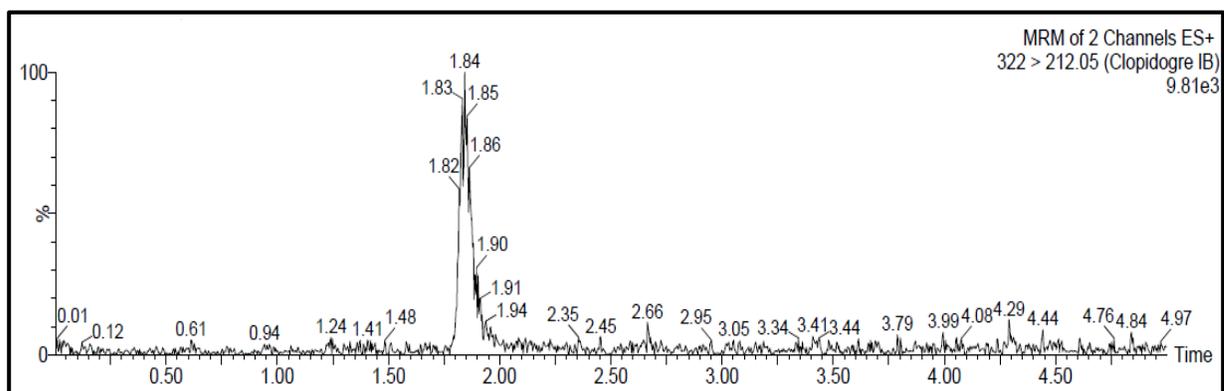
**Figura 62. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA.**



**Figura 63. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente.**



**Figura 64. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente.**



**Figura 65. Cromatograma del Blanco de plasma con EDTA infundiendo Clopidogrel a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.**

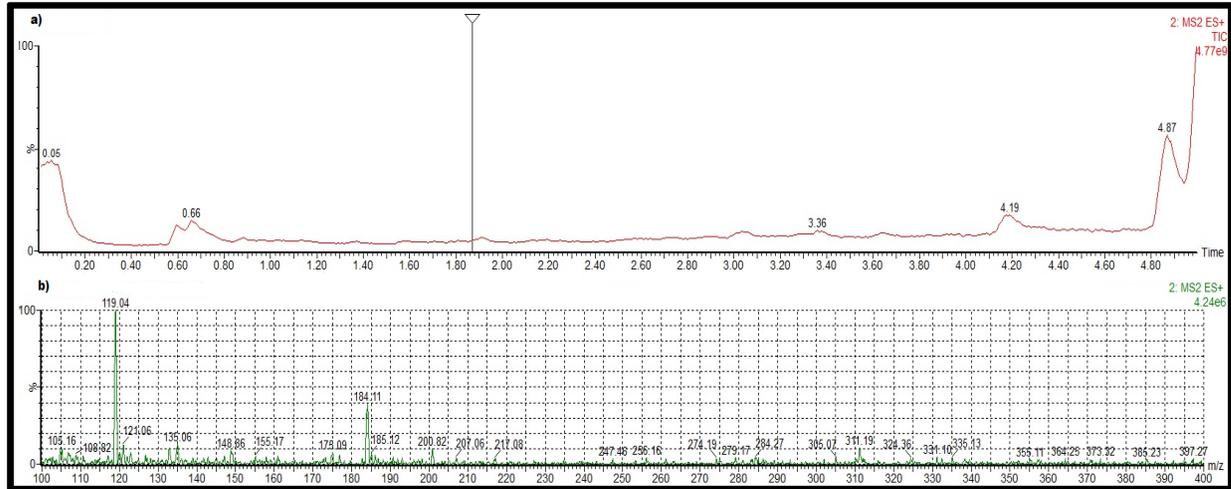


Figura 66. Espectro de masa que muestra la respuesta del plasma con EDTA infundiendo Clopidogrel a una concentración de 40 ng/mL.

### 7.6.3. Evaluación de la supresión de iones con Heparina.

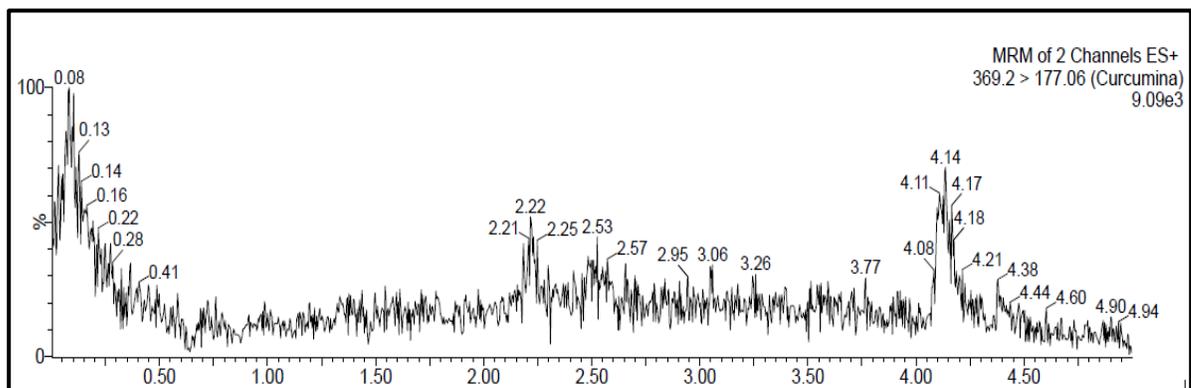
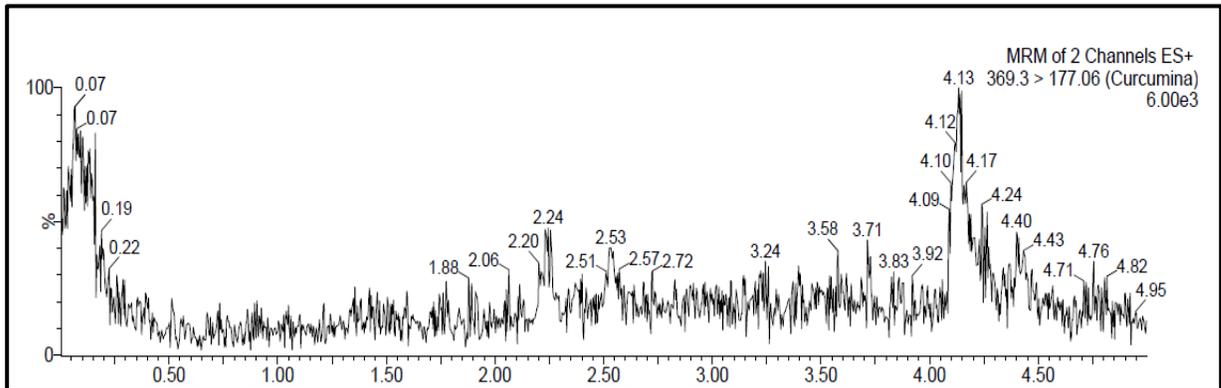
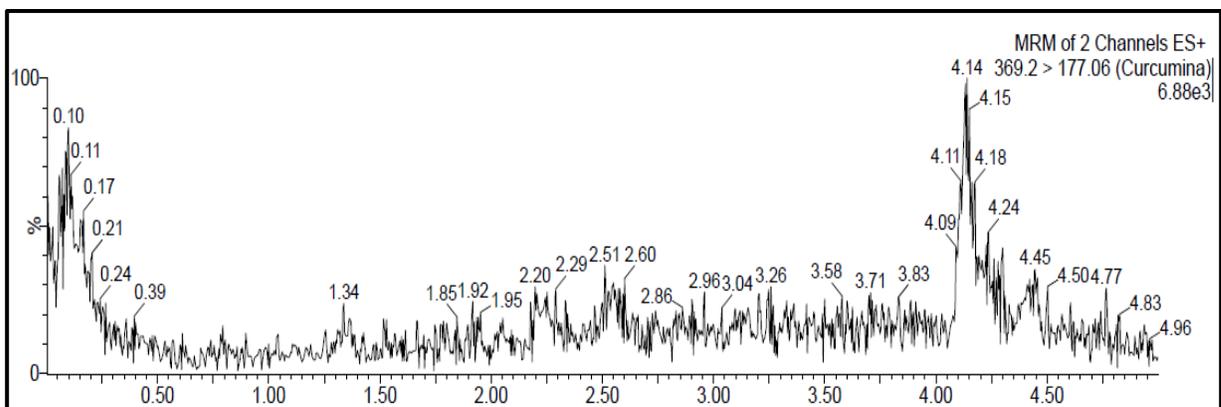


