



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Espectrometría de masas. Fundamento y aplicación en el ámbito farmacéutico.**

Autor: Jorge Cuesta Herrero

Fecha: 26/01/2020

Tutor: Marta Sánchez-Paniagua López

## ÍNDICE

- Resumen
- Abstract
- Introducción
- Objetivos
- Material y métodos
- Discusión y resultados
- Conclusión
- Bibliografía

## **RESUMEN**

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica muy empleada en el análisis clínico debido a que presenta unas características analíticas idóneas, destacando su gran versatilidad a la hora de analizar muestras de distinta naturaleza sin descuidar una buena precisión y exactitud.

Para solventar la gran dificultad que plantea el análisis de muestras biológicas debido a que tienen una composición compleja, estos equipos se acoplan a técnicas de separación como la cromatografía de gases, el HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) y la electroforesis, permitiendo así el análisis de este tipo de muestras.

En esta revisión se analiza el acoplamiento de la espectrometría de masas con la cromatografía de gases (GC-EM), cromatografía líquida (LC-EM) y la espectrometría de masas en tándem (EM-EM); así como sus respectivas aplicaciones para la detección de tóxicos, fármacos, biomarcadores, principios activos, contaminantes, levaduras o microorganismos.

## **ABSTRACT**

Mass spectrometry (MS) is an analytical technique widely used in clinical analysis because it has qualities that allow great versatility when analyzing samples of different nature without neglecting good precision and accuracy.

To solve the great difficulty posed by the analysis of biological samples because of their complex composition, these equipments are coupled to separation techniques such as gas chromatography, HPLC and electrophoresis, thus allowing the analysis of this type of samples.

In this review the coupling of mass spectrometry coupled with gas chromatography (GC-MS) or liquid chromatography (LC-MS) and tandem mass spectrometry (MS-MS) are analyzed ; as well as their respective applications for the detection of toxins, drugs, biomarkers, active metabolites, contaminants, yeasts or microorganisms.

## **INTRODUCCIÓN**

La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis de carácter cualitativo, que se emplea para la identificación de estructuras orgánicas; para ello se utiliza un espectrómetro de masas, que se trata de un instrumento que genera iones y los separa de acuerdo con sus relaciones masa/carga ( $m/z$ ) (1). Puede usarse por sí sola o en combinación con otras técnicas analíticas de separación como la electroforesis o los métodos cromatográficos.

En la EM no se utiliza ningún tipo de radiación, los procesos que se llevan a cabo son de carácter químico, en los que la muestra utilizada para el análisis es destruida. Por el contrario, en las espectroscopías clásicas se llevan a cabo procesos físicos en los que no se destruye la muestra analizada.

Entre las cualidades de esta técnica destacan (2):

- ❖ Alta sensibilidad (detección de moléculas en el orden de  $10^{-15}$  moles y  $10^{-18}$  moles).
- ❖ Alta especificidad del análisis realizado.
- ❖ Exactitud a la hora de determinar el peso molecular.
- ❖ Alto campo de aplicación. Gran intervalo de tamaño, naturaleza y propiedades de moléculas en el cual se obtiene un buen resultado analítico; pudiendo variar las propiedades de la muestra en cuanto a la volatilidad, polaridad, estado físico...
- ❖ Obtención de información cualitativa y cuantitativa.
- ❖ Adaptabilidad para desarrollar procedimientos analíticos de forma rápida, es muy versátil.

El fundamento de esta técnica está basado en que cuando se aplica una energía a un átomo o molécula neutra que supere su potencial de ionización, se va a producir una fragmentación de esta estructura (se trata de un proceso entrópicamente favorable y unimolecular); sus enlaces intramoleculares se rompen, y se generan iones positivos y negativos que se separarán en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). La masa está medida en unidades de masa atómica (Sistema Internacional: una, que equivale a  $1/12$  de la masa del isótopo  $^{12}_6\text{C}$ ). En última instancia, estos iones generados han de detectarse y registrarse de forma que se constituya el espectro de masas.

El espectro de masas se trata de un gráfico en el que queda reflejada la abundancia relativa de los iones producidos en los procesos anteriores respecto a su relación  $m/z$ . Se representa así, ya que el compuesto será identificado a raíz de la presencia y proporción cuantitativa de los iones que se obtengan durante el proceso. A continuación se definen dos conceptos básicos que se emplean a la hora de interpretar el espectro (Figura 1).

- ❖ ION MOLECULAR: se trata del ion con mayor relación masa/carga ( $m/z$ ) presente en el espectro. Contiene todos los demás fragmentos en su estructura. Posee el punto de ionización más bajo, y su abundancia relativa en el espectro va a depender de su estabilidad y por tanto de los grupos presentes en su molécula.
- ❖ PICO BASE: es el pico más estable, el que aparece con una mayor intensidad relativa en el espectro.

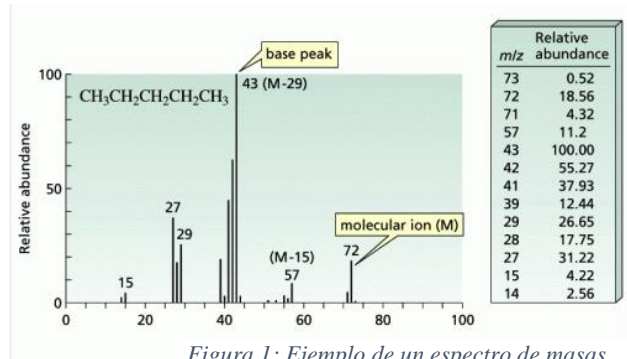


Figura 1: Ejemplo de un espectro de masas.

El espectrómetro de masas realiza 4 funciones diferenciadas (3):

- ❖ Constituir una fase gaseosa con sustancias con volatilidades muy diferentes.
- ❖ Formar iones a partir de moléculas neutras volatilizadas previamente.
- ❖ Separar los iones en función de su relación masa /carga.
- ❖ Detectar estos iones registrando la información correctamente.

Correspondiéndose con estas 4 funciones, el espectrómetro va a constar de cuatro partes más o menos independientes (Figura 2 y 3):

1. Sistema de introducción de muestras.
2. Sistema de ionización.
3. Analizador encargado de la separación de iones.
4. Sistema detector y registrador de la información.

