

DETERMINACIÓ DE POLIAMINES EN ORINA MITJANÇANT UHPLC-MS/MS

Verónica Ribas López

TREBALL DE FI DE MÀSTER

**Directors: Dr. Antoni del Pino i Iris Samarra
Center of Omic Science**

**Tutora: la Dra. Carme Aguilar
URV**

Màster en Genètica, Física i Química Forense



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2018

RESUM

En els últims anys s'ha demostrat que les prolamines són un potencial candidat per actuar com a biomarcadors del càncer. En aquest treball s'ha desenvolupat un mètode mitjançant l'acoblament de la cromatografia líquida d'ultra alt rendiment amb l'espectrometria de masses en tàndem amb un analitzador de triple quadrupol (UHPLC-MS/MS) per la determinació simultània de les poliamines, els seus precursors i els seu catabòlit en l'orina humana. Els precursors de les poliamines que s'han determinat inclouen ornitina, lisina i arginina; les poliamines són 1,3-diaminopropà, agmatina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, N-acetilputrescina, N1-acetilespermidina, N8-acetilespermidina, N-acetilespermina, N1,N8-diacetilespermidina i N1,N12-diacetilespermina; el catabòlit de les poliamines és l'àcid γ -aminobutíric .

Les mostres han sigut pretractades mitjançant diferents procediments amb la finalitat de comparar-los i escollir el més adequat. El primer pas consisteix en una precipitació de les poliamines mitjançant metanol amb cloroform o àcid perclòric, seguidament s'ha dut a terme la derivatització mitjançant clorur de dansil. Per finalitzar s'ha realitzat una extracció líquid-líquid amb acetat d'etil i TFA o una extracció de fase sòlida. El procediment d'extracció seleccionat ha sigut l'extracció amb metanol i cloroform/ derivatització/Líquid-Líquid pel seu menor efecte matriu i millor recuperació.

Les poliamines derivades han sigut separades amb una columna C18 utilitzant un programa de gradient. La detecció s'ha realitzat amb el sistema UHPLC-MS/MS amb una font d'ionització d'electrosprai en mode positiu (ESI+) i el mode de treball escollit ha sigut el monitoratge de múltiples reaccions (MRM). S'ha obtingut la corba de calibratge per a cada poliamina amb un coeficient de determinació superior a 0.993, amb uns límits de detecció d'entre 0.04 i 6.86 ng/ml i uns límits de detecció d'entre 4-32000 ng/ml. Per últim, els CV dels intra- i inter-dia de tots els anàlits han estat 5.23-21.66% i 0.78-18.24%, respectivament.

ABSTRACT

In the last years, it has been shown that polyamines are a potential candidate to act as cancer biomarkers. In this work a method has been developed by coupling ultra-high performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of polyamines precursors, polyamines and polyamine catabolite in human urine. Polyamine precursors including ornithine, lysine and arginine; polyamines including agmatine, putrescine, cadaverine, 1,3-diaminopropane, spermidine, spermina, N-acetylputrescine, N1-acetylspermidine, N8-acetylspermidine, N-acetylspermine, N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12-diacetylspermine; polyamine catabolite including γ -aminobutyric acid had been determined.

The samples have been pre-treated using different procedures to compare them and choose the most suitable. The first step consists of a precipitation of the polyamines by methanol and chloroform or perchloric acid extraction, followed by derivatization with dansyl chloride. The last extraction has been carried out with solid phase extraction or liquid-liquid extraction with ethyl acetate and TFA. The procedure selected has been extraction with methanol and chloroform/ derivatization/ Liquid-Liquid due to its lower matrix effect and better recovery.

Derived polyamines have been separated with a C18 column using a gradient program. The detection has been performed with the UHPLC-MS/MS system with electrospray ionization source in the positive ion (ESI+) and multiple reactions-monitoring mode (MRM). The calibration curve has been obtained for each polyamine with a determination coefficient greater than 0.993. The limits of quantitation for all analytes were within 0.04 and 6.86 ng/ml. The limits of quantitation for all analytes were within 4 and 32000 ng/ml in urine. Finally, the intra-and inter-day CVs for all analytes were 5.23-21.66% and 0.78-18.24%, respectively.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 Poliamines	1
1.2 Biosíntesis de les poliamines.....	3
1.3 Determinació de les poliamines en orina.....	5
2. OBJECTIUS	7
3. MATERIAL I MÈTODES	8
3.1 Reactius i materials	8
3.2 Instrumentació	8
3.3 Preparació dels patrons	8
3.4 Mostres d'orina.....	10
3.5 Extracció	10
3.6 Anàlisi per UHPLC-MS/MS.....	12
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	13
4.1 Optimització de les condicions UHPLC-MS/MS.....	13
4.1.1 Optimització de l'espectrometria de masses	13
4.1.2 Optimització del mètode cromatogràfic	14
4.1.3 Identificació	18
4.1.4 Optimització de l'extracció.....	21
4.2. Paràmetres de qualitat.....	24
4.2.1 Recta de calibratge.....	24
4.2.2 Límits de detecció i de quantificació	25
4.2.3 Precisió	26
5. CONCLUSIONS	28
6. BIBLIOGRAFIA	29

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Poliamines

Les poliamines són alquilamines policatòniques de baix pes molecular que estan presents en tots els organismes, deriven dels aminoàcids i són essencials pel creixement i diferenciació cel·lular. Entre les poliamines més importants es troben l'1,3-diaminopropà (DAP), l'agmatina, la putrescina (PUT), la cadaverina (CAD), l'espermidina (SPD), l'espermina (SPM), l'acetilespermidina (AcSPD), l'acetilespermina (AcSP), la diacetilespermidina (DiAcSPD) i la diacetilespermina (DiAcSP) ¹⁻³. En la Figura 1 es pot observar l'estructura molecular de les principals poliamines i d'alguns dels seus catabòlits com és l'àcid γ -aminobutíric (GABA).

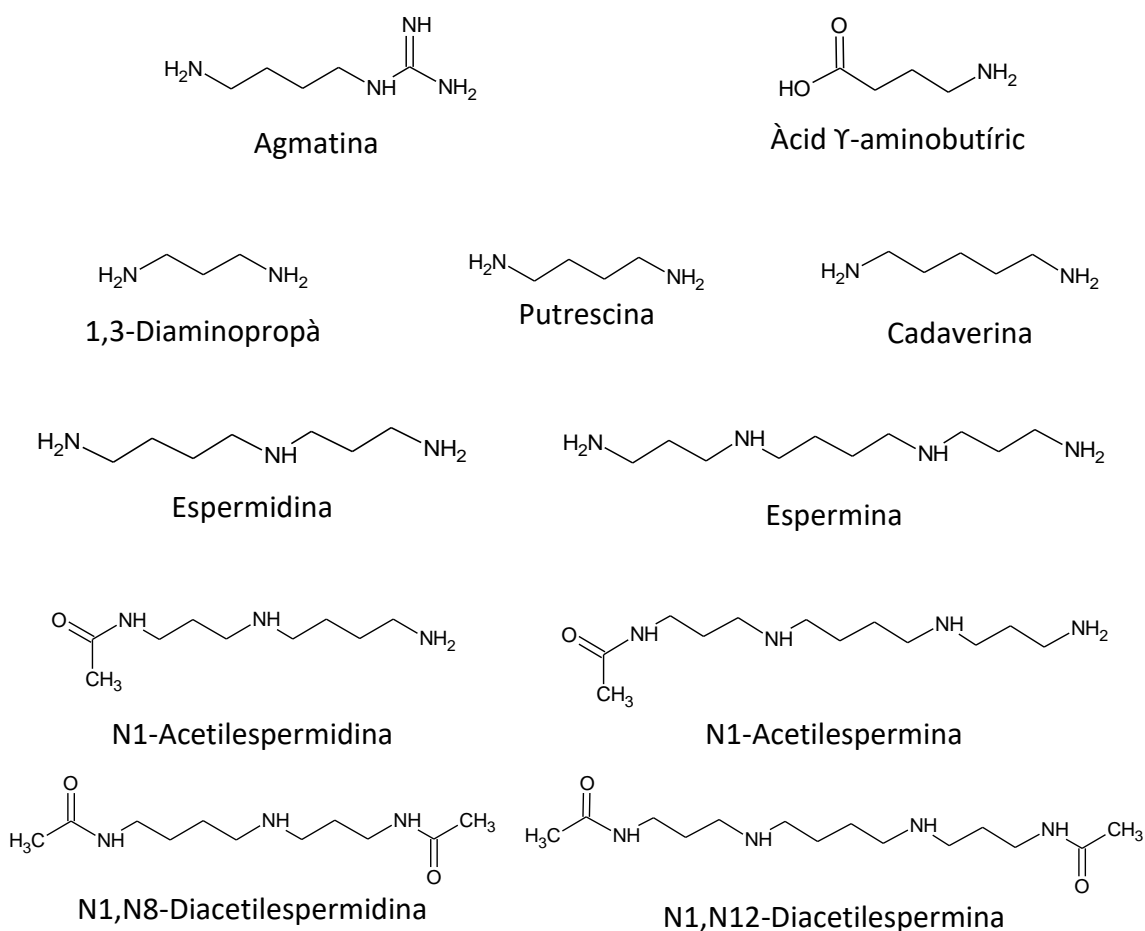


Figura 1. Estructura molecular de les poliamines i alguns dels seus catabòlits.

Aquests polícatons són solubles en aigua i en el pH fisiològic tots els grups amino estan carregats positivament ⁴. Per aquesta raó interactuen amb molècules carregades negativament com és l'ADN, RNA, proteïnes àcídiques i fosfolípids ^{5,6}. Entre les principals funcions de les poliamines es troben l'empaquetament d'àcids nucleics, la modulació de receptors de membrana i canals iònics, el manteniment de l'estructura de la cromatina, la regulació de l'expressió gènica i la senyalització cel·lular ¹. Del contingut total cel·lular i dels fluids biològics només al voltant del 7-10% són poliamines lliures, per exemple en el cas de l'orina humana les poliamines són excretades principalment en la seva forma acetilada ⁷. La desregulació del metabolisme de les poliamines ha estat descrita com a indicador de diferents malalties com el càncer, diabetis, vessament cerebral i inflamació i insuficiència renal ⁶.

