

Victoria Sauras Pastor

**OPTIMITZACIONS DE LES CONDICIONS D'ANÀLISI I
VALIDACIONS DEL MÈTODE DE DETECCIÓ I CONFIRMACIÓ DE
PÈPTIDS PETITS PER LC-MS/MS**

TREBALL DE FI DE MÀSTER

dirigit per

la tutora de l'empresa: Rosa Ventura Alemany

el tutor acadèmic: Joan Josep Carvajal Martí

realitzat a

Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques

Màster en Genètica, Física i Química Forense



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

Barcelona

2018

Índex

Abstract	4
1. Introducció	5
1.1. El laboratori antidopatge de Catalunya	5
1.2. La llista de substàncies prohibides de la WADA.....	5
2. Objectius	8
3. Metodologia	9
3.1. Productes químics i reactius	9
3.2. Mostres d'orina, solucions stock i solucions de treball.....	9
3.3. Preparació de les mostres	10
3.4. Condicions de LC-MS/MS	11
3.5. Validació del mètode.....	14
4. Resultats	15
4.1. Cromatogrames dels analits analitzats al mètode	15
4.2. Optimitzacions de les condicions de l'espectrometria de masses.....	16
4.3. Validacions del mètode	18
5. Discussió	22
5.1. Comparació dels resultats amb els requisits de la WADA.....	22
5.2. Comparació dels resultats amb altres grups	22
6. Conclusions	24
7. Bibliografia	26

Resum

S'ha optimitzat i validat un mètode analític per a la detecció de pèptids petits en orina humana. Els pèptids petits estudiats són de la família de GHRPS, GHS, GnRH, altres analits estudiats són agents diürètics, factors del creixement i moduladors dels factors de creixement i tots ells són consumits per alguns atletes ja que generen un efecte ergogènic al cos.

El mètode de preparació de mostra consisteix en una extracció en fase sòlida amb cartutxos OASIS WCX i la separació i detecció per cromatografia líquida acoblada a un masses en tàndem (LC-ESI-MS/MS), usant una columna C₁₈, (1.7 µm de mida de partícula), amb fase mòbil que conté de solvent A acetonitril amb 0.1% d'àcid fòrmic i de solvent B aigua MilliQ amb 0.1% d'àcid fòrmic. El programa de gradient comença amb 5% de solvent A i va incrementant fins a 35% en 8 minuts, fins a 80% en el minut 10 i baixa fins a 5% en el següent minut mantenint aquestes condicions fins al minut 15. La detecció es va dur a terme amb ionització per electroesprai en mode positiu monitoritzant les dos millors transicions, ió precursor-ió producte, específiques per a cada analit.

El mètode va ser validat en termes recuperació d'extracció, precisió intra-assajos (repetibilitat) i límits de detecció (LOD) amb LODs d'1 fins a 2 ng/ml.

Abstract

An analytical method for the detection of small peptides in human urine has been developed and validated. Peptides included in the method belong to families of GHRPs, GHS, GnRH, diuretic agents, growth factors and growth factor modulators, and they are consumed by some athletes because of their ergogenic effect on the body.

The method consist of a solid phase extraction with OASIS WCX cartridges and a separation by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), with C₁₈ column (1.7 µm particle size), a mobile phase containing acetonitrile with 0.1% formic acid as a solvent A and deionized water with 0.1% formic acid as a solvent B.

The gradient programm starts with 5% solvent A and increases until 35% in 8 minuts, until 80% in the minut 10 and then decreases to 5% in the next minute and mantain this conditions until minut 15. The detection was carried out with electrospray ionization in positive mode monitorizing the two best precursсор ion – product ion specific transitions for each analyte.

The methodology was validated in terms of extraction recovery, intra assay precision (repeatability) and limits of detection (LOD) with LODs from 1 to 2 ng/ml.

1. Introducció

1.1. El laboratori antidopatge de Catalunya

La Fundació IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques) es troba en el PRBB (Parc de Recerca Biomèdica) de Barcelona. En aquesta fundació existeixen diversos departaments d'entre ells el de Neurociències al qual pertany el Laboratori d'Antidopatge de Catalunya. El treball s'ha realitzat en el grup de treball de LC-MS. La principal funció d'aquest laboratori és el control antidopatge en l'esport, per la qual cosa s'analitzen mostres d'orina i de sang d'atletes i animals de competició.