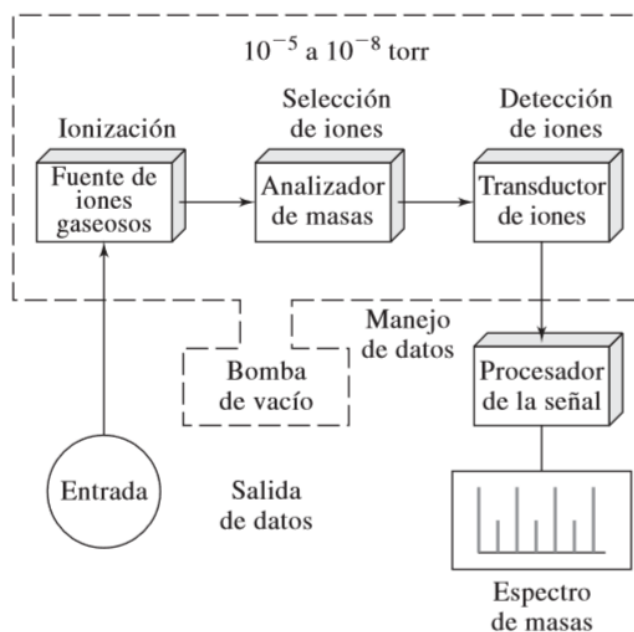


Figura 2: Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas

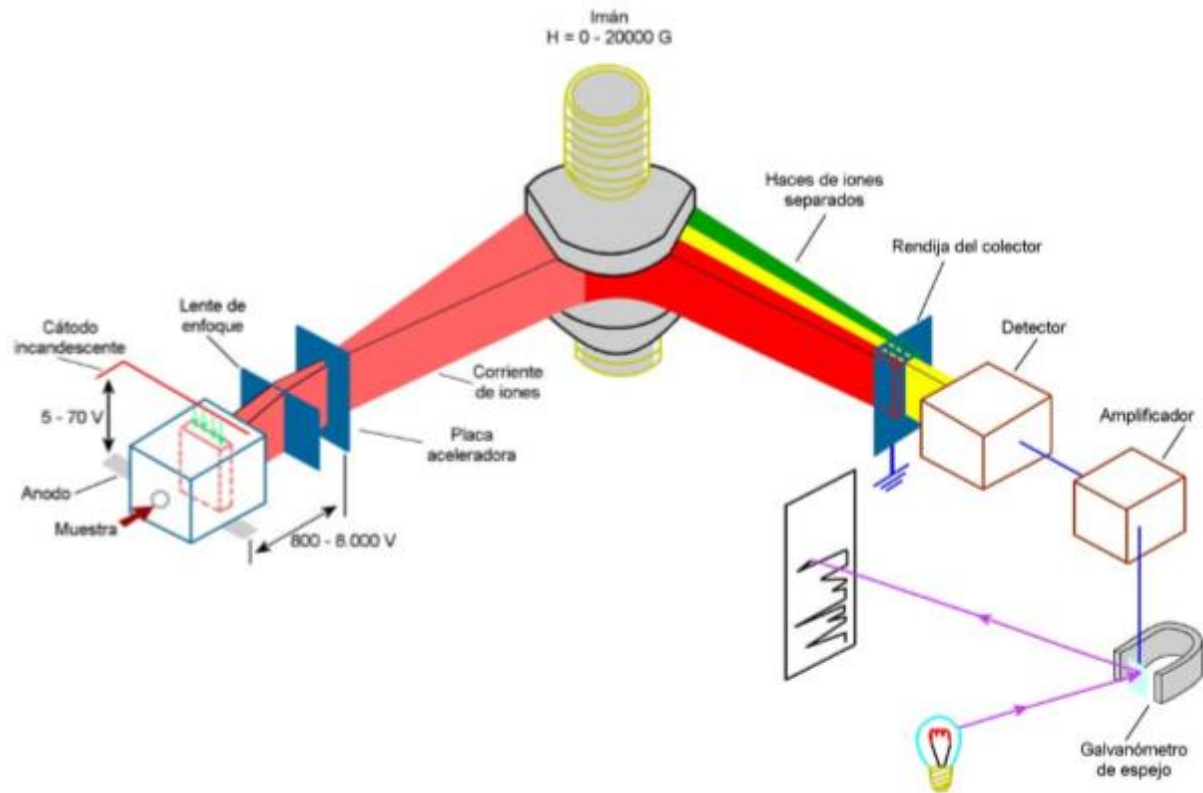


Figura 3 Esquema de un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico y analizador de sector magnético. (3)

Cabe destacar que el proceso se lleva a cabo en condiciones de vacío (tal y como se muestra en la *Figura 2*) con el objetivo de evitar la colisión de los iones de la muestra con partículas del aire de manera que se obtuviera un espectro del compuesto contaminado.

A continuación se exponen de un modo esquemático ejemplos de los distintos tipos de componentes utilizados en un espectrómetro de masas más utilizados en análisis clínico. Se desarrollan con mayor detalle los componentes con mayor relevancia en el campo clínico.

### 1. SISTEMAS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS

Tiene como objetivo la introducción de una muestra representativa de nuestro compuesto objeto de estudio en la fuente de iones, con la mínima pérdida de vacío. Los espectrómetros más modernos constan de diversos sistemas capaces de adaptarse a las características de la muestra. Se clasifican en:

- ❖ Sistemas de introducción de muestras con un único compuesto.
  - Sistemas directos. Se realiza mediante una sonda. Son los más apropiados para compuestos sólidos y líquidos no volátiles.
  - Sistemas indirectos. Son los más sencillos y los más utilizados. Son los más indicados para introducir muestras gaseosas o líquidos volátiles.

- ❖ **Sistemas de introducción de muestras de composición compleja.**  
Se utilizan técnicas acopladas para la introducción de este tipo de muestras. Se acopla el espectrómetro de masas a equipos de separación, como un cromatógrafo de gases, un HPLC o un equipo de electroforesis capilar; que previamente a ser introducidos en el espectrómetro de masas, separan los componentes de la mezcla compleja.