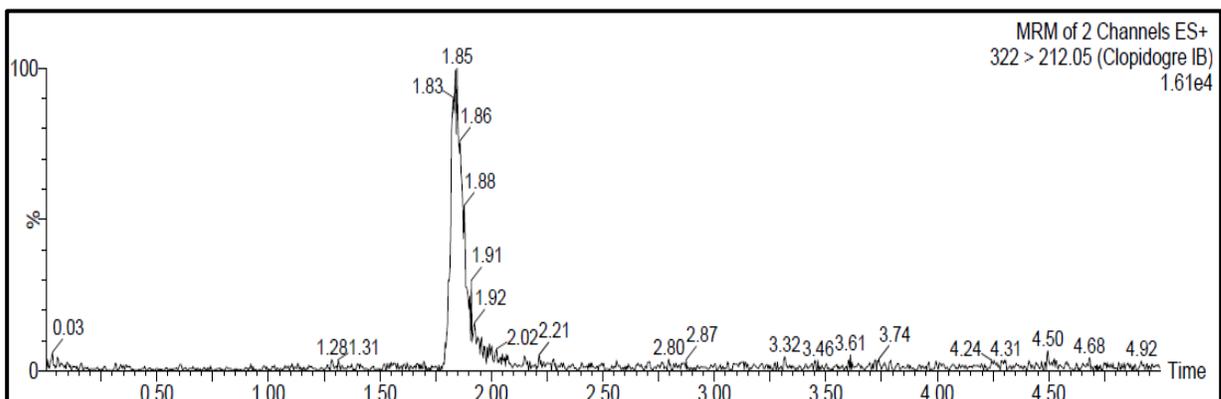
Figura 67. Cromatograma del Blanco de plasma con Heparina.



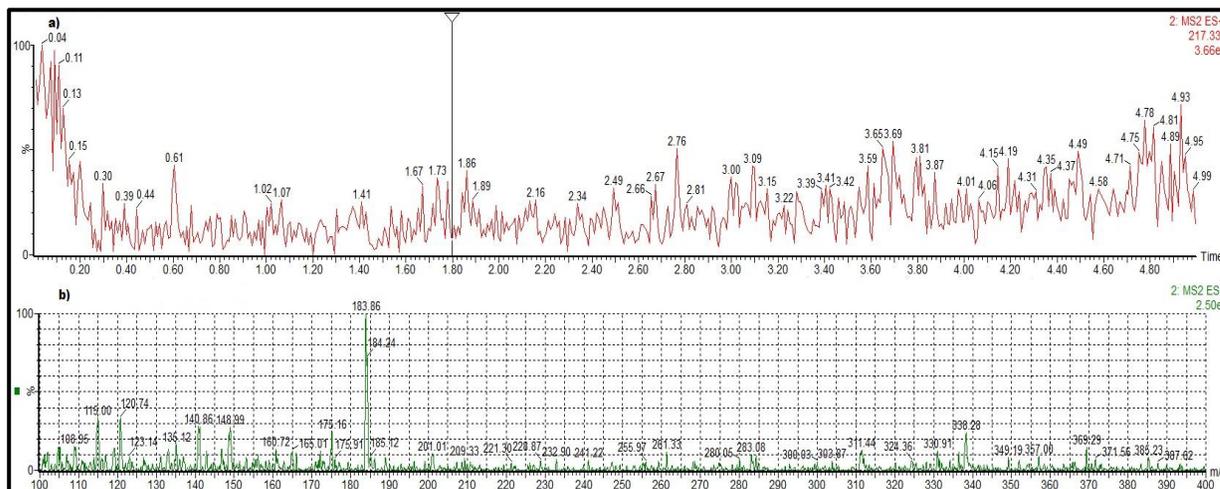
**Figura 68. Blanco de plasma con Heparina infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente.**



**Figura 69. Blanco de plasma con Heparina infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente.**



**Figura 70. Blanco de plasma con Heparina infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente.**



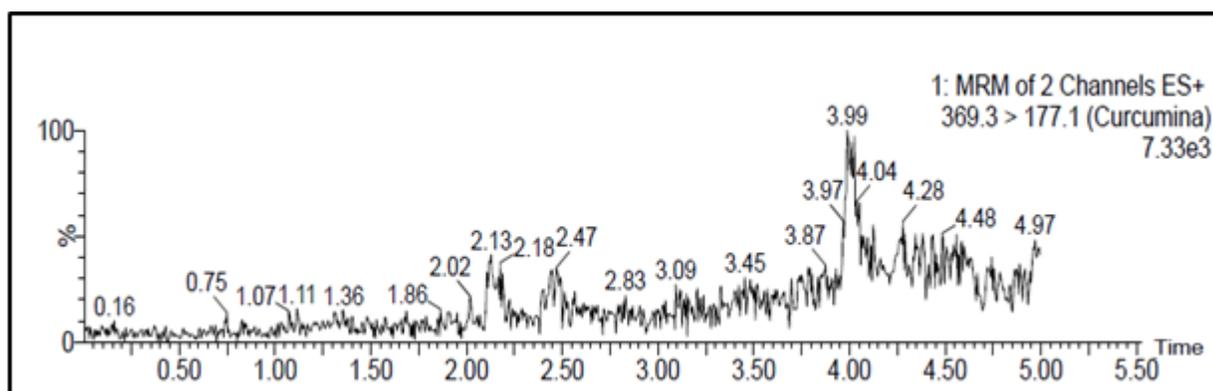
**Figura 71. Espectro de masas que muestra la respuesta del plasma con Heparina infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.**