Aquest laboratori està acreditat per la normativa ISO/IEC 17025 [1] i és un dels 32 laboratoris acreditats per la World Anti-Doping Agency (WADA) en el món.

1.2. La llista de substàncies prohibides de la WADA

La WADA publica anualment una llista de substàncies i mètodes prohibits a l'esport. En la taula 1 estan descrites les substàncies i mètodes prohibits de la llista de la WADA [2] 2018.

Taula 1: substàncies i mètodes prohibits de la llista de la WADA 2018

Substàncies prohibides	Substàncies prohibides en competició	Substàncies prohibides en determinats esports	Mètodes prohibits
S1: agents anabolitzants S2: hormones peptídiques, factors de creixement, substàncies afines i mimètics S3: agonistes Beta-2 S4: moduladors hormonal i metabòlics S5: diürètics i agents emascarants	S6: estimulants S7: narcòtics S8: cannabinoides S9: glucocorticoides	P1: Betabloquejants	M1: manipulació de sang i de components sanguinis M2: manipulació química i física M3: dopatge genètic

En la llista estan incloses unes famílies de pèptids petits (menors a 2kDa), produïts a l'hipotàlem, els quals estan prohibits per la WADA degut als efectes ergogènics que generen en el cos humà. En aquest treball s'analitzaran substàncies pertanyents al grup S2 i S5. La majoria d'aquests pèptids són de comercialització prohibida i els esportistes els compren al mercat negre. Aquestes famílies de pèptids són les següents:

1. GHRP (pèptids alliberadors d'hormones del creixement) [3]

Les GHRP són una classe de pèptids sintètics que no es troben en el cos humà. Estan prohibits ja que, un cop administrats, actuen en l'hipotàlem i en la glàndula pituïtària provocant l'alliberament d'hormones del creixement les quals estimulen el creixement, la reproducció cel·lular i la regeneració en humans i altres animals.

2. GHS (secretagogues d'hormones del creixement) [4]

Les GHS són una classe de drogues que actuen com a secretagogues, és a dir, indueixen la secreció d'hormones del creixement. La principal aplicació clínica és pel tractament de la deficiència de l'hormona del creixement. Aquestes drogues són també venudes al mercat negre com si fossin esteroides anabòlics (variacions sintètiques de la hormona masculina testosterona) per tal de modificar i moldejar el cos i per aquest motiu estan prohibides.

3. GnRH (hormones alliberadores de gonadotropines) [5]

Les GnRH són les hormones alliberadores de gonadotropines: hormona luteïnitant, hormona estimulant de fol·liculs i gonadotropina coriònica humana. Estan prohibides degut a que incrementen la producció de testosterona produint un efecte anabòlic en els teixits musculars.

4. Agents emmascarants i diürètics [6]

S'analitza la substància Desmopressin la qual actua limitant la quantitat d'aigua que és eliminada en la orina, és a dir, és un antidiürètic i per aquesta propietat pot actuar com agent emmascarant d'altres substàncies que l'atleta hagi pogut prendre i per aquesta raó està prohibit.

5. Factors del creixement i moduladors dels factors de creixement [7]

S'analitza la substància TB 500 la qual és un pèptid sintètic d'una regió activa de la Timosina Beta-4. Està prohibida degut a que millora la recuperació de lesions, regeneració de músculs, tendons, lligaments i pell després dels esforços i promou la creació de noves cèl·lules sanguínies i musculars amb la finalitat que l'esportista conservi el seu rendiment.

En la taula 2 estan descrits cada un dels pèptids petits que s'analitzen al laboratori antidopatge junt amb la informació sobre a quina família pertanyen, la seqüència de l'aminoàcid, la fórmula molecular [8] i la massa monoisotòpica [9].