## 2. SISTEMAS DE IONIZACIÓN

La fuente de iones de los espectrómetros de masas tiene como objetivo la formación de iones del analito. Ningún método de ionización va a servir para analizar todos los compuestos, no hay un método universal, sino que en función de la naturaleza de la muestra se utilizará un método u otro. Los distintos sistemas se pueden clasificar en dos tipos en función de que se requiera o no vaporización previa de la muestra (4):

- Sistemas de ionización en fase gaseosa. En ellos el proceso de ionización consta de dos fases: primero se volatiliza la muestra y a continuación se ioniza. Sirven para compuestos térmicamente estables y con un peso molecular inferior a 1000 daltons.
- Sistemas o fuentes de desorción. La desorción (stripping) es la operación unitaria inversa a la absorción, en la cual uno o más componentes del líquido se transfieren al gas. En estos sistemas, la muestra sólida o líquida se transforma directamente en iones gaseosos. Este método se aplica en compuestos no volátiles y sensibles a la temperatura (térmicamente inestables), y tendrá un límite de peso molecular de 100.000 daltons. Es la técnica más empleada en análisis de biomarcadores.

En la tabla 1 se muestran distintos tipos de fuentes de iones, en función de la clasificación anterior y del agente ionizante utilizado.

Tabla 1.- Tipos de fuentes de iones

<b>TIPO BÁSICO</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>AGENTE IONIZANTE</b>
<b>Fuentes de fase gaseosa</b>	Impacto de electrones (EI)	Electrones energéticos
	Ionización química (CI)	Iones gaseosos reactivos
	Ionización por campo (FI)	Electrodo de potencial elevado

<b>Fuentes de desorción</b>	Desorción por campo (CD)	Electrodo de potencial elevado
	Ionización por desorción asistida por una matriz (MALDI)	Haz de láser
	Ionización por electronebulización (ESI)	Campo eléctrico elevado
	Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)	Haz de iones energéticos
	Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Haz de átomos energéticos
	Desorción por plasma (PD)	Fragmentos de fisión de $^{252}\text{Cf}$
	Ionización por termonebulización (TS)	Alta temperatura

Dentro de los sistemas de ionización en fase gaseosa, destacamos la ionización por impacto de electrones (EI) (Figura 4).

En este proceso la muestra es bombardeada e ionizada por un haz de electrones de elevada energía procedentes de un filamento incandescente. Las moléculas colisionan con los electrones y, como consecuencia, sufren una elevada fragmentación, la cual está relacionada con el potencial que se aplica para acelerar los electrones. La mayoría de los iones que se forman son positivos, aproximadamente son negativos el 10%. Se analizan solo los iones positivos ya que los iones negativos quedan atrapados en una placa repelente y no llegan al analizador.

Los iones positivos posteriormente atraviesan unas placas entre las cuales se aplica un campo eléctrico, con el fin de acelerar a los iones antes de su entrada al analizador.

Este sistema no es válido para el análisis de compuestos que no sean volátiles.

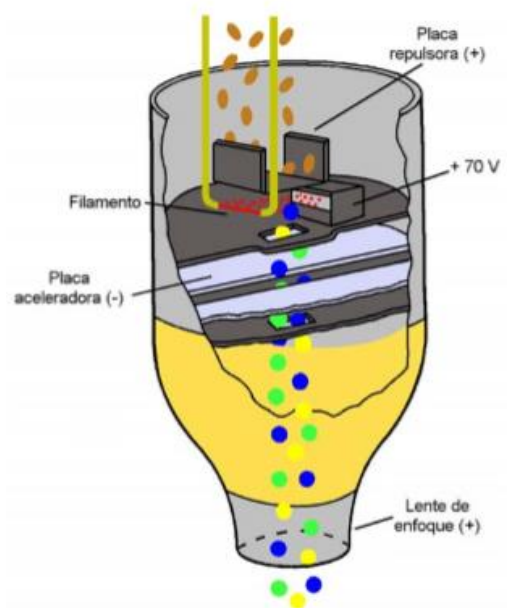


Figura 4: Esquema de fuente de impacto electrónico (3)



En cuanto a las técnicas de ionización por desorción, destaca la ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI) (Figura 5), ya que permite el análisis de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) y moléculas orgánicas de alto peso molecular (como polímeros y otras macromoléculas) con masas moleculares en un amplio intervalo de magnitud, desde algunos miles a varios cientos de miles de daltons.

En la técnica, se utiliza un compuesto matriz con el fin de proteger la molécula de analito de ser destruida por el rayo láser. El procedimiento comienza con la disolución de la muestra con la matriz en proporción 10.000:1. A continuación se pasa la disolución a un portamuestras específico de este proceso y se evapora el disolvente.

Los cristales resultantes son irradiados por una potente radiación láser en intervalos de tiempo del orden de nanosegundos. Se produce por consiguiente una desorción e ionización de la muestra (molécula objeto de análisis + matriz).

La matriz va a ser capaz de absorber mucha energía (de longitud de onda correspondiente a la ser laser) y acto seguido cede energía a las moléculas de la muestra de un modo paulatino; siendo el resultado los iones en fase gaseosa.

Los compuestos de los que se forman las matrices suele ser ácidos orgánicos pequeños, siendo el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico o el ácido 2,5-dihydroxibenzoico comúnmente utilizados. Deben contar con las siguientes características (1): debe ser una fuente de absorción de radiación a la longitud de onda del láser; tener facilidad a la hora de mezclarse con el analito de forma que se constituyan microcristales definidos; presentar una baja temperatura de sublimación, que va a permitir que se junten rápidamente la muestra y la matriz; y ser participe en alguna reacción fotoquímica de forma que puedan protonarse y desprotonarse adecuadamente las moléculas de la muestra.

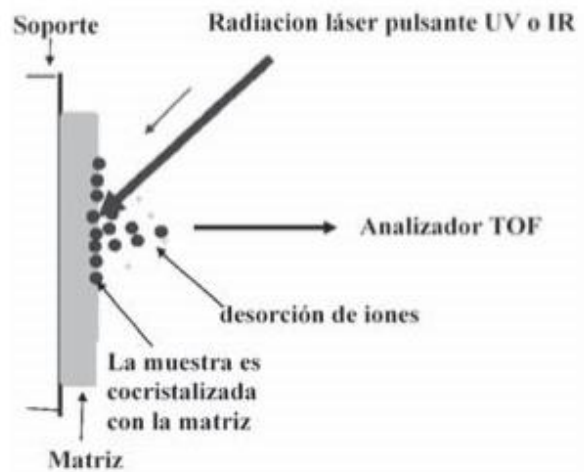


Figura 5: Esquema de un sistema de ionización MALDI (4)

El resultado del proceso suele ser un ion con una sola carga. Existen teorías sobre cómo se produce esta ionización, existiendo 3 modelos (2): modelo de ionización fotoquímico, modelo de ionización cluster y el modelo de transferencia pseudoprotónica.