### 7.7. Efecto de la matriz.

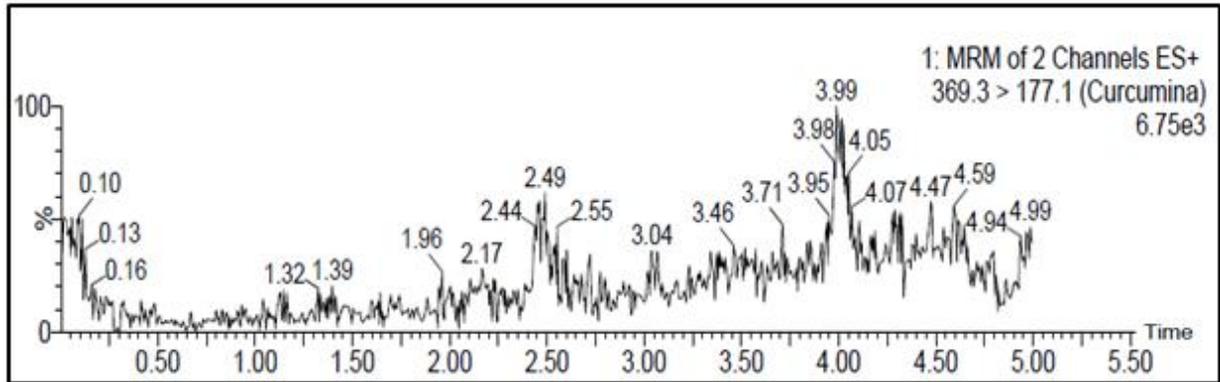
Para evaluar el efecto de la matriz se realiza una infusión post columna de curcumina en dos concentraciones (3 ng/mL y 160 ng/mL) y Clopidogrel (40 ng/mL), a tres muestras de plasma; hemolizado (figuras 80-83), semi hemolizado (figuras 76-79) y sin hemolisis (figuras 72-75).

Posteriormente también se procedió a determinar el factor matriz normalizado (FMN) del método analítico.

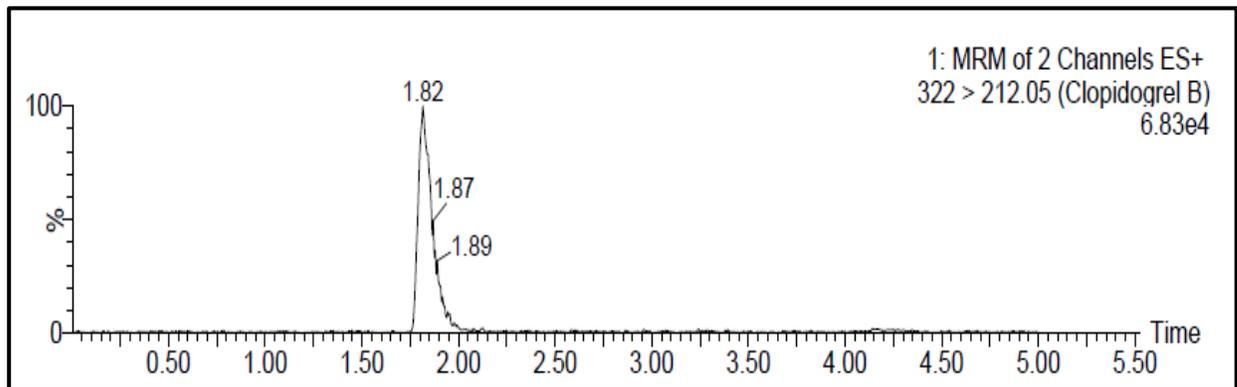
#### 7.7.1. Plasma sin hemolisis.



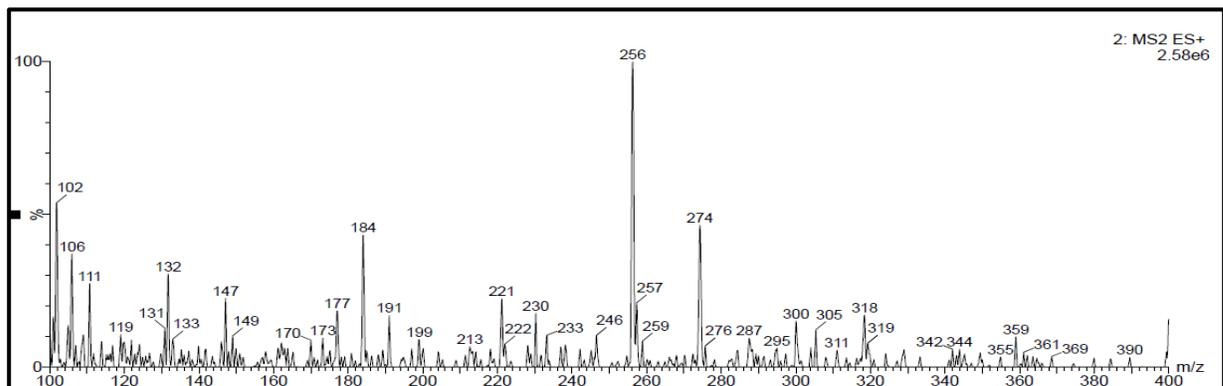
**Figura 72. Cromatograma del Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.**



**Figura 73. Cromatograma del Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.**



**Figura 74. Cromatograma Blanco de plasma sin presencia de hemolisis infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.**