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) el càncer és la segona causa de mortalitat a nivell mundial, causant la mort a 8,8 milions de persones l'any 2015. S'estima que cap a l'any 2035 les morts causades per tumors augmentarà a 14 milions ⁸. Avui en dia, el tractament contra el càncer no consisteix només en l'efectivitat del tractament sinó en detectar-lo en la major brevetat possible i en la seva prevenció. En la investigació de malalties, l'anàlisi de biomarcadors de metabòlits proporciona la generació d'un diagnòstic innovador i no invasiu ⁹.

L'orina és una matriu biològica important i freqüentment utilitzada per a la determinació de l'estat físic del pacient, ja que és fàcil de recollir i no és invasiva ¹⁰. Des que D. Russell va reportar el 1971 una concentració elevada de poliamines en l'orina humana en pacients amb càncer ¹¹. Posteriorment s'han publicat nombrosos estudis on s'ha pogut demostrar que un dels biomarcadors més importants per a la detecció precoç del càncer o per a la identificació de l'eficàcia de la quimioteràpia en els diferents fluïts corporals incloent l'orina són les poliamines ^{12,13}.

Les poliamines són necessàries per dur a terme la divisió cel·lular, per aquest motiu, la seva distribució dins l'organisme s'afavoreix en aquells teixits i òrgans que es troben en creixement o divisió activa. Els nivells de poliamina *in vivo* es poden reconèixer com un equilibri dinàmic entre l'anabolisme i el catabolisme. Durant l'evolució del càncer aquest equilibri pot ser alterat, aquest succés s'associa a concentracions elevades de les poliamines en comparació de les cèl·lules normals. Depenent el tipus de càncer el

seu metabolisme és diferent, per tant, els nivells de poliamines per cada tipus de càncer variarà^{9, 14}.

1.2 Biosíntesis de les poliamines

En els éssers humans les poliamines poden provenir de dos orígens diferents, per una banda d'un origen endogen per la biosíntesi *in situ* a partir dels aminoàcids, així com de les secrecions digestives, descamacions i els productes del catabolisme de les pròpies cèl·lules intestinals. D'altra banda d'un origen exogen que s'obté principalment a partir de l'alimentació i mitjançant la producció de poliamines per als microorganismes intestinals, les secrecions i la flora microbiana¹⁵.

Les poliamines són absorbides per diversos mecanismes que inclouen l'ús de transportadors, així com absorció via paracel·lular (entre dues membranes adjacents). A més aquests compostos pateixen una intensa metabolització abans d'assolir la circulació sistemàtica¹⁶.

La L-arginina és considerada un aminoàcid essencial per a mamífers joves en desenvolupant, en canvi és un aminoàcid no essencial per als mamífers sans i en la seva maduresa. Aquest aminoàcid mitjançant l'acció de l'arginasa i de l'arginina descarboxilasa (ADC) es converteix respectivament en L-ornitina i agmatina. Seguidament es produeix la descarboxilació de la L-ornitina on la descarboxilasa ornitina (ODC) li retira un grup carboxílic (COOH) i en el seu lloc s'addiciona un grup amino (NH₂) obtenint la putrescina, aquesta poliamina es pot sintetitzar mitjançant una altra ruta a partir de l'agmatina amb l'acció de l'agmatinasa. La ruta que es duu a terme depèn de l'espècie i del moment del desenvolupament en què es produeix la síntesi^{7, 17, 18}.

Un cop obtinguda la putrescina a través de les aminotransferases, l'espermidina sintetasa i l'espermina sintetasa, es catalitza l'addició dels grups propilaminos provinents de la S-adenosilmetionina descarboxilada obtenint respectivament l'espermidina i l'espermina. A partir de la metionina i de l'enzim S-adenosilmetionina sintetasa es sintetitza la S-adenosilmetionina (SAM), on posteriorment és descarboxilada enzimàticament per la descarboxilasa S-adenosilmetionina (SAMDC)

obtenint la S-adenosilmetionina descarboxilada. Una altra de les poliamines que se sintetitza a partir d'un aminoàcid és la cadaverina que s'obté a partir de la lisina mitjançant l'enzim lisina descarboxilasa ^{14,19}.

Una gran part del catabolisme terminal de les poliamines consisteix en la desaminació oxidativa deguda a la reactivitat de les diamooxidases (DAO) amb la dependència del Cu^{2+} , aquest enzim es pot trobar en diferents teixits com la mucosa intestinal, el ronyó i el fetge. La putrescina en lloc de convertir-se a espermidina pot ser oxidada a α -aminobutirat per la diamina oxidasa (DAO), aquest aldehid posteriorment serà oxidat a γ -aminobutirat (GABA) o donarà compostos cíclics ²⁰. A més, la putrescina també pot acetilar-se per un enzim microsomal obtenint la monoacetilputrescina i aquesta es pot oxidar per una monoaminaoxidasa per produir el GABA, normalment aquest procés és el que succeeix en el cervell quan té baixa activitat de DAO ¹⁵.

Les poliamines poden ser interconvertides en altres mitjançant dues reaccions acoblades, els dos enzims principals que intervenen en aquestes reaccions són l'espermidina/espermina N^1 -acetiltransferase (SSAT) i l'oxidasa poliamina (PAO). Una de les reaccions acoblades és l'acetilació que es porta a terme mitjançant un enzim nuclear que és la SSAT, aquest enzim utilitza l'acetil CoA per convertir l'espermidina i l'espermina preferentment a N^1 -acetiespermidina i N^1 -acetiespermina, respectivament. L'altra reacció que es catalitza amb l'enzim PAO, és la desaminació oxidativa de l'espermina produint l'espermidina i de l'espermidina obtenint la putrescina ^{15, 21}.

L'etapa clau de la biosíntesi de les poliamines és catalitzada per l'enzim ODC, per tant, les amines derivades de l'ornitina juguen un paper clau en la proliferació del tumor. Un dels primers passos en la proliferació cel·lular és l'augment de l'activitat de l'ODC i de la SAMDC. En conseqüència les concentracions de putrescina, espermidina i espermina tant lliures com acetilades augmenten considerablement, si aquest augment és molt elevat es produeix un procés d'apoptosis cel·lular. En l'orina és possible detectar tant les poliamines mateixes com les seves formes acetilades i els seus productes d'oxidació ⁹. A continuació es pot observar un esquema de tot el cicle metabòlic en la Figura 2.

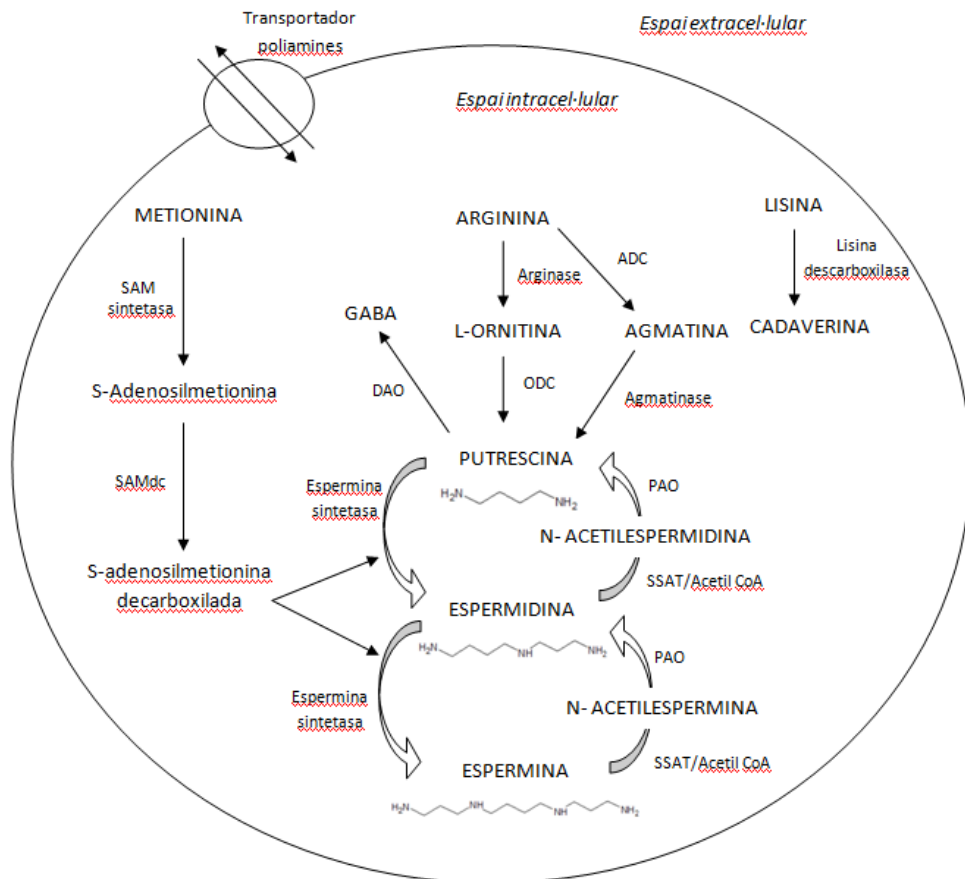


Figura 2. Cicle metabòlic de les poliamines.

1.3 Determinació de les poliamines en orina

Les mostres d'orina tenen una matriu complexa, per aquest motiu s'ha de tenir present que hi ha compostos en aquestes mostres que poden interferir amb les reaccions específiques de les poliamines, per tant, és important aconseguir una extracció eficient d'aquestes.

D'acord amb la bibliografia aquesta extracció es pot dividir l'extracció bàsicament en tres etapes, la primera consisteix en la precipitació de les proteïnes així com d'altres interferències que pugui contenir la mostra, una derivatització de les poliamines i el tercer pas es basa en una neteja abans de procedir a fer l'anàlisi de les poliamines per acabar d'arrossegant el màxim de components interferents que puguin quedar ²².

Per la determinació de poliamines per detecció UV/Vis o fluorescència les poliamines han de ser derivatitzades, ja que aquests compostos no posseeixen un grup cromòfor o fluoròfor. La derivatització precolumna també s'utilitza per la determinació per

cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) perquè els productes no polars obtinguts poden ser fàcilment separats en columnes de fase reversa amb les fases mòbils adequades, millora la seva eficiència de ionització i facilita una posterior purificació^{5,16}. Entre els reactius derivatitzants més àmpliament utilitzats en l'anàlisi de les poliamines es troba el clorur de dansil, el clorur de benzoil, el clorur de dabsil, el O-phtaldheyde, 9-fluorimetil cloroformat (FMOC), el 6-Aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamat (6-ACCQ) o el 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride (FNBT). En el cas de que les poliamines no siguin derivatitzades l'alternativa més emprada és LC-MS/MS utilitzant formadors de parells iònics emprant columnes C18^{23,24}.