Este sistema MALDI se acopla muy bien con el analizador de tiempo de vuelo (TOF) que se comentará posteriormente.

### 3. ANALIZADORES

El resultado de la fase anterior (ionización) es una mezcla de distintos iones que se deben separar y detectar de forma individualizada. El analizador por lo tanto va a tener dos funciones (4): separar los iones en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y dirigir los iones hacia un determinado punto.

Para poder distinguir entre las partículas cargadas se tiene en cuenta el movimiento que describen, así como su energía cinética.

La elección de cada tipo de analizador va a estar determinada por distintas variables: poder de resolución, intervalo de masas que permite separar y con qué exactitud las puede separar, intervalo dinámico lineal, velocidad de barrido, sensibilidad, eficacia, adaptabilidad.

En algunos casos se requiere el acoplamiento de dos analizadores. Los más usados son el analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Figura 9) (3), el cuadrupolo (Q) (Figura 6) (3), analizador de sector magnético (Figura 8) (3), la trampa de iones (IT) (Figura 7) (4), el orbitap y la resonancia iónica ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) (Tabla 2).

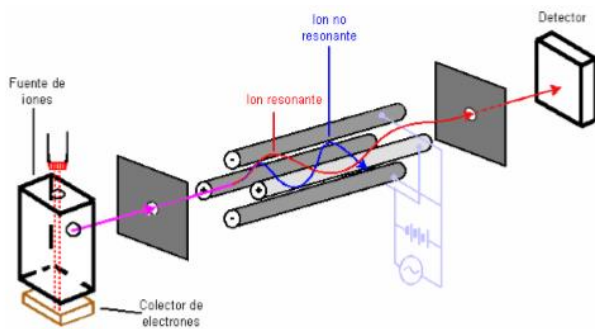


Figura 6: Esquema de analizador de masas cuadrupolar (3)

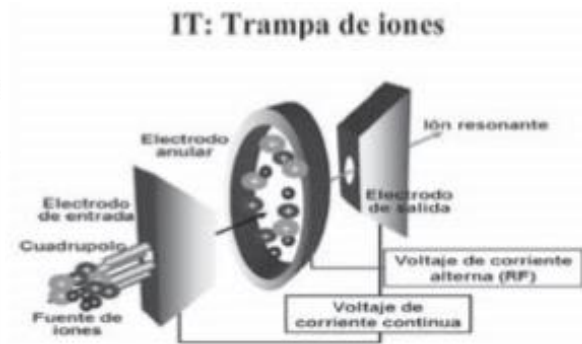


Figura 7: Esquema de analizador de trampa de iones (4)

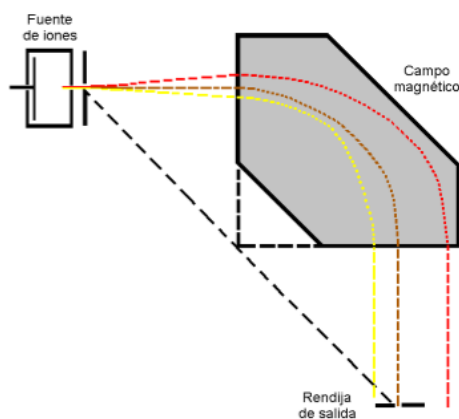


Figura 8: Esquema de analizador de sector magnético (3)

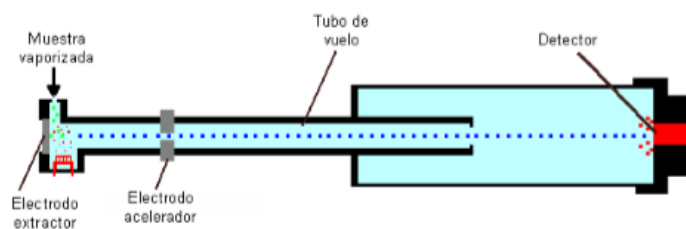


Figura 9: Esquema de analizador de tiempo de vuelo (TOF) (3)

Tabla 2. Ejemplos de analizadores de masas, con su intervalo y exactitud.  
(5)

<b>ANALIZADOR DE MASAS</b>	<b>INTERVALO DE MASA (DA)</b>	<b>DE EXACTITUD (PPM)</b>
<i>Cuadrupolo (Q)</i>	<i>2-2.000</i>	<i>100-1.000</i>
<i>Tiempo de vuelo (TOF)</i>	<i>10.000-20.000</i>	<i>10-100</i>
<i>Orbitab</i>	<i>30.000-60.000</i>	<i>0,1-1</i>
<i>Resonancia iónica ciclotrónica con transformada de Fourier</i>	<i>100.000-1 x 10<sup>6</sup></i>	<i>0,1-1</i>

#### 4 DETECTORES

El detector registra todos los iones según su relación  $m/z$  y los cuantifica según su abundancia relativa. Se encuentran detectores de varios tipos, como los fotomultiplicadores, la copa de Faraday, la placa fotográfica... y todos tienen la finalidad de aportar información sobre el flujo de iones y la abundancia de los mismos. Transforman dicho flujo en una señal eléctrica y tras un proceso de tratamiento de datos, se puede realizar la interpretación.

Existen sistemas informáticos acoplados a bibliotecas de espectros de forma que se consigue un proceso en línea que finaliza con la identificación y cuantificación del compuesto

#### OBJETIVOS

- ❖ Explicar el fundamento y funcionamiento de la espectrometría de masas como técnica analítica.
- ❖ Presentar distintos tipos de equipos analizando las prestaciones particulares de los más utilizados.
- ❖ Analizar las ventajas e inconvenientes que tiene su utilización acoplada con otras técnicas analíticas de separación.
- ❖ Presentar aplicaciones actuales de la espectrometría de masas en el ámbito clínico.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Dado que se trata de una revisión bibliográfica, las fuentes de información han sido publicaciones encontradas en las bases de datos: Google Académico, PubMed-NCBI, Elsevier, Scielo, Science direct, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Se ha restringido la búsqueda a artículos y publicaciones realizadas a partir del año 2003. Para la búsqueda de información en diversas fuentes bibliográficas se han utilizado como palabras clave: espectrometría de masas (EM), análisis clínico, fármaco, productos farmacéuticos, sistemas analizador, sistema de ionización, MALDI (ionización por desorción láser asistida por una matriz), cromatografía.