**Figura 75. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma sin presencia de hemolisis.**

### 7.7.2. Plasma semi hemolizado.

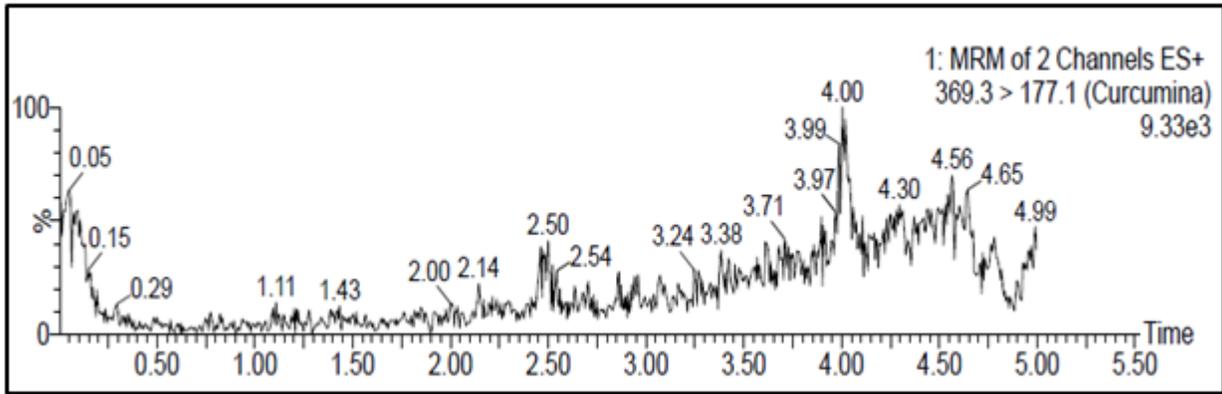


Figura 76. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.

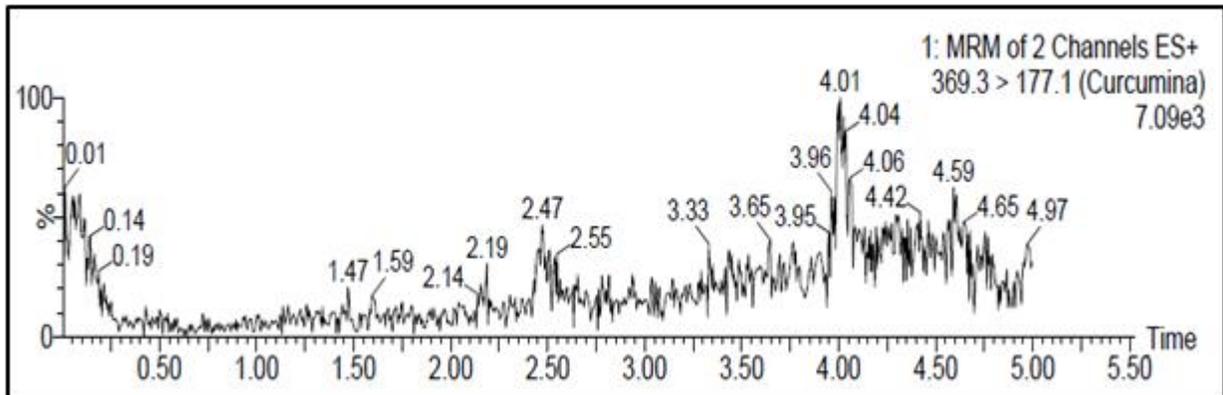


Figura 77. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.

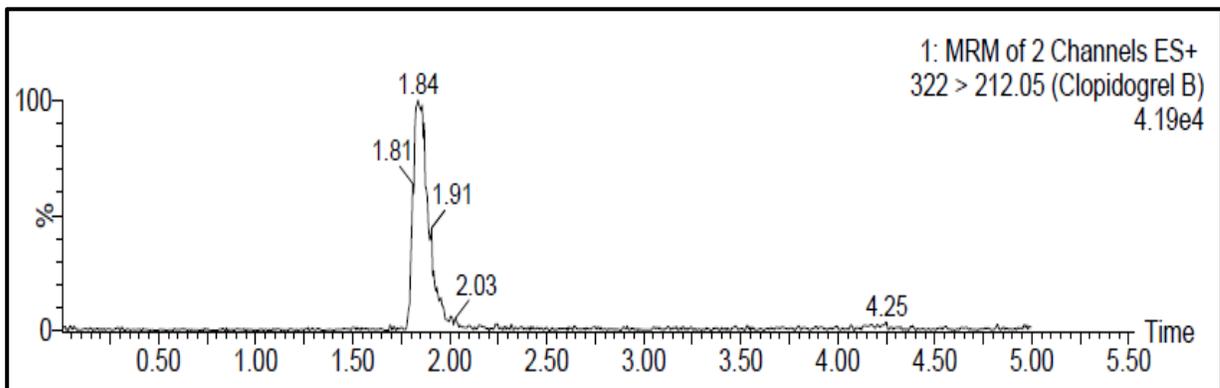
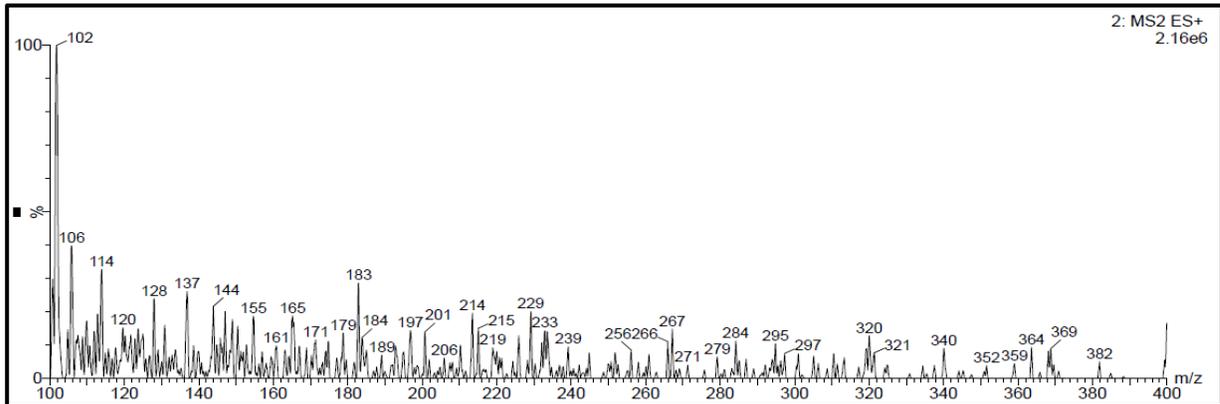
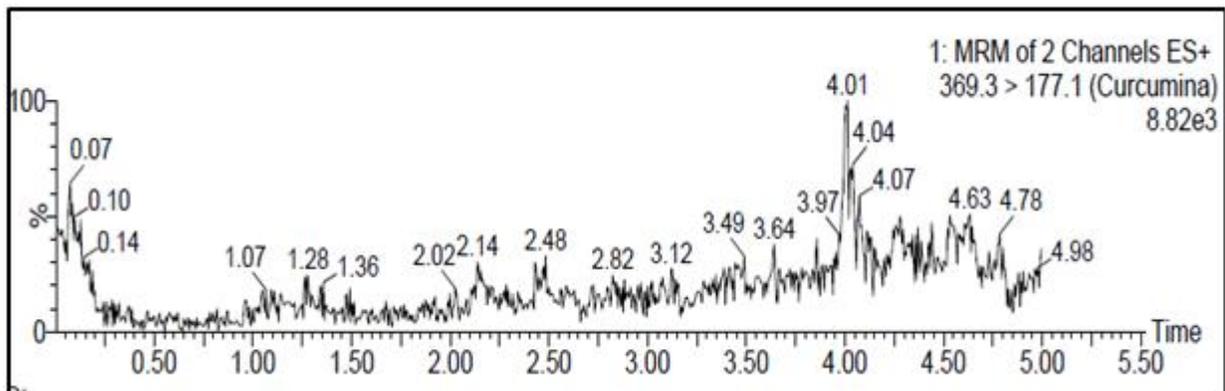


Figura 78. Cromatograma del Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.