En el cas de la purificació posterior a la derivatització de les poliamines, els dos tipus d'extraccions més utilitzades en la determinació de les poliamines són l'extracció líquid-líquid (LLE) que es basa en la separació dels anàlits de la mostra a causa de la seva diferència de solubilitat en dos solvents immiscibles, i l'extracció en fase sòlida (SPE) que consisteix en la retenció sobre una fase sòlida dels anàlits d'interès dissolts en una mostra líquida²⁵. Tot i això, en els estudis reportats fins ara majoritàriament utilitzen l'LLE en lloc de l'SPE, donat la complexitat de polaritat i carregues entre els compostos després de la seva derivatització²⁶.

Les poliamines es troben en l'orina a uns nivells de nM-M, això vol dir, que són components minoritaris que requereixen mètodes amb una elevada sensibilitat per poder ser detectats i quantificats. Els mètodes d'anàlisi desenvolupats més utilitzats per estudiar tant les poliamines com els aminoàcids es basaven principalment en la separació cromatogràfica utilitzant la cromatografia de líquids (LC) o la cromatografia de gasos (GC) amb una pre- o post-derivatització combinat amb detectors tradicionals com l'ultraviolat visible, la fluorescència o l'espectrometria de masses. Tot i que aquests mètodes s'havien aplicat per determinar les poliamines en algunes mostres biològiques, la detecció simultània d'aquests anàlits a baixa concentració en matrius biològiques complexes encara era un problema^{18,27}.

Aquest problema s'ha pogut millorar amb l'acoblament de la cromatografia de líquids amb LC-MS/MS^{8,19}. Per exemple Christoph Magnes et al. va reportar un mètode LC-MS/MS per determinar vuit poliamines en diferents matrius biològiques²⁸. Ran Liu et al. va reportar un mètode LC/QTOF MS per determinar sis poliamines utilitzant clorur

de benzoïl com a derivatitzant en mostres d'orina i plasma ²⁶. Aquest mètode ha estat utilitzat en l'anàlisi exhaustiva de mostres complexes a causa del gran nombre d'avantatge com són eliminació d'interferències espectrals, la millora de la relació senyal/soroll, a més de l'elevada sensibilitat i selectivitat respecte els mètodes amb un únic analitzador. En la majoria dels mètodes reportats per determinar les poliamines s'utilitza la separació cromatogràfica amb l'espectrometria de masses en tàndem on s'usa una ionització suau com és la ionització d'electrosprai (ESI) en mode positiu perquè tant els derivats de les poliamines com dels aminoàcids presenten una major abundància d'ionització en mode positiu que en mode negatiu ²⁹.

2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball consisteix en desenvolupar un mètode analític per determinar simultàniament les poliamines, les seves formes mono i diacetilades, els seus precursors i catabòlits en mostres d'orina humana mitjançant la detecció per cromatografia líquida de fase reversa acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem de triple quadrupol amb ionització d'electrosprai positiu (UHPLC-ESI(+)-QqQ).

Els anàlits inclosos en aquest estudi són l'Arginina, Agmatina, N1,N8-Diacetilespermidina (N1,N8-DiAcSPD), N-acetilputrescina (N-AcPUT), putrescina (PUT), γ -àcid aminobutíric (GABA), N1,N12-Diacetilespermina (N1,N12-DiAcSP), Ornitina, Lisina, N1-acetilespermidina (N1-AcSPD), N8-acetilespermidina (N8-AcSPD), Espermidina (SPD), 1,3-Diaminipropà (DAP), Cadaverina (CAD), N-acetilspermidina (N-AcSP) i Espermina (SP).

També s'han comparat tres tècniques d'extracció diferents per poder escollir quin és el més adequat per aquest tipus d'anàlisi. Aquestes tècniques consisteixen en una primera extracció líquid-líquid seguit de la derivatització, i finalment es du a terme l'extracció líquid-líquid o l'extracció en fase sòlida.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Reactius i materials

Els reactius utilitzats són aigua Milli-Q (Millipore), acetonitril de grau LC-MS (Merck), àcid fòrmic i metanol de grau LC-MS (Sigma Aldrich), cloroform, bicarbonat de sodi, carbonat de sodi, clorur de dansil, acetat d'amoni, àcid trifluoroacètic, àcid perclòric i hidròxid de sodi qualitat d'anàlisi (Sigma Aldrich) i acetat d'etil (Merck). Les substàncies patrons que es van utilitzar són l'agmatina, N1-acetilespermidina, N8-acetilespermidina, espermina-d20, espermina, espermidina-d6, espermidina, putrescina, putrescina-d8, N1,N12-diacetilespermina i N1,N8-diacetilespermidina (Toronto Research Chemicals), Cadaverina, N-acetilputrescina, N-acetilespermina, lisina, ornitina, arginina, γ -àcid aminobutíric i 1,3-diaminopropà (Sigma Aldrich) i una barreja d'estàndards dels aminoàcids metabòlics (Cambridge Isotopes).

3.2 Instrumentació

El sistema de cromatografia líquida d'alta resolució utilitzat és UHPLC 1290Infinity II Series (Agilent technologies). La columna cromatogràfica utilitzada ha estat la Kinetex EVO C18 (150mm x 2.1mm x 2.6 μ m) de Phenomenex. Els espectròmetres de masses en tàndem utilitzats han estat l'Agilent 6490 Series triple quadrupol LC/MS i l'Agilent 6550 QTOF LC/MS (Agilent technologies). Tots dos equipats amb un ionitzador d'electrosprai (ESI).

3.3 Preparació dels patrons

Abans d'analitzar la mostra s'ha de generar la recta de calibratge per poder quantificar els diferents anàlits d'interès. Depenent de l'interval de concentració en que es poden trobar les poliamines i aminoàcids en l'orina s'han dividit en 6 grups on cada grup comparteix el mateix interval de treball. El grup 1 està format per l'agmatina, CAD i N-AcSP, el grup 2 per la N-AcPUT, el 1,3-DAP i l'SP, el grup 3 per el GABA, la (N1-AcSPD) i la N8-AcSPD, el grup 4 per la PUT i l'SPD, el grup 5 per la N1,N12-DiAcSP i la

N1,N8-DiAcSPD, N1-AcSPD i N8-AcSPD, per últim el grup 6 està constituït per l'arginina, ornitina i lisina.

Els patrons s'han preparat a partir d'una solució mare, de 1000 µg/ml per les poliamines i de 2000 µg/ml per als aminoàcids, diluint-los en aigua. S'han realitzat dilucions separades dels compostos deuterats, que s'han utilitzat com patrons interns, dels compostos sense deutar, que s'han utilitzat per a l'elaboració de les rectes de calibratge. La dissolució del patró intern (ISTD) ha estat una barreja d'arginina i lisina a 625 µM i de SP-d20, SPD-d6 i Put-d8 a 0.5 ppm, diluïdes en aigua. En quant els diferents estàndards interns de les poliamines i els aminoàcids s'han de mantenir tancats al congelador a -20°C.

Les dissolucions dels patrons de calibratge han estat preparades a 7 nivells de concentració diferent per cada un dels grups esmentats anteriorment. A la Taula 1 es poden veure les concentracions de cada grup per cada nivell de concentració.

Taula 1. Concentració de cada patró per cada grup d'anàlits.

Patró	1	2	3	4	5	6	7
Concentració grup 1 (ng/ml)	0	20	40	100	200	400	1000
Concentració grup 2 (ng/ml)	0	60	120	300	600	1200	300
Concentració grup 3 (ng/ml)	0	600	1200	3000	6000	12000	30000
Concentració grup 4 (ng/ml)	0	200	400	1000	2000	4000	10000
Concentració grup 5 (ng/ml)	0	4	8	20	40	80	200
Concentració grup 6 (ng/ml)	0	32000	64000	160000	320000	640000	--

3.4 Mostres d'orina

Les mostres d'orina obtingudes de diferents pacients amb càncer, s'han utilitzat per dur a terme l'optimització i la determinació dels paràmetres instrumentals del mètode obtingudes de diferents pacients. Aquestes mostres s'han de conservar a una temperatura de -80°C fins el seu anàlisi. Durant el seu anàlisi es poden conservar a una temperatura de -4°C .

3.5 Extracció

L'extracció de les poliamines, dels seus precursors i dels seus catabòlits ha estat realitzada per tres procediments diferents que es divideixen en tres en la primera part s'ha produït l'extracció de les poliamines i dels seus precursors i catabòlits de la mostra d'orina (precipitació de proteïnes i altres interferents), en la segona part s'ha procedit a fer la derivatització i en la tercera part una purificació/extracció de les poliamines derivatitzades. A continuació es detallen les condicions experimentals per dur a terme cada procés.

- Extracció amb metanol i cloroform/derivatització/Líquid-Líquid.

A 50 μl d'orina se li ha afegit 2,5 μl d'ISTD (0.5 ppm poliamina/625 μM aminoàcid). Seguidament s'afegit 83 μl de metanol i 166 μl de cloroform. Amb l'ajuda d'un vòrtex s'agita durant 10 s, i se centrifuga a 15000 rpm durant 5 min. Es recolleix la fase aquosa (capa superior) en un eppendorf de 1.5 ml amb una micropipeta de 20-200 μl . Posteriorment, s'afegit 50 μl de *buffer* carbonat de sodi/hidrogenocarbonat de sodi (0.2 M, pH 9), per ajustar la mostra a pH 9. Finalment s'addiciona 25 μl de clorur de dansil en acetona (10 mg/ml) i es deixa reposar durant 1h a la foscor.

A continuació, s'afegit 125 μl d'acetat d'etil i se centrifuga a 15000 rpm durant 5 min. S'ha recollit la fase orgànica (capa superior) en un eppendorf i s'afegit 2.5 μl de TFA i 125 μl d'acetat d'etil a la fase aquosa, per poder recuperar els aminoàcids. Es torna a centrifugar a 15000 rpm durant 5 min i es barregen les dues fases orgàniques, i seguidament s'evaporen al buit en el Speedvac. El residu obtingut es reconstitueix amb

50 µl d'acetat d'amoni 0.2 M/acetoneitril (30:70, v/v). Finalment s'injecta 1 µl d'aquesta solució en el sistema cromatogràfic.