Su traducción al inglés, keywords: mass spectrometry, clinical analysis, drug, pharmaceutical products, mass analyzer system, ionization system, MALDI (matrix assisted laser desorption ionization), chromatography.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Debido a la dificultad que plantea la identificación de componentes de muestras biológicas, que suponen la gran mayoría de casos en el análisis clínico, no es suficiente el uso de un espectrómetro de masas, sino que va a ser necesario el empleo de equipos acoplados, que nos permite aunar las ventajas de cada uno.

Varcárcel en el año 2003 (4) define el acoplamiento o hibridación instrumental como: *la combinación a través de una interface de dos técnicas analíticas independientes, que genera una información única e integral de la composición de la muestra y se caracteriza por ser más completa que la información alcanzada independientemente por cada técnica.*

En esta revisión se exponen dos de los principales tipos de acoplamiento de técnicas: la espectrometría de masas en tándem (EM-EM) y la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-EM).

La espectrometría de masas en tándem es el acoplamiento de dos espectrómetros de masas. Estos suelen estar unidos por una cámara (celda de colisión en Figura 10) en la que se fragmentan las moléculas. Estos equipos nos permiten seleccionar un ion determinado ("ion precursor") mediante el primer espectrómetro. Seguidamente éste es bombardeado con gas y se acelera mediante un potencial eléctrico. Cuando las moléculas del ion colisionan con las del gas, el ion se fragmenta, formándose los "iones producto". Estos entran en el segundo espectrómetro donde son analizados.

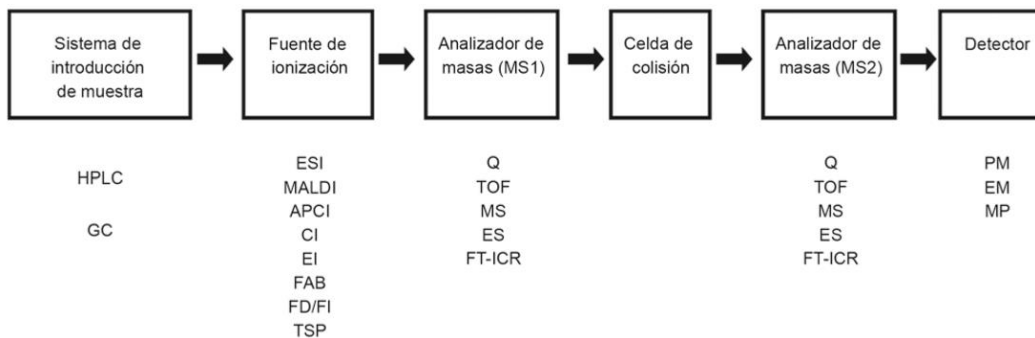


Figura 10: Esquema general de un sistema EM/EM con ejemplos de equipos en la parte inferior (6)

Esta técnica tiene un amplio uso para la identificación de proteínas. Los equipos que más se están utilizando para este tipo de análisis constan de un sistema de ionización MALDI acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Los analizadores de tiempo de vuelo son equipos sencillos, que están basados en que la velocidad que adquiere un ion depende de su relación  $m/z$ ; por ello se mide el tiempo que necesitan los iones en recorrer una distancia fija. Son equipos con muy buena resolución y exactitud.

La espectrometría de masas permite también el acoplamiento con técnicas de separación como la electroforesis o la cromatografía. (Figura 11)

La cromatografía tiene como objetivo la separación de los componentes de la muestra mediante la elución de una columna cromatográfica en aras de facilitar el posterior análisis por EM.

El principal problema que se debe solventar a la hora de acoplar ambos equipos es la presión a la que se trabaja en ellos; siendo más de una atmósfera en el caso de la cromatografía de gases y un alto vacío en la EM. Mediante una bomba de vacío de elevado caudal, se consigue mantener las presiones requeridas.

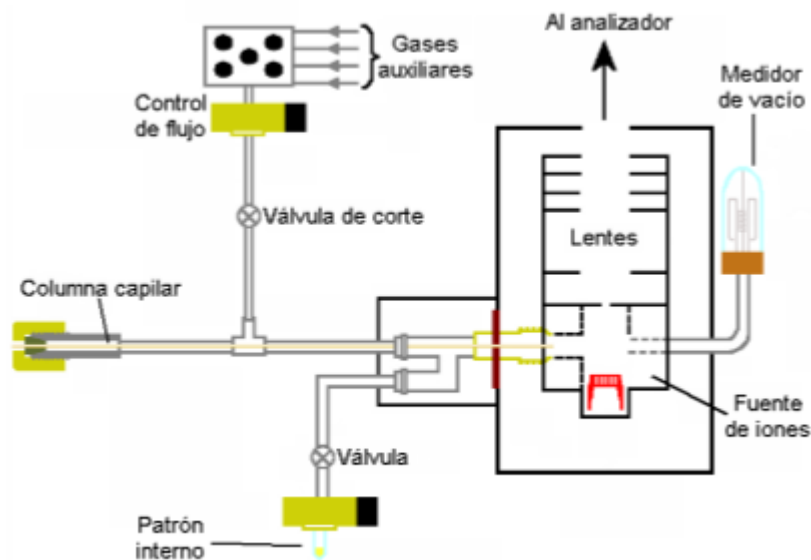


Figura (11) : Esquema del acoplamiento entre cromatografía de gases y EM

En el artículo publicado por Yang y Deng en 2016 (7), se pone de manifiesto que el actual desarrollo de la espectrometría de masas ambiental está permitiendo realizar un análisis rápido y sencillo de productos farmacéuticos y hierbas medicinales (5) los cuales necesitan poder garantizar unos estrictos requisitos de calidad. El uso de estos productos, que contienen principios activos en su composición, es cada vez más extendido, por lo que su seguridad y eficacia son una prioridad. Con el fin de garantizar estos requisitos, las técnicas de evaluación y análisis de composición han ido avanzando.