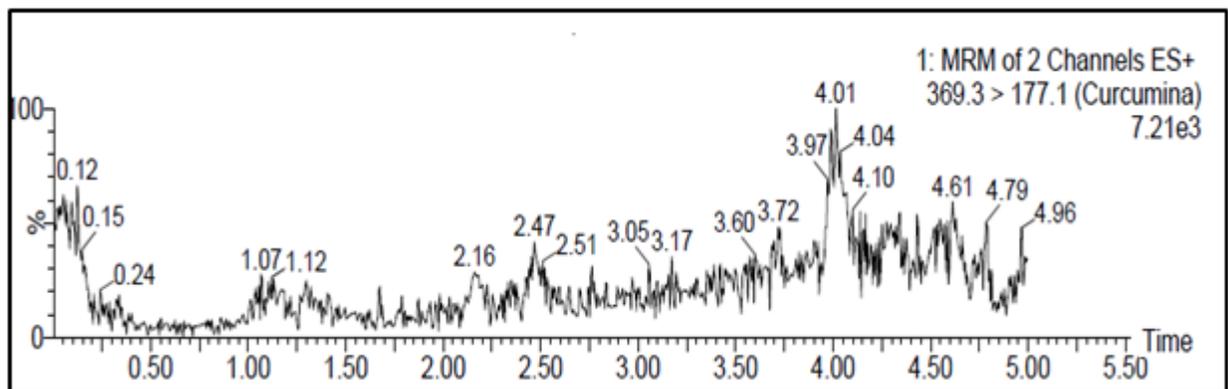


**Figura 79. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma semi hemolizado.**

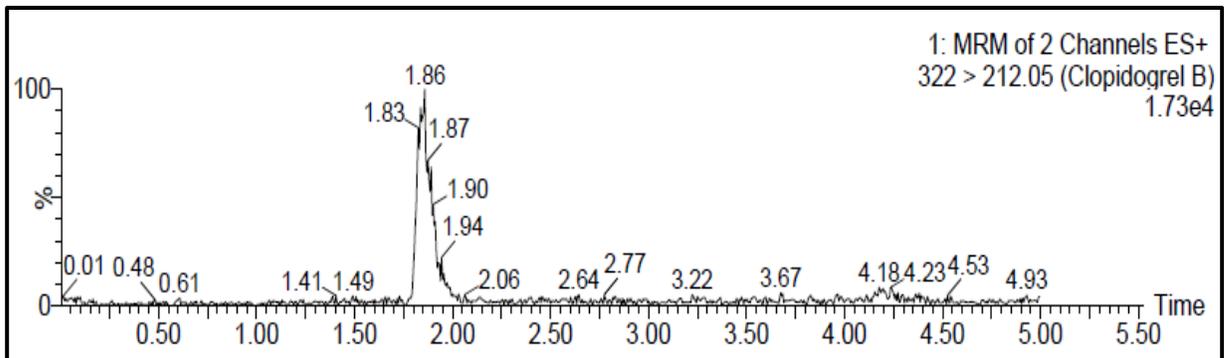
### 7.7.3. Plasma hemolizado.



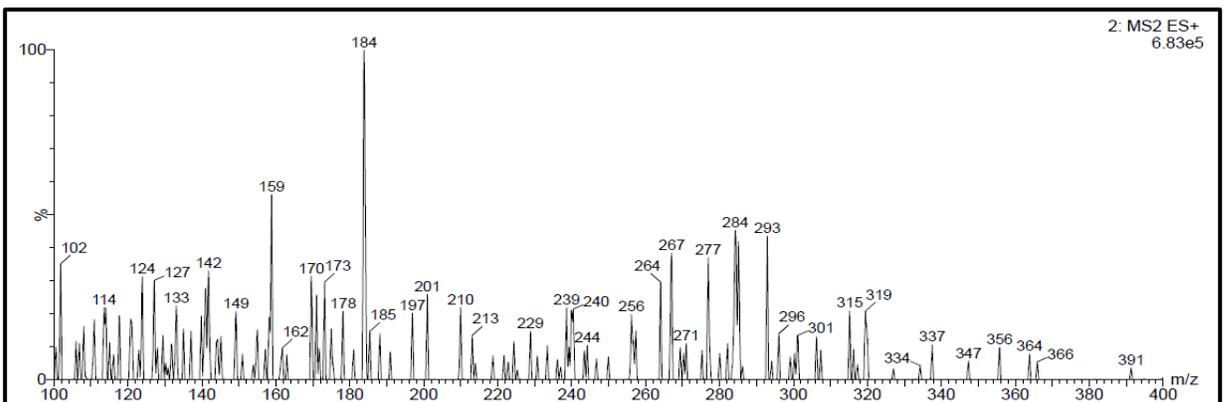
**Figura 80. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL.**



**Figura 81. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL.**



**Figura 82. Cromatograma del Blanco de plasma hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.**



**Figura 83. Espectro de masas del pico en el tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma hemolizado.**

#### 7.7.4. Factor Matriz Normalizado.

Tabla 22. Efecto de la matriz en la técnica de Extracción líquido-líquido con Cloroformo.