Taula 2: Substàncies de naturalesa peptídica analitzades al Laboratori d'Antidopatge

Analit	Seqüència aminoàcid	Fórmula molecular	Massa monoisotòpica (Da)
GHRP			
GHRP-1	H-Ala-His-D-2-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	C ₅₁ H ₆₂ N ₁₂ O ₇	954.5
GHRP-1 2-4 OH	H-His-D-β-Nal-Ala-OH	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₄	424.2
GHRP-1 2-7 OH	His-(D-β-Nal)-Ala-Trp-(D-Phe)- Lys-OH	C ₄₈ H ₅₆ N ₁₀ O ₇	443.2
GHRP-2	(D-Ala)-(D-β-Nal)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH ₂	C ₄₅ H ₅₅ N ₉ O ₆	817.4
GHRP-2 1-3 OH	(D-Ala)-(D-β-Nal)-Ala-NH ₂	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	357.2
GHRP-4	(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-NH ₂	C ₃₄ H ₃₇ N ₇ O ₄	607.3
GHRP-4 D4 (ISTD)	(D-Trp)-D-4-Ala-Trp-(D-Phe)-NH ₂	C ₃₄ H ₃₃ D ₄ N ₇ O ₄	612.7
GHRP-5	Tyr-(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-NH ₂	C ₄₃ H ₄₆ N ₈ O ₆	770.4
GHRP-6	His-(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH ₂	C ₄₆ H ₅₆ N ₁₂ O ₆	872.4
Hexarelin	His-(D-Mrp)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH ₂	C ₄₇ H ₅₈ N ₁₂ O ₆	886.5
Hexarelin 1-3 OH	His-(D-Mrp)-Ala-OH	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₄	427.2
GHS			
Ipamorelin	Aib-His-(D-2-Nal)-(D-Phe)- Lys-NH ₂	C ₃₈ H ₄₉ N ₉ O ₅	711.4
Ipamorelin 1-4 OH	Aib-His-(D-β-Nal)-(D-Phe)-OH	C ₃₂ H ₃₆ N ₆ O ₅	585.3
Anamorelin	No té composició peptídica	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₃	546.3
Ibutamoren	No té composició peptídica	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₅ S	528.2
Alexamorelin	H-Ala-His-D-Trp(2-Me)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	C ₅₀ H ₆₃ N ₁₃ O ₇	958.1
Alexamorelin 3-6 OH	(D-Mrp)-Ala-Trp-(D-Phe)	C ₃₅ H ₃₈ N ₆ O ₅	623.3
Tabimorelin	No té composició peptídica	C ₃₂ H ₄₀ N ₄ O ₃	528.7

Analit	Seqüència aminoàcid	Fórmula molecular	Massa monoisotòpica (Da)
GnRH			
Buserelin	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt	C ₆₀ H ₈₆ N ₁₆ O ₁₃	1238.7
Gonadorelin	H-Pyr-His-Trp-D-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	C ₅₅ H ₇₅ N ₁₇ O ₁₃	1181.3
Leuprolerin	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₆ O ₁₂	1208.6
Histrelin	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(1-Bn)-Leu-Arg-Pro-NHEt	C ₆₆ H ₈₆ N ₁₈ O ₁₂	1323.5
Agents emmascarant i diürètics			
Desmopressin	deamino-Cys(1)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(1)-Pro-D-Arg-Gly-NH ₂	C ₄₆ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	1068.4
Felypressin	H-Cys(1)-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys(1)-Pro-Lys-Gly-NH ₂	C ₄₆ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	1040.2
Factors del creixement i moduladors dels factors de creixement			
TB 500	N-Ac-Leu-Lys-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln	C ₃₈ H ₆₈ N ₁₀ O ₁₄	888.5

Abreviacions: Mrp = 2-metil triptòfan, Aib = àcid aminoisobutíric, Nal = naftilalanina

2. Objectius

- Incorporar i validar, sota normatives de qualitat ISO/IEC 17025 i sota els requisits de la WADA, nous analits al mètode de detecció i confirmació de pèptids petits en orina humana per LC-MS/MS.
- Optimitzar les condicions de detecció per LC-MS/MS.