Entre estas técnicas encontramos: la espectrometría óptica (8) (9), la cromatografía (10) (11) y la espectrometría de masas (12) (13) (14).

La cromatografía acoplada con la espectrometría de masas ha sido probada como una herramienta de análisis que proporciona una excelente sensibilidad y una buena especificidad. El problema que se plantea, es el elevado tiempo de análisis que se consume, por lo que es necesario el desarrollo de metodologías de alto rendimiento.

Las aplicaciones de la EM ambiental para conseguir la evaluación de los productos farmacéuticos y hierbas medicinales han sido introducidas en análisis de un gran número de principios activos.

Se han utilizado diferentes técnicas de ionización ambiental tales como ionización por desorción con electrospray (DESI), ionización suave que se realiza a presión atmosférica y la ionización por análisis directo en tiempo real (DART) que permite el análisis, a presión atmosférica, de sólidos, líquidos o gases, sin necesidad de un pretratamiento o uso de disolventes. Este último sistema de ionización es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el análisis de productos farmacéuticos debido a que la fuente de ionización DART está disponible comercialmente, y su manipulación y el control de los parámetros es bastante sencillo. Entre las distintas estrategias de análisis farmacéutico mediante DART-EM se incluyen el análisis de formas farmacéuticas sólidas, análisis de fases líquidas de productos farmacéuticos, así como el acoplamiento de técnicas cromatográficas, entre otras. Los productos farmacéuticos en forma de comprimidos se analizan generalmente utilizando la ionización DART, habiéndose investigado gran variedad de ingredientes farmacéuticos activos (p.e. alcaloides, fenoles, flavonoides, ácidos orgánicos, saponinas triterpenoides), así como materias primas botánicas incluyendo *Atropa acuminata*, *Piper betle* Linn, *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata* y *Coriandrum sativum* entre otras.

Petrović y colaboradores en 2005 (15) realizaron una revisión bibliográfica sobre el uso de la cromatografía líquida acoplada con EM en tándem (LC-EM/EM) en el análisis de residuos farmacéuticos en el ambiente. Los principales grupos analizados fueron: antibióticos, antiinflamatorios no esteroídicos, beta-bloqueantes, reguladores de lípidos y fármacos psiquiátricos (Tabla 2). Estos grupos suponen lo que se conoce como contaminantes emergentes ya que su uso está en constante aumento, así como sus concentraciones en aguas de desecho.

La introducción de la LC-EM/EM ha permitido el análisis de un mayor rango de componentes o principios activos (Tabla 3) mejorando los resultados obtenidos por otras técnicas como la GC-EM, ya que se elimina el paso de la derivatización de los compuestos, manteniendo un límite de detección menor de 1ng/l.

Tabla 3 (15): Ejemplos de fármacos analizados en una muestra ambiental por LC-EM/EM

<b>GRUPO FARMACOLÓGICO</b>	<b>PRINCIPIO ANTIVO</b>
Analgésico/Anti-inflamatorio	Diclofenaco, ibuprofeno, acetaminofeno, fenoprofeno, hidrocodona, ketoprofeno, naproxeno, indometacina, fenazona, paracetamol
Regulador de lípidos	Benzafibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, atorvastatina, simvastatina, lovastatina, pravastatina.
Beta-Bloqueante	Atenolol, bisoprolol, metoprolol, propanolol, nadolol, timolol.
Antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tetraciclinas: oxitetraciclina, doxiciclina, clotetraciclina</li> <li>- B-lactamas (penicilinas): amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, meticilina, oxacilina.</li> <li>- Macrólidos: claritromicina, eritromicina,</li> <li>- Sulfonamidas</li> <li>- Fluoroquinolonas: ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino.</li> </ul>
Ansiolíticos, Anti-convulsivante, Anti-depresivo	Carbamazepina, diazepam, fluoxetina, meprobamato.
Otros	Trimetoprim, pentoxifilina, ranitidina, omeprazol, furosemida, hidroclorotiazida, glibenclamida.

En las siguientes tablas (Tabla 4.1 y Tabla 4.2) (15) se muestran diferentes investigaciones centradas en el empleo de la técnica CL-EM para la determinación cuantitativa de compuestos farmacéuticos en muestras medioambiental, indicando el grupo de compuestos al que pertenece, la muestra analizada, el pretratamiento realizado, condiciones cromatográficas, analizador de masas y límite de detección obtenido.

Tabla 4.1. Empleo de CL-EM para la determinación cuantitativa de compuestos farmacéuticos en muestras medioambientales

Componentes	Matriz	Pretratamiento de la muestra	Método de extracción
Método multiresiduo para productos farmacéuticos neutros y ácidos. (16)	Agua de superficie y residual	Acidificación pH 2	EFS (extracción en fase sólida)
Método multiresiduo para productos farmacéuticos ácidos: antibióticos, reguladores de lípidos, anti-inflamatorios. (17)	Sedimento de río	No reportado	Sonicación + EFS
Método multiresiduo para productos farmacéuticos ácidos y neutros. (18)	Agua de superficie y residual	Acidificación pH 3	EFS
Fármacos anti-inflamatorios. (19)	Agua de superficie, agua potable y aguas residuales	Agua potable: adición de N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	EFS
Fármacos ácidos (analgésicos, anti-inflamatorios, reguladores de lípidos). (20)	Agua de superficie y residual	Acidificación pH 2-2,5	EFS
Método multiresiduo para analgésicos, antiinflamatorios, beta-bloqueantes, reguladores de lípidos, antibióticos, antiepilépticos. (21)	Agua de superficie, agua potable y agua del suelo	Acidificación pH 3	EFS
Fármacos neutros (fenazona, pentoxifilina, carbamazepina). (22)	Aguas residuales	Acidificación pH 3	EFS
Reguladores de lípidos (23)	Agua de superficie y residual	Ajuste a pH 7,5	EFS
Beta-bloqueantes (24)	Agua de río y potable.	Acidificación pH 4,5	EFS
Atorvastatina, roxitromicina, novobiocina. (25)	Agua de río y aguas residuales	Acidificación pH 3,5	EFS
Macrólidos, ionóforos, tiamulina. (26)	Suelo	No reportado	Extracción líquida a presión + EFS
Oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadiazina, eritromicina, tilosina. (27)	Suelo	Aire seco con 5% de humedad y tamizado (2mm)	Extracción líquida a presión + EFS

Tabla 4.2. Empleo de CL-EM para la determinación cuantitativa de compuestos farmacéuticos en muestras medioambientales (continuación).