- Extracció amb àcid perclòric/derivatització/Líquid-Líquid.

A 50 µl d'orina s'afegeix 2,5 µl d'ISTD (0.5 ppm poliamina/625 µM aminoàcid). A continuació, s'addiciona 25 µl d'àcid perclòric al 10%. S'agita amb un vòrtex durant 10 s, i es centrifuga a 15000 rpm durant 5 min. Es recollit la fase orgànica (capa superior) en un eppendorf de 1.5 ml amb una micropipeta de 20-200 µl. Posteriorment s'afegeixen 17 µl d'hidròxid de sodi 10M i 50 µl de *buffer* carbonat de sodi/hidrogencarbonat de sodi (0.2 M, pH 9), per ajustar la mostra a pH 9. S'addiciona 25 µl de clorur de dansil en acetona (10 mg/ml) i es deixa reposar durant 1h a la foscor. Per dur a terme la segona part del procés s'ha procedit de la mateixa forma que en el cas anterior.

- Extracció amb metanol i cloroform/derivatització/SPE.

La primera i segona part del procés que corresponent a la precipitació de les proteïnes incloent altres interferents, i a la derivatització es realitza amb una extracció líquid-líquid amb metanol i cloroform com s'ha explicat en el primer cas. Per la segona extracció s'ha procedit a fer la SPE.

A la mostra derivatitzada se li afegeix 1 ml de *buffer* carbonat de sodi/hidrogencarbonat de sodi (0.2 M, pH 12). Els cartutxos (OASIS HLB 1cc, 30mg) es condicionen amb 1 ml d'acetoneitril i 1 ml de *buffer* carbonat de sodi/hidrogencarbonat de sodi a pH 12. A continuació, es procedeix a la càrrega de la mostra, preparada com s'indica anteriorment. Es realitza un rentat amb 1 ml *buffer* carbonat de sodi/hidrogencarbonat de sodi a pH 12. Els cartutxos s'han deixat assecar durant 20 min al buit, abans de realitzar l'elució amb 500 µl d'acetoneitril. Un cop passat aquest temps, es realitzen dos rentats.

Per últim s'evapora la solució recollida a l'SpeedVac i el residu obtingut es reconstitueix amb 50 µl d'acetat d'amoni 0.2 M/acetoneitril (30:70, v/v), i 1 µl de l'alíquota ha sigut injectada al sistema cromatogràfic.

seguidament s'evaporen al buit en el Speedvac. El residu obtingut es reconstitueix amb 50 µl d'acetat d'amoni 0.2 M/acetoneitril (30:70, v/v). Finalment s'injecta 1 µl d'aquesta solució en el sistema cromatogràfic.

3.6 Anàlisi per UHPLC-MS/MS

La separació cromatogràfica s'aconsegueix utilitzant un gradient d'elució usant com a fase mòbil 0.1% d'àcid fòrmic en aigua (A) i 0.1% d'àcid fòrmic en acetoneitril (B) amb una velocitat de flux de 0.4 ml/min i un volum d'injecció d'1µl. La separació es fa mantenint la columna és a temperatura ambient. El programa de gradient utilitzat es detalla la Taula 2.

Taula 2. Gradient utilitzat en la separació cromatogràfica.

Temps (min)	%A	%B
0	100	0
1,5	100	0
7,5	60	40
9	60	40
15	30	70
17,25	0	100
19	0	100
20	100	0
21,5	100	0

El QqQ MS ha operat en mode positiu amb una font d'ionització d'electrosprai (ESI+) i el mode de treball escollit ha sigut el monitoratge de múltiples reaccions (MRM). Els paràmetres òptims de la font d'ionització i amb els que es treballa amb l'espectrometria de masses es poden veure en la Taula 3.

Taula 3. Paràmetres de la font d'ionització.

Paràmetre	(ESI+)
Temperatura del gas	200 °C
Flux del gas	15 l/min
Temperatura vaina de gas	350 °C
Flux vaina de gas	11 l/min
Pressió del nebulitzador	15 psi
Voltatge del capil·lar	2500 V
Nozzle Voltatge	1000 V

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Optimització de les condicions UHPLC-MS/MS

4.1.1 Optimització de l'espectrometria de masses

L'optimització de l'espectrometria MS/MS consta de la determinació dels ions precursors i dels seus fragments, de quantificació i de confirmació, tant dels anàlits com dels patrons interns mitjançant infusions directes de 5 µl de cada estàndard a 10 µg/ml a l'espectròmetre de masses. Per cadascun de les poliamines dansilades es procedeix a l'obtenció dels seus espectres en *full scan* (entre m/z de 50 a 1300). Una vegada obtingut l'ió precursor es seleccionen les transicions quantitatives i qualitatives a partir dels espectres obtinguts en mode *product ion* a diferents energies de col·lisió.

Els paràmetres òptims obtinguts de l'espectrometria de masses per infusió directes per als diferents anàlits d'interès com l'ió precursor, l'ió producte, l'energia de col·lisió (EC) i el patró intern seleccionat en cada cas es poden observar a la Taula 4.

Taula 4. Es mostra per a cada anàlit les transicions MRM optimitzades.

Anàlit	Transició quantitativa	EC (V)	Transició qualitativa	EC (V)	Patró intern
Arginina-Dns	408.1 → 70.1	40	408.1 → 170.3	32	Arginina- <i>lab</i>
Agmatina-Dns	364.1 → 347.2	32	364.1 → 170.1	28	Arginina- <i>lab</i>
			364.1 → 155.2	52	
			364.1 → 128.1	56	
N1,N8- DiAcSPD-Dns	463 → 100.1	28	463 → 114.1	28	Putrescina- <i>d8</i>
			463 → 170.2	40	
N-AcPUT-Dns	364.1 → 322	15	364.1 → 170.1	28	Putrescina- <i>d8</i>
			364.1 → 234	15	
			364.1 → 114	15	
GABA-Dns	337.1 → 170	20	337.1 → 296	8	Arginina- <i>lab</i>
			337.1 → 157	36	
N1,N12- DiAcSP-2xDns	753.1 → 100.1	32	753.1 → 502.3	40	Putrescina- <i>d8</i>
			753.1 → 170	60	
Ornitina-2xDns	599.1 → 170.1	48	599.1 → 303.1	24	Lysina- <i>lab</i>
Lisina-2xDns	613.1 → 170.1	52	613.1 → 317.1	24	Lysina- <i>lab</i>
N1-AcSPD- 2xDns	654.1 → 100.1	20	654.1 → 305.1	20	Putrescina- <i>d8</i>
N8-AcSPD- 2xDns	654.1 → 114.1	20	654.1 → 541.1	20	Putrescina- <i>d8</i>
1,3-DAP-2xDns	541.1 → 307	24	541.1 → 170.2	36	Espermidina- <i>d6</i>
			541.1 → 220		
PUT-2xDns	555.2 → 219.9	28	555.2 → 170.1	44	Putrescina- <i>d8</i>
PUT- <i>d8</i> -2xDns	563.2 → 219.9	28	563.2 → 170.1	44	---
CAD--2xDns	569.1 → 84.2	36	569.1 → 170.2	44	Putrescina- <i>d8</i>
			569.1 → 186	36	
N-AcSP-3xDns	944.1 → 100	44	944.1 → 693.3	52	Putrescina- <i>d8</i>
			944.1 → 360.2	56	
SPD-3xDns	845.4 → 360.1	40	845.4 → 170.1	60	Espermidina- <i>d6</i>
SPD- <i>d6</i> -3xDns	851.1 → 366.2	40	851.1 → 170.2	60	---
SP-4xDns	1135.6 → 360.1	56	1135.6	60	Espermina- <i>d20</i>
			→ 170.1		
SP- <i>d20</i> -4xDns	1155.6 → 373.1	56	1155.6 → 170.1	60	---

4.1.2 Optimització del mètode cromatogràfic

- Gradient d'elució

Es parteix de les condicions cromatogràfiques recomanades en la bibliografia ³⁰, on la fase mòbil que s'utilitza és 0.1% d'àcid fòrmic en aigua (A) i 0.1% d'àcid fòrmic en acetonitril (B). El gradient usat és de 0 a 2 min, 40% B, seguit per un increment lineal de B, aconseguint als 8 min el 100% B, des dels 8 fins els 10 min es manté el 100% B.

Als 11 min s'obté el 40% B, dels 11 fins els 20 min es manté el 40% B. En aquest estudi només van determinar la PUT, SPD i SP.

En el nostre cas, no s'aconsegueix una separació completa dels compostos a estudiar. Concretament, el principal problema era que tant l'arginina com l'agmatina que presentaven molt poca retenció que podia portar problemes sobre tot a la hora de que presentin efectes matrius elevats. Per aquest motiu es decideix variar el gradient incrementant el % d'acetonitril (B) més lentament.

Després de realitzar un seguit de modificacions a partir del gradient anterior, finalment s'obté un cromatograma amb una separació més satisfactòria, tot i que hi ha alguns anàlits que es superposen (per exemple, N1-AcSPD i N8-AcSPD), aquest fet no és important en LC-MS/MS a diferència del que ocorre amb altres tècniques cromatogràfiques, donat que en tots els casos tenim transicions selectives. Inclosos aquets dos isòmers que encara que presentin el mateix ió precursor les transicions $654.1 \rightarrow 100.1$ i $654 \rightarrow 114.1$ són selectives per el N1-AcSPD i el N8-AcSPD, respectivament.

Com el que es pot observar en la Figura 3 la separació cromatogràfica de tots els derivats de les poliamines i dels seus precursors en mostres d'orina s'ha aconseguit en menys de 18 min.