Concentración nominal Cúrcumina (ng/mL)	Respuesta en plasma de cúrcumina	Respuesta en solución de cúrcumina	Respuesta en plasma de Clopidogrel bisulfato	Respuesta en solución de Clopidogrel bisulfato	FMN
<b>30.03</b>	13123.00	13889.00	37892.00	44092.00	1.10
<b>30.03</b>	11322.00	14446.00	38131.00	42078.00	0.86
<b>30.03</b>	11810.00	14778.00	37909.00	41705.00	0.88
<b>Promedio</b>	12085.00	14371.00	37977.33	42625.00	0.95
<b>Desv.</b>	931.46	449.22	133.35	1284.08	0.13
<b>C.V</b>	<b>7.71</b>	<b>3.13</b>	<b>0.35</b>	<b>3.01</b>	<b>13.87</b>
<b>90.09</b>	38561.00	40500.00	38463.00	42686.00	1.06
<b>90.09</b>	36164.00	45660.00	35808.00	43495.00	0.96
<b>90.09</b>	38499.00	46794.00	35892.00	43356.00	0.99
<b>Promedio</b>	37741.33	44318.00	36721.00	43179.00	1.00
<b>Desv.</b>	1366.36	3354.75	1509.20	432.57	0.05
<b>C.V</b>	<b>3.62</b>	<b>7.57</b>	<b>4.11</b>	<b>1.00</b>	<b>4.79</b>
<b>150.15</b>	64620.00	70287.00	38033.00	41628.00	1.01
<b>150.15</b>	56820.00	72701.00	36395.00	40886.00	0.88
<b>150.15</b>	71292.00	75152.00	42674.00	42269.00	0.94
<b>Promedio</b>	64244.00	72713.33	39034.00	41594.33	0.94
<b>Desv.</b>	7243.32	2432.52	3256.99	692.11	0.06
<b>C.V</b>	<b>11.27</b>	<b>3.35</b>	<b>8.34</b>	<b>1.66</b>	<b>6.82</b>

## 8. Análisis de resultados y discusión.

En la primera fase de exploración para las técnicas de extracción de curcumina por las tres diferentes técnicas se observa que el tiempo de retención es adecuado en todas las técnicas, pero se observó ruido considerable en la línea base de algunos cromatogramas (figuras 21, 22, 26 y 27). En el proceso del tratamiento de muestras se observó que la centrifugación no era tan eficiente, ya que en algunas muestras la separación no era adecuada (turbidez en el sobrenadante), también se rompieron algunos tubos, esto provocó que no se llegaran a leer algunas muestras (figura 19). En algunos procedimientos se utilizó una gran cantidad de solventes (figura 18).

Durante esta prueba se logró observar que la acetona es un buen agente precipitante de proteínas, la línea base del cromatograma no presenta ruido (figura 21); el cloroformo (figura 25) es adecuado para la extracción líquido-líquido al igual que el acetato de etilo (figura 24), los dos procedimientos no muestran ruido en la línea base.

En la extracción fase sólida, se observó que los tiempos eran muy largos para el procedimiento del tratamiento de la muestra plasmática al eluir la muestra, ya que era un proceso manual (figura 20), en la línea base del cromatograma no se observa ruido (figura 28), lo que nos da como resultado que es un método muy costoso, con tiempos largos para el tratamiento de la muestra, la respuesta que este método nos ofrece se obtiene de igual forma con la técnica de Precipitación de proteínas con acetona y Extracción líquido-líquido con cloroformo, por lo que esta técnica fue descartada.

Observando los cromatogramas obtenidos y tomando en cuenta lo reportado en la literatura nos dimos cuenta de que la presencia de componentes de la matriz de la muestra podría poner en serio peligro la precisión y exactitud de los análisis cuantitativos, y al posterior riesgo de la alta "obstrucción" de la columna analítica, debido al alto contenido de proteínas del plasma. Ya que el objetivo del presente trabajo fue "Comparar diversos tratamientos de muestras de plasma para separar proteínas a fin de poder cuantificar Curcumina por espectrometría de masa". Por lo que se tomaron acciones para llevar a cabo la optimización de los

procedimientos en los puntos críticos más importantes, tal como se muestra en la tabla 11.

Así mismo fue necesario evaluar algunos disolventes para la elaboración de la fase móvil ya que hay que tener en cuenta que los aditivos de la fase móvil pueden conducir a la supresión de iones en aplicaciones de LC-MS/MS, (también pueden interactuar con algunos elementos, vea apartado “Eluyentes Utilizados para preparar Fases Móviles”) y así reemplazar el metanol, el cual daba un porcentaje de abundancia del ión padre muy bajo (figuras 29 y 30), por una solución diluyente, dando como resultado una mejor respuesta en el porcentaje de abundancia del ión padre de la curcumina, como se muestran las figuras 31 y 32.

La concentración de ácidos nucleicos en plasma suele determinarse a 260 nm, y la interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un “cociente”. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes  $A_{260}/A_{280}$  respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Si la muestra no contiene proteínas, el cociente  $A_{260}/A_{280}$  será considerablemente inferior a dichos valores. La tabla 12 muestra que el tratamiento más efectivo para tener una muestra limpia o eliminar proteínas es la de acetona para precipitación de proteínas y cloroformo para extracción líquido-líquido.

Para llevar las muestras a sequedad se utilizó baño maría, pero los tiempos eran muy largos, por lo que se realizó una prueba para evaluar el tiempo y la temperatura optima en baño María para llevar a sequedad; esto se evaluó tomando en cuenta el tiempo en que tarda la temperatura en secar la muestra y el porcentaje recuperado que se obtenía, esto solo se realizó con el procedimiento del tratamiento de Extracción Líquido-Líquido con cloroformo (tabla 13).

Los resultados de la tabla 13 muestran que a una temperatura de 79 °C nos da como resultado un tiempo de concentración de la muestra de 1 min, 33 seg y el % de recuperación es de entre 74.773 a 124.760. En las figuras 33 -35 se observa el área del pico para cada temperatura.

Para la elección de la técnica para la extracción de curcumina en muestras de plasma se observa en las figuras 43, 44, 46 y 47 que los picos son mas definidos y

no presentan ruido en la línea base; mientras que en las tablas 14, 15, 16 y 17 podemos apreciar el porcentaje de recobro de cada una de las técnicas evaluadas. En la tabla 18 se muestra un resumen de la evaluación de las técnicas para la extracción de curcumina en plasma, en la cual se observa que la mejor técnica para la extracción de curcumina en plasma es la de cloroformo ya que tiene un promedio de porcentaje recuperado de 113.53 y un C.V. de 16.66, en comparación con el de acetona fría que tiene un C.V. de 2.86 pero su porcentaje promedio recuperado es de 82.18.

Para la elección del estándar interno se realizó un patrón de fragmentación del ión molecular (figuras 48, 50, 52 y 54) y se obtuvo el tiempo de retención (figuras 49, 51, 53 y 55) para cada uno de los estándares seleccionados.

La concentración de cada uno de los Estándares Internos fue de 100 ng/mL. El estándar interno de elección se esperaba que fuera la melatonina, ya que el clorhidrato de propafenona (figura 49) y tramadol (figura 53) tienen un tiempo de retención muy cercano al frente de solvente, y el clorpidrogel bisulfato (figura 51) tiene un tiempo de retención muy cercano al de la curcumina (tabla 19). Sin embargo durante la experimentación se observó que la respuesta de la melatonina no era constante en algunas concentraciones, por lo que se procedió a realizar una curva de calibración con diferentes proporciones de melatonina, con y sin curcumina (tabla 20).