Componentes	Solvente de elución	Separación por CL. Columna	Separación por CL. Fase móvil	Sistema de EM	Límite de detección (LOD)
Método multiresiduo para productos farmacéuticos neutros y ácidos (16)	MeOH/MTBE	C12	(acuosa) Ac fórmico/MeOH	Triple cuádruplo ESI/APCI	1,0 (ng/l)
Método multiresiduo para productos farmacéuticos ácidos: antibióticos, reguladores de lípidos, anti-inflamatorios. (17)	Acetona	C18	(acuosa) Ac acético/ac Ac NH4/acetoneitrilo	Triple cuádruplo ESI/APCI	0,4-8 ng/g (Límite de detección, LOD)
Método multiresiduo para productos farmacéuticos ácidos y neutros. (18)	MeOH	C18	(acuosa) Ac NH4/MeOH	Triple cuádruplo ESI	10-50 (ng/l)
Fármacos anti-inflamatorios. (19)	MeOH/cloruro de tetrabutilamonio	C18	MeOH/ac formiato amónico	Triple cuádruplo ESI	No reportado
Fármacos ácidos (analgésicos, anti-inflamatorios, reguladores de lípidos). (20)	MeOH	Fenilhexilo	MeOH/ac trietilamina/ac Ac acético (par iónico)	Triple cuádruplo ESI	0,15-2,5 (ng/l) (LOD en agua de superficie)
Método multiresiduo para analgésicos, antiinflamatorios, beta-bloqueantes, reguladores de lípidos, antibióticos, antiepilépticos. (21)	MeOH/aq. NH3	No reportado	(acuosa) Ac NH4/MeOH	Triple cuádruplo ESI Q-TOF ESI	5-25 (ng/l) (LOD)
Fármacos neutros (fenazona, pentoxifilina, carbamazepina). (22)	MeOH	C18	(acuosa) Ac NH4/acetoneitrilo	Triple cuádruplo ESI	0,5-1 µg/l
Reguladores de lípidos (23)	MeOH	C18	(acuosa) metilamina/ac Ac acético/acetoneitrilo	Triple cuádruplo ESI	0,1-15,4 (ng/l)
Beta-bloqueantes (24)	MeOH/aq. NH3	C8	(acuosa) Ac NH4/acetoneitrilo	Triple cuádruplo ESI	0,12-0,15 (ng/l)
Atorvastatina, roxitromicina, novobiocina. (25)	MeOH	C18	(acuosa) Ac NH4/acetoneitrilo	Triple cuádruplo ESI	1 (pg) total
Macrólidos, ionóforos, tiamulina. (26)	ACN/aq. NH4Ac	C18	(acuosa) NH4Ac/ACN	Triple cuádruplo APCI	0,2-1,6 µg/kg
Oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadiazina, eritromicina, tilosina. (27)	MeOH	C18	(acuosa) Ácido fórmico/MeOH	Triple cuádruplo ESI	1-5 µg/kg



En 2010, Babic y colaboradores (28) desarrollaron un método analítico para la determinación de ciertos grupos de fármacos en aguas residuales mediante LC-EM/EM. Considerando que esta la técnica de elección para el análisis de fármacos polares en muestras ambientales, los grupos objeto de estudio fueron: sulfonamidas, fluoroquinolonas, diaminopirimidinas, anestésicos, antihelmínticos y macrólidos. Se eligieron estos compuestos activos debido a que su producción, uso y naturaleza produce un efecto contaminante en los animales y microorganismos del medio ambiente, lo cual puede afectar potencialmente a la calidad del agua para consumo humano (29). El método desarrollado lleva asociado una etapa de pretratamiento mediante preconcentración y extracción en fase sólida. En todos los casos, el porcentaje de recuperación obtenido fue superior al 50 %, excepto con la sulfaguanidina. Se obtuvo un límite de detección entre 0.5 y 5 ngL<sup>-1</sup> en muestras de agua enriquecidas.

El National Institutes Health (NIH) estableció la definición de biomarcador como *aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica* (30) (31). Es por ello, que su análisis y determinación resultan de gran interés y utilidad farmacoclínica.

En cuanto a su análisis en clínica (4) (32) (33), se ha producido un gran avance en las técnicas utilizadas. En primera instancia se utilizaba GC-EM, la cual presentaba muchas limitaciones, como una tediosa preparación de la muestra. Además, quedaban excluidas del análisis moléculas de alto peso molecular o que presentaran una polaridad muy alta. Gracias al avance de estas técnicas, hoy en día se han conseguido unos buenos resultados de análisis de muestras de distinta naturaleza, una reducción del tamaño del instrumental y un manejo más sencillo.

La utilidad de la detección de biomarcadores es el diagnóstico clínico, por lo que los métodos empleados deben proporcionar la mayor información posible, permitir una alta velocidad de muestreo y un análisis e interpretación de resultados lo más sencillo posible.

La GC/EM es adecuada para muestras con una volatilidad y tamaño determinados, siendo los compuestos derivatizables como por ejemplo: ácidos grasos, orgánicos y biliares; aminoácidos, monosacáridos, prostaglandinas y esteroides.

Esta técnica es utilizada en el diagnóstico de acidemias orgánicas (trastorno metabólico cuya forma con mayor prevalencia es la acidemia propiónica neonatal).

También es empleada como método de screening o cribado en programas de prevención de enfermedades como la aciduria metilmalónica (34) secundaria o trastornos metabólicos. El cribado neonatal en la actualidad permite la detección de muchas enfermedades (35) (36).

Mediante la LC-EM/EM se lleva a cabo un análisis de los metabolitos del alcohol (etilglucurónico y etilsulfato), lo cual permite realizar un cribado en estudios sobre alcoholismo.

Así mismo, la EM ha resultado ser una técnica de gran utilidad en la identificación de proteínas. Estas pueden ser biomarcadores específicos de una enfermedad (pe. transtirretina como biomarcador de la amiloidosis familiar). (4)

En el ámbito de la proteómica (conjunto de técnicas y estrategias utilizadas para el estudio de las proteínas originadas por el genoma, el proteoma) la EM tiene una aplicación limitada por el momento; sin embargo tiene una enorme potencial aplicación, existiendo un gran número de líneas de investigación en este campo (37).