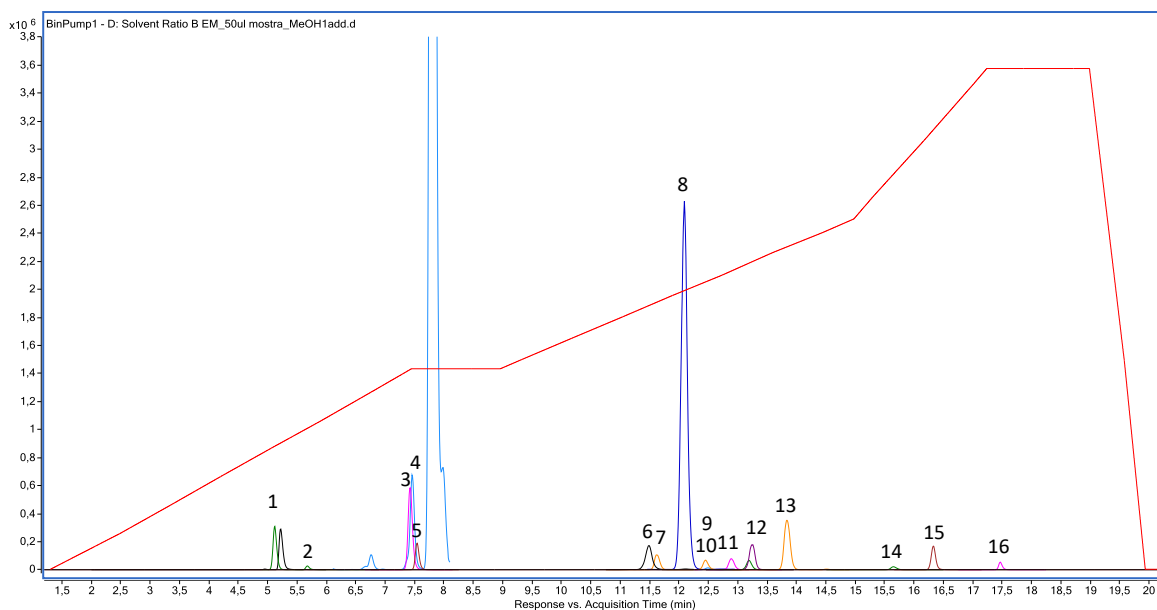


Figura 3. Imatge sobreposada dels cromatogrames en mode MRM de les diferents poliamines, dels seus precursors d'una mostra d'orina addicionada amb el patró 4 de la recta de calibratge. La línia vermella correspon al gradient d'elució del solvent B. Les poliamines analitzades són (1) Arginina, (2) Agmatina, (3) N-AcPUT, (4) GABA, (5) N1,N8-DiAcSPD, (6) Ornitina, (7) N1,N12-DiAcSP, (8) Lisina, (9) N1-AcSPD, (10) N8-AcSPD, (11) 1,3-DAP, (12) Putrescina, (13) Cadaverina, (14) N-AcSP, (15) Espermidina, (16) Espermina.

- Flux de la fase mòbil

Per poder optimitzar el flux de la fase mòbil es calcula l'eficàcia de la columna per diferents fluxos. L'eficàcia de la columna per separar compostos depèn del nombre de plats teòrics (N) que és inversament proporcional a l'alçada de plats teòrics (H).

Per determinar el flux òptim s'analitza una mostra patró que conté els anàlits d'interès a diferents fluxos en l'interval de 0.1 a 1 ml/min. Un cop obtingut el cromatograma s'escull un dels compostos de la barreja patró, en aquest cas s'ha escollit l'ornitina donat que elueix en un punt intermig del cromatograma, i es representa l'alçada dels plats respecte la velocitat del flux obtenint la Figura 4.

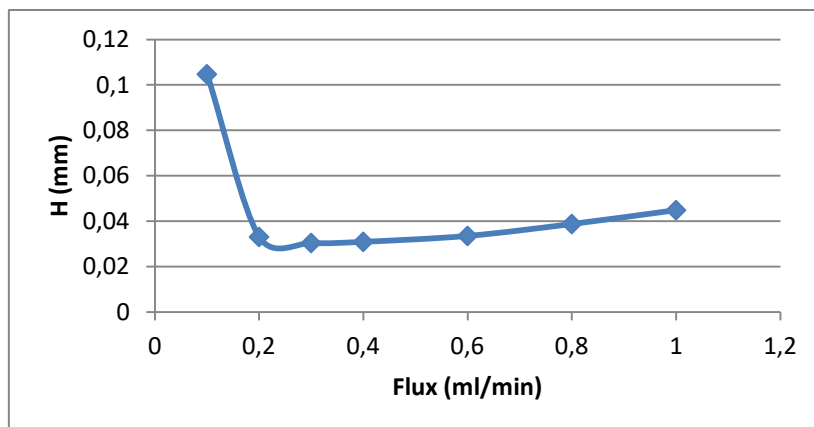


Figura 4. Relació de l'alçada de plat respecte el flux de la fase mòbil per l'ornitina (compost model).

Com major sigui el nombre de plats, més estrets seran els pics cromatogràfics, per tant, major serà l'eficàcia. Això significa que les condicions òptimes s'obtenen al mínim de la corba perquè no es perd eficàcia i es guanya en velocitat donat que com major és el flux més ràpid s'elueix els anàlits. Per aquest motiu el flux òptim en el nostre cas és de 0.4 ml/min.

- Volum d'injecció de la mostra

El volum d'injecció s'optimitza amb injeccions consecutives d'una mateixa mostra. Per escollir el volum d'injecció òptim s'injecta una mostra a tres volums diferents d' 1, 2,5 i 5 μ l. La majoria de les poliamines van tenir el mateix comportament, al augmentar el volum d'injecció no augmenta proporcionalment l'àrea sinó que augmenta bastant menys, com es pot veure a la Figura 5 per l'espermidina. Això vol dir que com menor és el volum d'injecció menor és l'efecte matriu, encara amb 1 μ l de injecció seguirem tenim efecte matriu com es mostra en la secció 4.1.3. A més es pot veure que amb el volum més petit injectat, l'àrea de la mostra segueix sent suficient per ser quantificada. En cap dels volums es va deixar de veure cap de les poliamines o aminoàcids. Per aquest motiu s'extreu com a conclusió que el volum òptim d'injecció de les mostres és d'1 μ l.

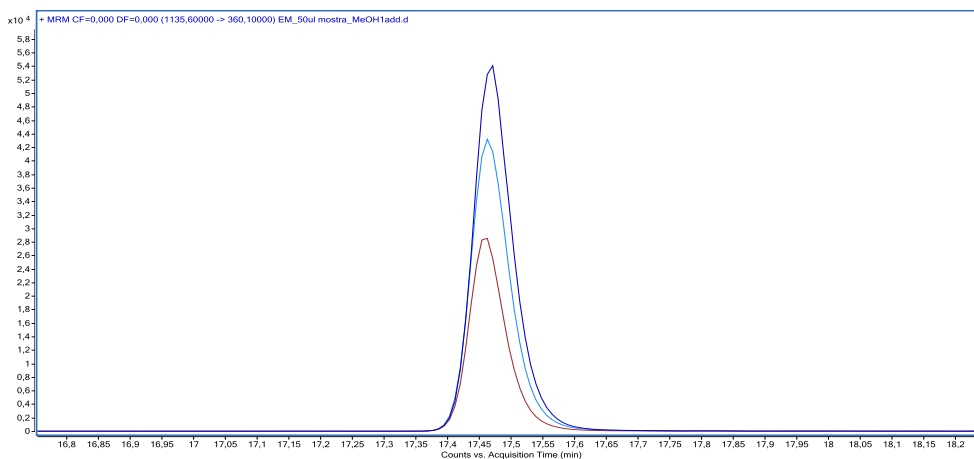


Figura 5. Cromatograma de l'espermidina en mode MRM a diferents volums d'injecció 1, 2.5 i 5 µl.

4.1.3 Identificació

A continuació, en la Figura 6 es mostra un cromatograma en mode MRM per a cadascuna de les poliamines, els seus precursors i catabòlics dels quals teníem estàndard comercial, on es pot observar el temps de retenció i la transició de cada compost.

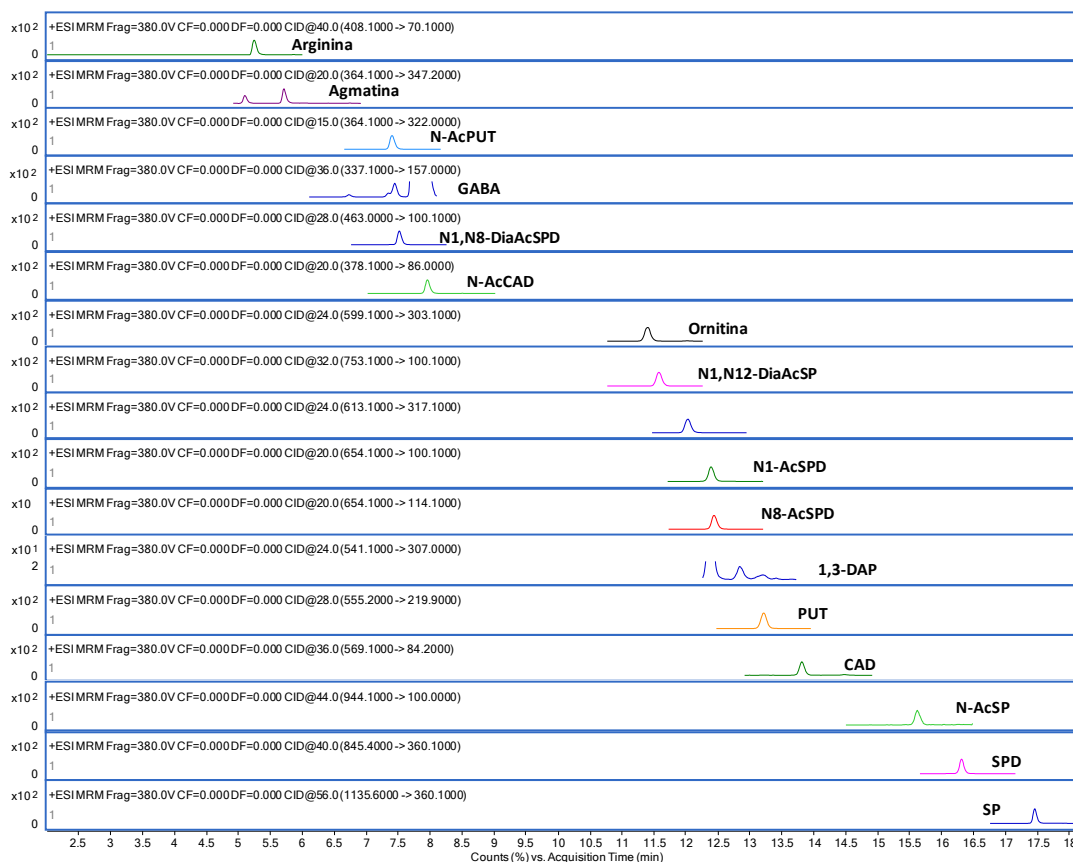


Figura 6. Cromatogrames en mode MRM de la transició de quantificació de cadascun dels compostos detectats.