Debe existir una relación directamente proporcional de las áreas de melatonina con y sin curcumina, sin embargo se observa que no existe comportamiento proporcional y la respuesta de la melatonina tiende a aumentar (tabla 20).

Esto se puede atribuir a una posible supresión iónica de la melatonina hacia la curcumina.

También se pensó que la temperatura pudiera estar relacionada con la inestabilidad de los Estándares Internos en los sistemas, por lo que se requirió elaborar un mejor sistema de secado de la muestra sin tener que utilizar temperatura, que es más rápido en los tiempos de concentrar la muestra (1 min).

El sistema para concentrar la muestra estaba elaborado de: un sistema de riego, manguera negra de polietileno, dos soportes universales, dos pinzas con nuez, una pieza en T, y el sistema de aire. Para montar el sistema se ensamblaron 10 cm de manguera de polietileno al sistema de aire de la campana de extracción, posteriormente en el otro extremo se colocó la T y en cada extremo de la T se colocaron 60 cm de manguera de polietileno. En los extremos de la manguera se colocaron los sistemas de riego (figura 56).

La figura 57 muestra la optimización la Técnica de Extracción líquido-líquido con cloroformo y la adición del estándar interno, también la integración del sistema de secado.

En la tabla 21 se observan los resultados de la curva que se utilizó para evaluar la optimización de la técnica, donde el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la curva (de todos los datos) es 0.9972, que comparado con los criterios de aceptación cumple ( $r^2$  es igual o mayor que 0.98), los valores del coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración son menores del 15%, lo cual cumple con los criterios de aceptación.

La figura 58 muestra la descripción gráfica de la tabla 21.

El pH de la solución, la concentración de electrolitos, y las propiedades de la solución de electrospray depende de la composición exacta de la gotita que puede variar de muestra a muestra. Una de las consecuencias que a menudo se observan en los cambios inesperados en estos factores, es la variabilidad en la respuesta, esto normalmente se conoce como la supresión de la ionización. El fenómeno de la supresión de iones, resulta en la reducción esporádica de la intensidad de la señal.

Se evaluó por infusión post columna la supresión de iones que pudiera existir por efecto de los anticoagulantes como la heparina y el EDTA, que normalmente se utilizan para la conservación de muestras biológicas, se realizó un blanco de plasma de los mismos, posteriormente se infundió Curcumina a dos concentraciones (3 ng/mL y 160 ng/mL) y Clopidogrel Bisulfato (40 ng/mL).

Realizando la comparación del blanco de EDTA (figura 62) con respecto a las diferentes concentraciones de curcumina (figuras 60 y 61) no se observa ningún cambio significativo en la línea base en las figuras 63 y 64 por lo que se puede decir que no hay una supresión iónica por efecto del anticoagulante EDTA con respecto a la curcumina, mas sin en cambio se observó un pico en la línea base al infundir Clopidogrel (figura 65) por lo que se realizó su espectro de masas (figura 66) en el cual no se observa el fragmento del ión de Clopidogrel y así descarta la posible supresión de iones.

Al Comparar el blanco de Heparina (figura 67) con respecto a las diferentes concentraciones de curcumina (figuras 60 y 61) no se observa ningún cambio en la línea base en las figuras 68 y 69 por lo que se puede decir que no hay una supresión iónica por efecto del anticoagulante con respecto a la curcumina, pero se observó un pico en la línea base al infundir Clopidogrel (figura 70), muy parecido al pico del estándar (figura 59) por lo que se realizó su espectro de masas (figura 71), en el cual no se observa el fragmento del ión de Clopidogrel, y así descarta la posible supresión de iones.

La importancia que tienen los efectos de la matriz sobre la eficacia de los métodos en HPLC-ESI-MS/MS ha demostrado en términos de exactitud y precisión, sensibilidad y el límite inferior de cuantificación de un método, que puede verse afectado. Por lo que es se determino el efecto de la matriz a tres muestras de plasma; hemolizado, semi hemilizado y sin hemolisis.

La figuras 72 y 73 no muestran un pico en el tiempo de retención de la curcumina, por lo que se puede decir que no hay efecto de matriz en plasma sin hemolisis, sin en cambio en la figura 74 se observa un pico en el tiempo de retención de 1.82, para lo cual se realizo el espectro de masa a ese tiempo de retención (figura 75) en donde no se ve el fragmento del ion de Clopidogrel.

La figuras 76 y 77 no muestran un cambio significativo en el tiempo de retención de la curcumina, por lo que se puede decir que no hay efecto de matriz en plasma semi hemolizado, sin en cambio en la figura 78 se vuelve a ver un pico esta vez al tiempo de retención de 1.84, para lo cual se realizo el espectro de masa a ese

tiempo de retención (figura 79) en donde no se distingue el fragmento del ion de Clopidogrel.

Por último las figuras 80 y 81 no muestran un cambio significativo en el tiempo de retención de la curcumina, por lo que se puede decir que no hay efecto de matriz en plasma hemolizado, sin en cambio en la figura 82 se ve nuevamente un pico al tiempo de retención de 1.86, para lo cual se realizó el espectro de masa a ese tiempo de retención (figura 79) en donde no se distingue el fragmento del ion de Clopidogrel, este pico observado en todos cromatogramas al infundir Clopidogrel esto se podría atribuirá un compuesto endógeno del plasma.

En la tabla 22 se muestra la prueba de Factor Matriz Normalizado para la técnica de Extracción líquido-líquido con cloroformo tal como lo marca la norma NOM-177-SSA1-2013, donde se puede observar que el CV% del FMN no es mayor al 15.

En general, el ruido químico de fondo observado en LC- MS podría provenir de líneas de tubería, aditivos plastificantes, nebulizador y de la colisión de gases, impurezas de disolvente, grupos de iones.

La elección del tratamiento de la muestra para un fluido biológico es dependiente de las concentraciones de analito esperadas y del límite de detección. Finalmente, los resultados nos indican que los materiales no volátiles se deben retirar de la muestra con el fin de evitar la supresión de ionización por lo que la extracción liquido-liquido se requiere antes del análisis de los analitos de interés en el plasma. Una vez que se han eliminado estas interferencias, no hay garantía de que la supresión de la ionización ya no será un problema. Hay otros mecanismos con efectos reducidos que aún pueden cambiar la respuesta del analito.

## 9. Conclusiones

Se logró comparar diversos tratamientos de muestras de plasma para separar proteínas con el fin de poder cuantificar Curcumina por espectrometría de masas obteniendo como la mejor técnica la Extracción líquido-líquido con cloroformo (obteniendo un promedio del % de recobro de 87-98 y un C.V. de 0.997).

Se realizaron ensayos presuntivos de las diferentes técnicas de extracción observando los porcentajes de recobro y logrando evaluar los diversos tratamientos reportados para la separación de proteínas del plasma y cuantificar curcumina con éxito sin ninguna interferencia de la matriz.