## **CONCLUSIÓN**

Las técnicas de análisis permiten una mejora en el análisis y diagnóstico clínico, permitiendo la detección de cuantificación de productos farmacéuticos, biomarcadores, residuos, hierbas medicinales... que tienen una repercusión directa en la salud del ser humano.

La espectrometría de masas es actualmente una herramienta que permite obtener los resultados buscados gracias a sus propiedades analíticas, destacando su alta sensibilidad, elevada especificidad y exactitud, así como a su versatilidad y posibilidad de acople con técnicas de separación de componentes como son las técnicas cromatográficas.

Existe un gran abanico de equipos que posibilita la elección del método que permite la obtención de mejores resultados en función de la naturaleza de la muestra.

Esta técnica analítica se ha utilizado con éxito en la determinación cuantitativa de tóxicos, fármacos, biomarcadores, principios activos, contaminantes, levaduras o microorganismos, entre otros.

## **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Sánchez CG. Principios de análisis instrumental, 6ta Edición Douglas A. Skoog. 11 (2014) 281.

(2) Hauschild, J. P., Wapelhorst, E. & Müller, J. Mass spectra measured by a fully integrated MEMS mass spectrometer. International Journal of Mass Spectrometry. 264(2007) 53-60.

(3)[https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf)

(4) Gómez MCM, González MB (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Monogr Real Acad Nac Farm.

(5) Q.F.B. Cynthia Fernández-Lainez,\* Dra. Marcela Vela-Amieva,\* M. en C. Isabel Ibarra-González\* Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory. Johns Hopkins University. (2009). 260.

(6)<https://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm2009/apm09.pdf>

(7) Y. Yang, J. Deng, Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry, Trends, Anal. Chem. 82 (2016) 68-88.

(8) Z. Shi, C.A. Anderson, Scattering orthogonalization of near-infrared spectra for analysis of pharmaceutical tablets, Anal. Chem. 81 (2009) 1389-1396.

(9) Y. Jiang, B. David, P. Tu, Y. Barbin, Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines –a review, Anal. Chim. Acta 657 (2010) 9-18.

(10) F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, J.V. Sancho, Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, Trends Anal. Chem. 63 (2014) 140-157

(11) X. Wang, A. Zhang, G. Yan, Y. Han, H. Sun, UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines, Trends Anal. Chem. 63 (2014) 180-187

(12) M. Ibáñez, J.V. Sancho, L. Bijlsma, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, F. Hernández, Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances, Trends Anal. Chem. 57 (2014) 107-117.

(13) L. Vaclavik, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 6767-6790.

(14) Z. Zhang, T. Bo, Y. Bai, M. Ye, R. An, F. Cheng, et al., Quadrupole time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for demystifying traditional Chinese medicine, Trends Anal. Chem. 72 (2015) 169-180.

(15) Petrović M, Hernando MD, Díaz-Cruz MS, Barceló D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. J Chromatogr. A. 1067 (2005) 1-14.

(16) B.J. Vanderford, R.A. Person, D.J. Rexing, S.A. Zinder, *Anal. Chem.* Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 75 (2003) 6265.

(17) D. Löffler, T.A. Ternes, *J. Chromatogr.* Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. A 1021 (2003) 133.

(18) M.J. Hilton, K.V. Thomas, *J. Chromatogr.* Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. A 1015 (2003) 129.

(19) S. Marchese, D. Perret, A. Gentili, R. Curini, F. Pastori. Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Surface Water and Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. 58 (2003) 263.

(20) J.B. Quintana, T. Reemtsma, *Rapid Commun.* Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion - pair reverse - phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 18 (2004) 765.

(21) A.A.M. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F.M. Versteegh, R. Fuchs, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 955.

(22) D. Calmari, E. Zacate, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1241.

(23) C.D. Metcalfe, B.G. Koenig, D.T. Bennie, M. Servos, T.A. Ternes, R. Hirsch, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 2872.

(24) X.-S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Mass.* Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. . 38 (2003) 27.

(25) X.-S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr.* Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry A 998 (2003) 133

(26). K.D. Bratton, A.S. Lillquist, T.D. Williams, C.E. Lunte, *Liquid chromatography/mass spectrometry MS/MS and time-of-flight MS*, in: *Analysis of emerging contaminants. LC/MS MS/MS and TOF/MS analysis of*

emerging contaminants, ACS Symposium Series 850, American Chemical society, Washington, DC, 2003, 188.

(27) A.M. Jacobsen, B. Halling-Sorensen, F. Ingerslev, S.H. Hansen, J. Chromatogr. A 1038 (2004) 157.

(28) Babić S, Pavlović DM, Ašperger D, Periša M, Zrnčić M, Horvat AJ, et al. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). Anal Bioanal Chem. 398(2010)1185–1194.

(29) Kümmerer K Pharmaceuticals in the environment. Springer, Berlin (2008)

(30) Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS 5 (2010) 463-466.

(31) Richards AM. New biomarkers in heart failure: applications in diagnosis, prognosis and guidance of therapy. Rev Esp Cardiol 63 (2010) 635-639.

(32) Vekey, K., Telekes, A. & Vertes, A. Medical applications of mass spectrometry. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. (2007)

(33) Chhabil, D. Biological Mass Spectrometry in: Fundamentals of contemporary mass spectrometry,. Wiley-Interscience Hoboken. New Jersey. (2007) 287-393

(34) Youan-Zong, S. et al. Selective screening for inborn error of metabolism and secundary methylmalonic aciduria in pregnancy at high risk district of neural tube defects: A human metabolome study by GC-MS in China. Clinical Biochemistry. 41 (2008) 616-620.

(35) Spitzer, A. R. & Chace, D. Mass spectrometry in Neonatal Medicine and clinical diagnostics- the potential use of mass spectrometry in neonatal brain Monitoring. Clinics in Perinatology. 33(2006) 729-744.

(36) Spitzer, A. R. & Chace, D. Proteomics and metabolomics based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically III neonate Clinics in Perinatology. 35 (2008)695-716.

(37) Abián, J., Carrascal, M. & Gay, M. Introducción a la Espectrometría de masas para la caracterización de Péptidos y proteínas en Proteómica. Proteómica. 2 (2008)16-35.