Paral·lelament s'intenta identificar temptativament l'acetilcadaverina ³¹ i l'acetilputreanina ³², ja que han estat prèviament descrits en orina en la bibliografia. En el cromatograma s'ha realitzat un *screening* del seu ió precursor en mode *product ion*, assignant dos pics que poden correspondre a l'acetilcadaverina i a l'acetilputreanina. La confirmació d'aquestes dos poliamines es dur a terme per massa exacta mitjançant el QTOF.

El primer pas és calcular la massa exacta i la distribució isotòpica amb el *software Isotope Distribution Calculator*. En la Taula 5 es pot observar la massa exacta per les dos poliamines calculada mitjançant el programa esmentat.

Taula 5. Massa exacta de l'acetilcadaverina i l'acetilisoputreanina.

Compostos dansilats	Formula molecular	Massa exacta (m/z)
Acetilcadaverina-Dns	C ₁₉ H ₂₈ N ₃ O ₃ S	378.1843
Acetilisoputreanina-Dns	C ₂₁ H ₃₀ N ₃ O ₅ S	436.1901

Seguidament, s'injecta l'orina derivatitzada al LC-QTOF i en el cromatograma obtingut es filtra la massa exacta calculada amb un error de 20 ppm. El següent pas és determinar si l'espectre obtingut conté els fragments característics dels anàlits d'interès en aquest cas de l'acetilcadaverina i de l'acetilisoputreanina dansilades. En les Figures 6 i 7 es poden observar els espectres de l'acetilcadaverina i de l'acetilisoputreanina, respectivament.

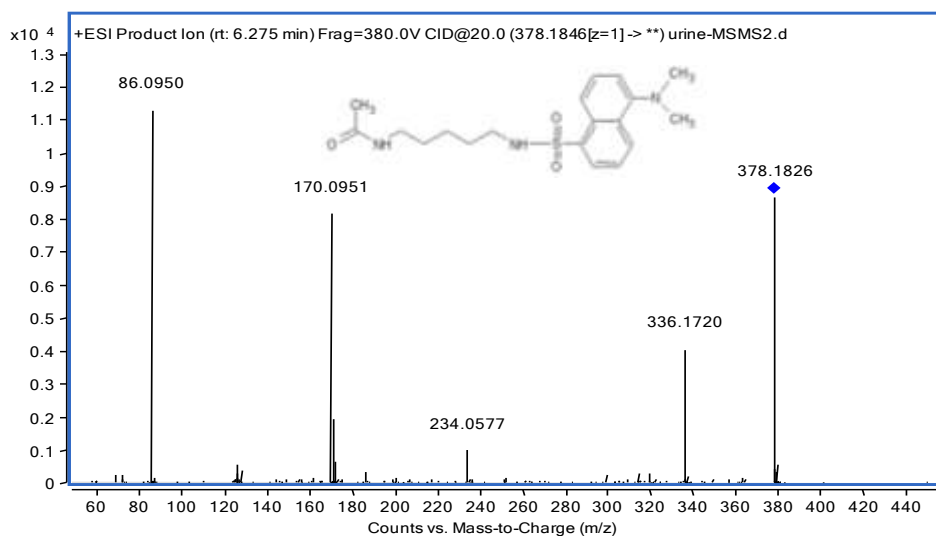


Figura 6. Espectre i estructura molecular de l'acetilcadaverina.

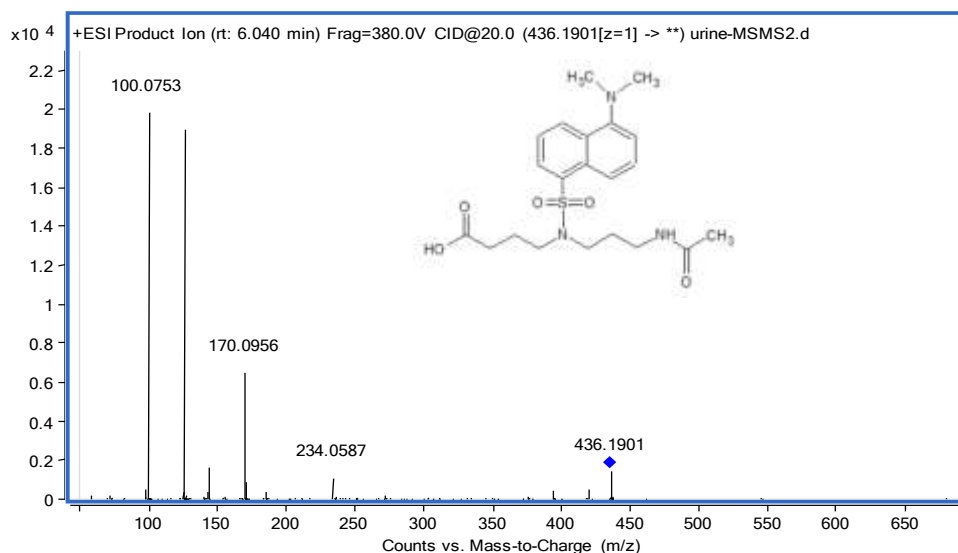


Figura 7. Espectre i estructura molecular de l'acetilisoputreanina.

Segons la bibliografia els fragments característics de l'acetilcadaverina dansilada són el 378.2, 336.2 m/z i de la molècula sense el dansil és el 86 m/z ³¹. En quant els fragments més característics de l'acetilisoputreanina són el 185.1, 126.1, 100.1, 72.0 i 58.1 m/z, que s'originen de la molècula intacta. El fragment més abundant sol ser 100.076 m/z, ja que es produeix d'un enllaç altament làbil com és l'enllaç C-N ³². En els dos casos en l'espectre també apareixen els fragments 170.1 i 234.1 m/z, ja que són característics del dansil. Si comparem els fragments obtinguts en l'espectre obtingut amb el QqQ i amb la bibliografia es comprova que són els característics de cada un dels compostos analitzats. Per tant, s'ha pogut confirmar que els dos pics cromatogràfics obtinguts anteriorment corresponen a l'acetilcadaverina i a l'acetilisoputreanina. Paral·lelament, observem com en el cas de l'acetilcadaverina el comportament cromatogràfic respecte la cadaverina ens ajuda a l'assignació del compost, ja que es comporta igual que l'acetilputrescina respecte la putrescina en pèrdua de retenció.

Els criteris que ens han permès confirmar l'assignació han sigut la massa exacta, la comparació de la fragmentació en el QqQ, el comportament cromatogràfic i sobretot la comparació amb la bibliografia.

4.1.4 Optimització de l'extracció

- Recuperació en l'LLE i en l'SPE

Es va avaluar la recuperació de les diferents poliamines en l'etapa d'extracció posterior a l'etapa de derivatització. Es van avaluar tres opcions:

- LLE amb acetat d'etil a pH=9 (condicions de derivatització).
- LLE amb acetat d'etil a pH àcid (1% TFA).
- SPE es carreguen els compostos a pH=12. Descrit per Molins-Legua C. Et al ³³.

A la Taula 6 es mostren les recuperacions per cadascuna de les poliamines i aminoàcids. Com es pot observar en el cas de la SPE presenta pitjors recuperacions que en la líquid-líquid per a molts compostos, especialment en el cas dels més polars tals com l'arginina i l'agmatina.

En el cas de la líquid-líquid en condicions bàsiques la recuperació és molt bona per tots els compostos, excepte per el GABA i l'Arginina. Donat que la recuperació d'aquests a 1% de TFA millorava molt però empitjorava la recuperació d'altres poliamines, es va decidir dur a terme una primera extracció líquid-líquid a pH=9, i una posterior re-extracció de la fase aquosa acidificada amb un 1% de TFA.

Malgrat aquets fet es va realitzar l'estudi de l'efecte matriu per avaluar el seu comportament.

Taula 6. Recuperació dels aminoàcids i poliamines per els tres mètodes d'extracció.

Anàlit	LLE	LLE (1%TFA)	SPE (pH=12)
GABA	1	122	78
Agmatine	108	97	27
Arginine	5	73	4
Ornithine	116	93	40
Lysine	99	81	78
NAcPUT	96	87	47
PUT	106	83	90
NAcSPD	95	75	73
SPD	100	100	103
NAcSP	87	62	67
SPD	105	59	67
CAD	106	81	87
DAP	95	67	65

- Efecte matriu

Es va avaluar quin dels tres tipus d'extraccions té menor efecte matriu:

- Extracció metanol i cloroform/derivatització/Líquid-Líquid.
- Extracció àcid perclòric/derivatització/Líquid-Líquid.
- Extracció metanol i cloroform/derivatització/SPE.

Per avaluar l'efecte matriu es compararen els senyals obtinguts després de l'addició de patrons a mostres blanc, prèviament extretes segons els mètodes explicats anteriorment, amb els senyals dels patrons preparats amb una concentració equivalent. L'estudi es realitza mitjançant l'UHPLC-MS/MS a una concentració corresponent al patró 1 de la recta de calibratge, s'utilitzen tres rèpliques dels patrons i tres rèpliques d'un pool de 5 mostres d'orina procedents de diferents individus, un cop s'ha realitzat l'extracció d'aquestes mostres se li va addicionar la corresponent quantitat de patró. El percentatge de l'efecte matriu de cada anàlit es calcula mitjançant la següent equació:

$$\% \text{ Efecte matriu} = \frac{\text{Àrea de mostra adicionada} - \text{Àrea mostra sense addicionar}}{\text{Àrea del patró intern}} * 100$$

S'ha representat el % d'efecte matriu dels diferents mètodes d'extracció per cada poliamina, com es pot observar en la Figura 8.