Se logró optimizar el procedimiento de tratamiento de muestras de plasma con el mayor porcentaje de recobro y estabilidad de la curcumina.

## Referencias

1. Gangwar RK, Dhumale VA, Kumari D, Nakate UT, Gosavi SW, Sharma RB, et al. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability. *Materials Science and Engineering: C*. 2012;32(8):2659-63.
2. Nardo L, Andreoni A, Bondani M, Måsson M, Hjorth Tønnesen H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXXIV. Photophysical properties of a symmetrical, non-substituted curcumin analogue. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009;97(2):77-86.
3. Vishnuprasad CN, Pradeep NS, Cho YW, Gangadharan GG, Han SS. Fumigation in Ayurveda: Potential strategy for drug discovery and drug delivery. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;149(2):409-15.
4. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14(11):1290-4.
5. Hermo MP, Saurina J, Barbosa J, Barrón D. High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration. *Food Chemistry*. 2014;153(0):405-13.
6. BG. K. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;27(5):663-74.
7. Sun J BC, Chan HM, Sun S, Zhang Q, Zheng Y. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;111(0)(367-75.).
8. Shishu MM. Comparative bioavailability of curcumin, turmeric and Biocurcumax™ in traditional vehicles using non-everted rat intestinal sac model. *Journal of Functional Foods*. 2010;2(1):60-5.
9. Patra D, Sleem F. A new method for pH triggered curcumin release by applying poly(l-lysine) mediated nanoparticle-congregation. *Analytica Chimica Acta*. 2013;795(0):60-8.

10. Irving GRB KA, Berry DP, Brown K, Steward WP. Curcumin: The potential for efficacy in gastrointestinal diseases. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011;25(4-5)(519-34.).
11. Goel A KA, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*. 2008;75(4):787-809.
12. Remington Farmacia, Volume 2: Ed. Médica Panamericana; 2003. 2506- p.
13. Rodríguez NRT. Medicina forense: manual integrado: Univ. Nacional de Colombia; 2002. 522- p.
14. Vived ÀM. Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte: Ed. Médica Panamericana; 2005. 137- p.
15. Urroz C. Elementos de Anatomía Y Fisiología Animal: EUNED; 1991. 268- p.
16. España RANdM, Martín SdIvY, Díaz MIy. Resumen acerca de la sangre en general considerada en su estado fisiológico y en sus relaciones con la higiene y con la Medicina forense: Real Academia Nac. Medicina.
17. Campbell-Walsh Urologia/ Campbell-Walsh Urology: Ed. Médica Panamericana; 2008. 1127- p.
18. Patología médica veterinaria: libro de texto para la docencia de la asignatura: Univ Santiago de Compostela; 2003. 616- p.
19. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*. 2007;852(1–2):22-34.
20. Little JL, Wempe MF, Buchanan CM. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *Journal of Chromatography B*. 2006;833(2):219-30.
21. Jiang H, Cao H, Zhang Y, Fast DM. Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC–MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography B*. 2012;891–892(0):71-80.
22. PLASCENCIA VILLADA G. ESPECTROMETRÍA DE MASAS. 2003.
23. Bakhtiar R, Majumdar TK. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological

fluids using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2007;55(3):227-43.

24. Buhrman DL, Price PI, Rudewicz PJ. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1996;7(11):1099-105.

25. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2000;11(11):942-50.

26. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999;13(12):1175-85.

27. Shou WZ, Naidong W. Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *Journal of Chromatography B*. 2005;825(2):186-92.

28. Shen JX, Motyka RJ, Roach JP, Hayes RN. Minimization of ion suppression in LC–MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;37(2):359-67.

29. Ghosh C, Shinde CP, Chakraborty BS. Influence of ionization source design on matrix effects during LC–ESI-MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*. 2012;893–894(0):193-200.

30. Ćirić A, Prosen H, Jelikić-Stankov M, Đurđević P. Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC–MS/MS method. *Talanta*. 2012;99(0):780-90.

31. Pineda Tenor D, Martínez Laborde C, Menchén Herreros A, Fernández Rodríguez E. Aproximación matemática para la corrección de la influencia de la hemólisis en pruebas frecuentes del laboratorio clínico. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2010;3(1):25-30.

32. Gómez Rioja R, Alsina Kirchner MJ, Álvarez Funes V, Barba Meseguer N, Cortés Rius M, Llopis Díaz MA, et al. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2009;2(4):185-95.
33. Hughes NC, Bajaj N, Fan J, Wong EYK. Assessing the matrix effects of hemolyzed samples in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2009;1(6):1057-66.
34. Laga A, Cheves T, Maroto S, Coutts M, Sweeney J. The suitability of hemolyzed specimens for compatibility testing using automated technology. *Transfusion*. 2008;48(8):1713-20.
35. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(23):2198-207.
36. Xue YJ, Simmons NJ, Liu J, Unger SE, Anderson DF, Jenkins RG. Separation of a BMS drug candidate and acyl glucuronide from seven glucuronide positional isomers in rat plasma via high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006;20(11):1776-86.
37. Hewavitharana AK, Hyde C, Thomas R, Shaw PN. Shortcomings of protein removal prior to high performance liquid chromatographic analysis—A case study using method development for BAY 11-7082. *Journal of Chromatography B*. 2006;834(1-2):93-7.
38. Sharma KS. Mass spectrometry—The early years. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2013;349-350(0):3-8.
39. Dunn WB. Chapter two - Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction. In: Daniel Jameson MV, Hans VW, editors. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 2011. p. 15-35.
40. Bretón Camilo A, de Regil Hernández R. *Secuenciación de Proteínas por Espectrometría de Masas*. 2004.
41. PORTILLO PÉREZ S. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN METÓDO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR OXICODONA EN PLASMA HUMANO, MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADO A UN DESTECTOR DE ESPECTOMRTRÍA DE MASAS-MASAS. MÉXICO, D.F.: UNAM; 2008.

42. Griffiths WJ JA, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J.* 2001;355:545-61.
43. Konenkov NV, Cousins LM, Baranov VI, Sudakov MY. Quadrupole mass filter operation with auxiliary quadrupolar excitation: theory and experiment. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2001;208(1–3):17-27.
44. Matamoros Fernández LE. Introduction to ion trap mass spectrometry: Application to the structural characterization of plant oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers.* 2007;68(4):797-807.
45. Wollnik H. History of mass measurements in time-of-flight mass analyzers. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2013;349–350(0):38-46.
46. Doff J, Douce D, Jones G, Koroleva EV, Skeldon P, Thompson GE. Contamination of stainless steel in an electrospray ionization source. *Applied Surface Science.* 2012;258(13):5270-82.
47. Corporation W. 2010.