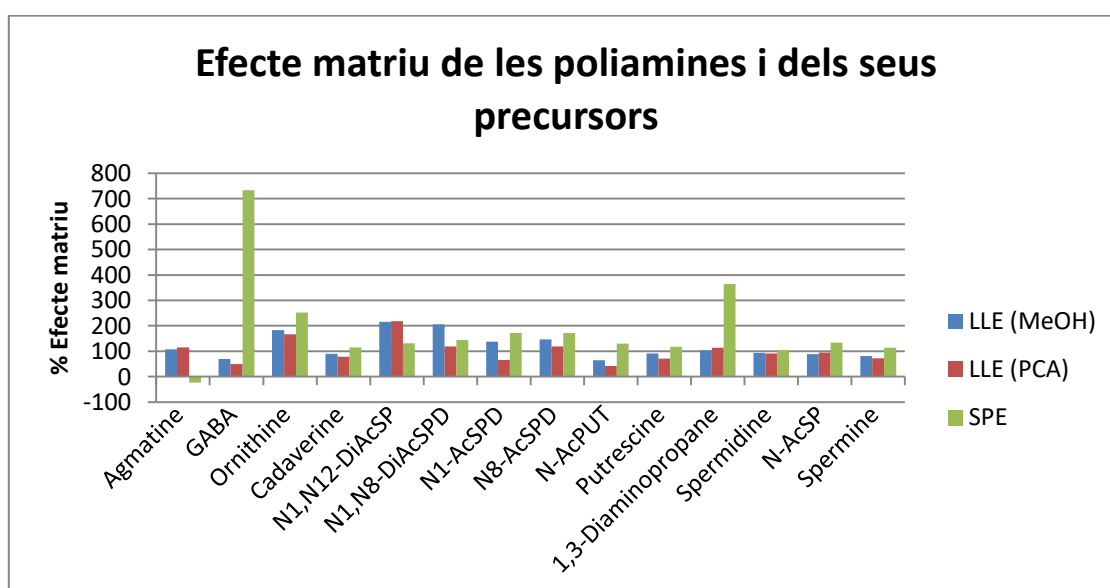


Figura 8. Efecte matriu de les diferents poliamines per als tres mètodes d'extracció.

Com s'observa en la Figura 8 en tots els casos, excepte l'agmatina, el % d'efecte matriu és positiu, per tant, es produeix un augment de la ionització. En canvi, en el cas de l'agmatina es produeix la supressió de la ionització. Observem que pels compostos més polars com són els acetilats o diacetilats l'efecte matriu s'incrementa per als tres casos estudiats, respecte als altres anàlits, superant en la majoria de casos el 100% d'efecte matriu. El comportament en termes d'efecte matriu és semblant entre les mostres extretes amb PCA i les de MeOH-Cloroform. Per una altra banda, en el cas de la SPE no s'observa un comportament molt millor respecte les anteriors, donades les menors recuperacions els descrits en l'apartat anterior el descartaríem per dur a terme l'anàlisi.

Els resultats obtinguts de les poliamines lliures de les dues extraccions LLE coincideixen amb els reportats a la bibliografia ²⁶, ja que l'efecte matriu en l'estudi es troba entre el 86.4 i 98.3 %. En l'estudi reportat només s'han determinat les poliamines lliure sense acetilar. En quant els resultats obtinguts de la SPE també coincideixen amb la bibliografia ²⁴, a excepció de l'1,3-Diaminopropà amb el que s'ha obtingut més efecte matriu de l'esperat. Aquest fet és perquè al nostre cas no es comptava amb el patró intern d'aquest anàlit, a diferència de l'estudi reportat.

Observant els resultats obtinguts pels compostos acetilats i diacetilats seria interessant l'adquisició d'un estàndard intern acetilat, ja que sembla que mostren un comportament diferent respecte els seus anàlegs no acetilats pels quals si comptem amb estàndard intern que ens corregiria l'efecte matriu. En el cas de l'arginina i la lisina no s'ha pogut avaluar l'efecte matriu, ja que no es pot fortificar les mostres a una concentració suficientment alta, en tot cas en ambdós casos comptem amb patró intern, per tant els mateixos corregiran l'efecte matriu.

4.2. Paràmetres de qualitat

4.2.1 Recta de calibratge

Com es veu en l'apartat anterior el mètode de determinar les poliamines i els seus precursors en mostres d'orina presenta efecte matriu. A falta d'adquirir estàndard interns que pugui corregir l'efecte matriu per les poliamines acetilades i diacetilades, degut a que presenten un comportament diferent als seus anàlegs no acetilats. La millor alternativa per solucionar-lo és utilitzar la tècnica de les addicions estàndards, que consisteix a afegir concentracions creixents conegudes de l'anàlit a la mostra problema.

L'interval de treball per a cada poliamina es pot observar en la Taula 1 de l'apartat de materials i mètodes. Pels compostos que no són poliamines acetilades s'ha verificat la linealitat del mètode escollit utilitzant la recta de calibratge extern, corregida pels patrons interns on la resposta que s'obté és el quocient de l'àrea de l'anàlit entre l'àrea del patró intern. En el cas de les poliamines acetilades es mostra la recta d'addicions estàndard obtinguda per un *pool* de mostres, aquesta recta també es corregeix pels patrons interns.

En la Taula 7 es pot observar la recta de calibratge i el coeficient de determinació per les diferents poliamines i els seus precursors.

Taula 7. Recta de calibratge i coeficient de determinació per el mètode de determinació de les principals aminoàcids i poliamines en l'orina.

Compost	Interval de treball (ng/ml)	Recta de calibratge (n=3)	R ²
Agmatina	20-1000	y= 0,00021x + 0.00385	0.99863
Arginina	32000-640000	y= 0,00001x + 0.11324	0.99597
GABA	600-30000	y= 0,00102x + 0.46425	0,99740
Lisina	32000-640000	y= 0,00006x - 0.05243	0,99974
Ornitina	32000-640000	y= 0,00005x + 0,39584	0,99685
Cadaverina	20-1000	Y= 0,02971x - 0,70181	0,99533
N1,N12-DiAcSP	4-200	y= 0.04306x + 2.01234	0.99514
N1,N8-DiAcSPD	4-200	y= 0,20449x +11,24792	0,99628
N1-AcSPD	600-300000	y= 0,01615x + 22,78271	0,99653
N8-AcSPD	600-30000	y= 0,00186x + 3,03039	0,99729
N-AcPUT	60-3000	Y= 0,00357x + 54,02887	0,99315
Putrescine	200-10000	y= 0,02104x + 0,53928	0,99781
1,3-DAP	60-3000	y= 0,01106x - 0,25476	0,99966
Espermidina	200-10000	y= 0,02189x - 1,01334	0,99994
N-AcSP	20-1000	y=0,02619x - 0,27151	0,99809
Espermina	60-3000	y= 0,03048x - 0,44661	0,99992

En tots els casos les corbes de calibratge han mostrat una bona linealitat ($R^2 > 0,993$) en l'interval de concentracions estudiades, respecte a la bibliografia la recta utilitzada és la recta de calibratge extern, ja que tots els anàlisis a determinar tenen el seu propi patró intern que corregeix en gran mesura l'efecte matriu de cada compost. Com en el nostre cas els coeficients de determinació obtinguts de la bibliografia, per aquets tipus d'anàlisis, són majors a 0.992^{23,34}.

4.2.2 Límits de detecció i de quantificació

Hi ha una multitud de diferents aproximacions que es poden utilitzar per estimar el límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LOQ). Les aproximacions utilitzades per determinar el límit de detecció es veuen reflectides a següent equació³⁵:

$$LOD = 3 * S(x)$$

On la S(x) és la desviació estàndard de les concentracions dels blancs. S'analitzen tres blancs als quals se'ls fa tot el procés per determinar les poliamines incloent l'extracció.

En la Taula 8 es mostren els LOD de les diferents poliamines i aminoàcids. El LOQ és el punt més baix de l'interval de treball.

Taula 8. Determinació del límit de detecció i de quantificació de les diferents poliamines.

Compost	LOD (ng/ml)
Arginina	1,13
Agmatina	0,09
N1,N8-DiAcSPD	0,16
N-AcPUT	0,45
GABA	0,56
Ornitina	6,86
N1,N12-DiAcSP	0,13
Lisine	3,84
N1-AcSPD	0,95
N8-AcSPD	1,37
1,3-DAP	1,32
PUT	0,10
CAD	0,11
N-AcSP	0,04
SPD	0,32
SP	0,59

Si es comparen els LOD obtinguts amb els reportats a la bibliografia ^{36,37} es pot observar que són molt semblants. Els LOD reportats de les poliamines van des dels 0.02 ng/ml fins als 2 ng/ml depenen de l'anàlit. Com es pot veure en la taula els LOD obtinguts estan inclosos en aquest interval a excepció dels aminoàcids, ja que no han sigut reportats a la bibliografia consultada .

4.2.3 Precisió

Per avaluar la precisió del mètode s'ha estudiat la repetibilitat (precisió intra-dia) i la precisió intermèdia (precisió inter-dia). S'ha fet un pool de 5 mostres d'orina, aquest pool es va processar d'acord el mètode d'extracció previ seleccionat. L'anàlisi s'ha fet per triplicat durant tres dies, utilitzant el mateix pool per tot l'estudi. Les rèpliques diàries es van realitzar per avaluar la variabilitat intra-dia i l'anàlisi s'ha repetit durant tres dies per avaluar la repetibilitat inter-dia. En la Taula 9 es mostren els valors de la precisió en termes de coeficient de variació (CV) obtinguts en l'avaluació de la precisió.

Taula 9. Avaluació de la repetibilitat i precisió intermèdia de les diferents poliamines en mostres d'orina.

Compost	Precisió inter-dies (n=3)						Precisió intra-dies (n=3)	
	Dia 1		Dia 2		Dia 3		\bar{x}	CV(%)
	\bar{x}	CV(%)	\bar{x}	CV(%)	\bar{x}	CV(%)		
Agmatina	0,01	1,35	0,01	1,49	0,01	13,65	0,01	8,82
Arginina	0,18	3,03	0,16	4,51	0,16	6,73	0,17	6,51
GABA	0,63	3,50	0,51	6,12	0,40	5,32	0,51	19,19
Lisina	3,53	1,67	3,24	5,59	3,37	6,52	3,38	6,06
Ornitina	0,26	6,65	0,33	5,33	0,23	2,52	0,27	16,27
CAD	2,75	4,84	2,40	2,34	2,58	14,78	2,58	10,66
N1,N12-DiAcSP	32,07	1,27	23,21	11,23	27,97	2,29	27,75	14,22
N1,N8-DiAcSPD	191,75	1,602	165,03	3,98	188,15	2,92	181,64	7,13
N1-AcSPD	21,92	4,96	13,89	11,48	19,59	16,25	18,46	21,66
N8-AcSPD	2,28	5,14	1,46	13,57	2,14	12,88	1,96	21,06
N-AcPUT	38,61	5,91	37,39	9,57	38,38	10,81	38,12	9,09
PUT	24,35	0,78	23,02	4,94	23,01	8,91	23,46	6,38
1,3-DAP	0,09	6,6	0,07	12,89	0,10	17,32	0,09	16,72
SPD	0,52	4,37	0,52	7,39	0,51	1,47	0,51	5,24
N-AcSP	0,05	11,42	0,05	12,55	0,06	18,24	0,05	16,19
SP	7,60	3,47	8,01	5,26	7,87	6,36	7,83	5,66

El criteri d'acceptació de la precisió segons la directiva SANTE / SANCO i la UE 2002/657 / CE estableixen que el CV hauria de ser inferior al 20%. Com es pot observar en la Taula 9 el CV de tots els anàlisis d'interès és inferior al 20% a excepció del les N1- i N8-acetilespermidines en la precisió inter-dia que és lleugerament superior, ja que tenen un CV de 21,66 i 21,06 % respectivament. A excepció d'aquests dos anàlisis per als altres compostos es compleixen els estàndards de qualitat de la precisió. En definitiva vol dir que el mètode és precís per 14 dels 16 anàlisis tant en condicions de repetibilitat com de precisió intermèdia.

Respecte a la bibliografia reportada ^{23,34} el CV tant dels intra-dies com inter-dies és menor del 15% per a tots els anàlisis determinats. En el nostre cas es lleugerament superior en aquells casos on el patró intern no és el propi compost, com és el cas de les poliamines diacetilades i acetilades, així com el GABA.

5. CONCLUSIONS

En aquest treball s'ha desenvolupat un mètode ràpid, sensible i selectiu per determinar les poliamines, els seus precursors i catabòlits, prèviament derivatitzats, en mostres d'orina mitjançant UHPLC-MS/MS. Amb aquest mètode s'obté una bona separació dels anàlits d'interès en un temps menor de 18 min. El flux i el volum d'injecció òptims són respectivament 0.4 ml/min i 1 µl.

També s'ha pogut confirmar la presència de l'acetilcadaverina i de l'acetylisoptreanina en les mostres d'orina per massa exacta mitjançant el Q-TOF MS, ja que la massa exacte coincideix amb els anàlits a estudiar amb un error de 20 ppm i el perfil espectral obtingut correspon al descrit a la bibliografia.

Els resultats més satisfactoris s'obtenen quan s'utilitza com a pretractament de la mostra l'extracció amb metanol i cloroform/derivatització/LLE, ja que al fer una primera extracció a pH bàsic seguit d'una segona extracció a pH àcid s'obté simultàniament un elevat % tant de les poliamines com els aminoàcids. A més de tenir un menor efecte matriu respecte l'SPE.

A part d'optimitzar el mètode UHPLC-MS/MS també s'han determinat els paràmetres de qualitat bàsics. Els límits de detecció i de quantificació ha sigut els esperats, ja que coincideixen aproximadament amb la bibliografia. Els LOD estan entre 0.04 i 6.86 ng/ml, els aminoàcids són els que tenen un major LOD però no és un inconvenient, ja que també són els que es troben amb més concentració, en comparació a les poliamines, en l'orina humana.

Aquest mètode presenta efecte matriu per a les poliamines mono i diacetilades, per aquest motiu, per aquests anàlits s'utilitza la recta de calibratge d'addicions estàndards. En canvi per les altres poliamines l'efecte matriu és molt menor i es pot utilitzar la recta de calibratge extern. Independentment el tipus de recta utilitzada el coeficient de determinació obtingut és major a 0.993.

Pel que fa a l'estudi de la precisió, a excepció de les ACSPD hi ha una bona repetibilitat i precisió intermèdia, ja que la variació obtinguda en un mateix dia i en diferents dies no és significativa.

En la majoria de paràmetres determinats s'ha pogut comprovar que les mono i diacetilpoliamines tenien uns resultats lleugerament superiors als òptims ja que el seu comportament cromatogràfic és diferent respecte als anàlegs no acetilats, per tant, seria interessant adquirir un estàndard intern acetilat per poder intentar resoldre aquests problemes.

6. BIBLIOGRAFIA

(1) Nowotarski, S. L.; Woster, P. M.; Casero, R. A.; Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*.

(2) Park, M. H.; Igarashi, K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **2013**, *21* (1), 1-9.

(3) Gerner, E. W.; Meyskens, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (10), 781-792.

(4) Xu, H.; Liu, R.; He, B.; Bi, C.; Bi, K.; Li, Q. Polyamine Metabolites Profiling for Characterization of Lung and Liver Cancer Using an LC-Tandem MS Method with Multiple Statistical Data Mining Strategies: Discovering Potential Cancer Biomarkers in Human Plasma and Urine. *Molecules* **2016**, *21* (8), 1040.

(5) Park, M. H.; Igarashi, K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **2013**, *21* (1), 1-9.

(6) Gugliucci, A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *344* (1-2), 23-35.

(7) Minois, N.; Carmona-Gutierrez, D.; Madeo, F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany, NY)*. **2011**, *3* (8), 716-732.

(8) [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las Cifras del cancer en Espana 2018.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana_2018.pdf) (Data de consulta 22 de Juny de 2018)

(9) Khuhawar, M. Y.; Qureshi, G. A. Polyamines as cancer markers : applicable separation methods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **2001**, *764*, 385-407.

(10) Ma, Y.; Liu, G.; Du, M.; Stayton, I. Recent developments in the determination of urinary cancer biomarkers by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1473-1484.

- (11) Russell, D. H. Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature New Biology* **1971**, 233(39), 144-145.
- (12) Gerner, E. W.; Meyskens Jr, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer* **2004**, 4(10), 781.,
- (13) Seiler, N.; Atanassov, C. L.; Raul, F. Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention. *International journal of oncology* **1998**, 13(5), 993-1999.
- (14) Moschou, P. N.; Wu, J.; Cona, A.; Tavladoraki, P.; Angelini, R.; Roubelakis-Angelakis, K. A. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63 (14), 5003-5015.
- (15) Guasco, C.; Chávez, J.; Ferriz, R.; De la Torre, K. Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB. Rev. Educ. bioquímica* **2014**, 33 (2), 51-57.
- (16) Milovic, V. Polyamines in the gut lumen : bioavailability and biodistribution. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol* **2001**, 13, 1021-1025.
- (17) Greene, J. M.; Feugang, J. M.; Pfeiffer, K. E.; Stokes, J. V; Bowers, S. D.; Ryan, P. L. L-Arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, 11, 15.
- (18) Reynoso-Orozcol, R.; Márquez-Reynosolll, M.I.;Noa-Limall, E.; Noa-Pérez, M. Particularidades del metabolismo de las poliaminas y su posible aplicación en medicina veterinaria. *Rev. Salud Anim.* **2012**, 34 (3), 144-150.
- (19) Moinard, C.; Cynober, L.; de Bandt, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* **2005**, 24 (2), 184-197.
- (20) Wolvekamp, M. C.; de Bruin, R. W. Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig. Dis.* **1994**, 12 (1), 2-14.
- (21) Pegg, A.; Mccann, P. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.Cell Physiol* **2017**, 243 (12), 212-221
- (22) Canosa Rodríguez, M. del P. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosan y parabenes. A plicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales, Universidad de Santiago de Compostela, 2009.
- (23) Liu, R.; Li, Q.; Ma, R.; Lin, X.; Xu, H.; Bi, K. (2013). Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method: Application to identify potential markers for human hepatic cancer. *Analytica chimica acta* **2013**, 791, 36-45.
- (24) Häkkinen, M. R.; Roine, A.; Auriola, S.; Tuokko, A.; Veskimäe, E.; Keinänen, T. A.; Vepsäläinen, J. Analysis of free, mono-and diacetylated polyamines from human urine by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* **2013**, 941, 81-89.
- (25) Inoue, H.; Fukunaga, K.; Munemura, S.; Tsuruta, Y. Simultaneous determination of free and N-acetylated polyamines in urine by semimicro high-performance liquid chromatography chloride as a X uorescent labeling reagent. *Anal. Biochem.* **2005**, 339, 191-197.

- (26) Liu, R.; Jia, Y.; Cheng, W.; Ling, J.; Liu, L.; Bi, K.; Li, Q. Talanta Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* **2011**, *83* (3), 751-756.
- (27) Hwa, S.; Won, J.; Chul, B.; Ok, S. Polyamine profiles in the urine of patients with leukemia. *Cancer Lett.* **1998**, *122*, 1-8.
- (28) Magnes, C.; Fauland, A.; Gander, E.; Narath, S.; Ratzer, M.; Eisenberg, T.; Madeo, F.; Pieber, T.; Sinner, F. Polyamines in biological samples : Rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1331*, 44-51.
- (29) Samejima, K.; Hiramatsu, K.; Takahashi, K.; Kawakita, M.; Kobayashi, M. Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2010**, *401* (1), 22-23.
- (30) Ducros, V.; Ruffieux, D.; Belva-besnet, H.; Fraipont, F. De; Berger, F.; Favier, A. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2009**, *390* (1), 46-51.
- (31) Feistner, G. J. Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry of Dansylated Polyamines and Basic Amino Acids. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1546-1552.
- (32) Fitzgerald, B. L.; Mahapatra, S.; Farmer, D. K.; McNeil, M. R.; Casero Jr, R. A.; Belisle, J. T. Elucidating the Structure of N 1-Acetylisoputrescine: A Novel Polyamine Catabolite in Human Urine. *ACS omega* **2017**, *2*(7), 3921-3930.
- (33) Molins-Legua, C.; Campins-Falco, P.; Sevillano-Cabeza, A.; Pedron-Pons, M. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC. *Analyst* **1999**, *124*(4), 477-482.
- (34) Byun, J. A.; Lee, S. H.; Jung, B. H.; Choi, M. H.; Moon, M. H.; Chung, B. C. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr* **2008**, *80*, 73-80.
- (35) Guía, U.; Laboratorio, D.; Métodos, V. De. *La Adecuación al Uso de los Métodos* Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* **2016**, *1a ed*, 24-25. Disponible en www.eurachem.org.
- (36) Liu, R.; Li, Q.; Ma, R.; Lin, X.; Xu, H.; Bi, K. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method : Application to identify potential markers for human hepatic cancer. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *791*, 752-754.
- (37) Molins-Legua, C.; Campíns-Falcó, P.; Sevillano-Cabeza, A.; Pedrón-Pons, M. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC. *Analyst* **1999**, 480-481.