3. Metodologia

3.1. Productes químics i reactius

Els patrons usats van ser GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin i Ipamorelin (Peptide Sciences); GHRP-4, GHRP-5 i el patró intern GHRP-4 D4 (UPF); Hexarelin 1-3 OH, Ipamorelin 1-4 OH i GHRP-1 2-4 OH (Auspep); Anamorelin, Tabimorelin, Leuprolerin i l'Histrelin (Toronto Research Chemicals); Ibutamoren (Sigma-Aldrich); Buserelin i Gonadorelin (European Pharmacopeia) i TB-500 (WADA).

Tots els solvents i reactius usats en la preparació de les mostres van ser de qualitat analítica i són els següents: àcid acètic, fosfat potàssic, metanol comprats a Merck (Darmstadt, Alemanya) i àcid fòrmic comprat a Honeywell (Morristown, Estats Units). L'aigua ultrapura va ser obtinguda usant un sistema de purificació Milli-Q de Millipore Iberica (Barcelona, Espanya). Els cartutxos de la SPE són de mode mixte OASIS WCX (60 mg, 60 µm de partícules, 30cc) comprats a Waters (Milford, Estats Units).

Els solvents usats en la separació cromatogràfica van ser àcid fòrmic de qualitat LC-MS comprat a Sigma-Aldrich (St Louis, Estats Units) i acetonitril de qualitat LC comprat a Merck (Darmstadt, Alemanya).

3.2. Mostres d'orina, solucions stock i solucions de treball

Les solucions stock dels compostos de la taula 2 i el patró intern GHRP-4 D4 es van preparar en aigua al 2% d'àcid acètic a concentracions d'1mg/ml. A partir d'aquestes, les solucions de treball es van preparar a concentracions de 0.1, 1, i 10 µg/ml de patró diluint amb aigua al 2% d'àcid acètic excepte el Leuprolerin que es dilueix amb metanol. Totes les solucions es van emmagatzemar a -20°C.

Com a blanc d'orina (BLOR) s'usen 2 ml d'orina, d'un voluntari sa, sense fortificar i com a mostra control (ORE) 2 ml d'orina fortificada amb els patrons la qual es prepara el mateix dia de l'extracció amb les concentracions finals indicades a la taula 3.

Taula 3: concentració final de cada patró a l'ORE

Patró	Concentració final (ng/ml)	Patró	Concentració final (ng/ml)
GHRP-2	0.5	GHRP-2 1-3 OH	0.5
GHRP-5	10	Alexamorelin	10
GHRP-1	5	TB 500	2
GHRP-6	10	Ibutamorelin	2
Ipamorelin	10	Anamorelin	2
Hexarelin	5	Buserelin	2
Desmopressin	5	Gonadorelin	2
GHRP-4	1	Leuprolerin	2

Les mostres d'orina per a analitzar provenen d'esportistes d'elit els quals la seva organització o federació esportiva els exigeix fer un control d'antidopatge.

Les mostres d'orina per a la validació van ser obtingudes a partir de voluntaris sans que no prenen cap tipus de medicació.

3.3. Preparació de les mostres

Tot el material emprat durant la preparació de les mostres sempre cal que sigui de baixa unió. A 2 ml de mostres s'addicionen 5 µl de GHRP-4 D4 com a patró intern (ISTD) i 1 ml de tampó fosfat potàssic 0.1 M, pH = 7 i es vortegen uns 10 segons. Es comprova amb tires de pH que aquest estigui entre 6-7.5. Es centrifuga tot durant 10 minuts a 4350 rpm.

Es carreguen les mostres en cartutxos OASIS WCX, prèviament acondicionats amb 1 ml de metanol i 1 ml d'aigua MilliQ. El cartutx es renta amb 3 ml d'aigua MilliQ i 1 ml de solució metanol/aigua 50:50. Els analits s'elueixen amb elució manual amb una solució de 3 ml de metanol amb 5% d'àcid fòrmic. S'evapora l'eluat en un speedvac durant 2h fins a un volum d'uns 100 µl i el residu es reconstituït amb 50 µl d'aigua MilliQ amb 2% d'àcid acètic. Es vortegen les mostres i es centrifuguen durant 10 minuts a 4350 rpm. Es transfereix el contingut de cada mostra a microvials de 0.2 ml de polipropilè, els

quals estan dins dels vials de cromatografia líquida de 2 ml, i es carreguen a l'autosampler del LC-MS/MS.

3.4. Condicions de LC-MS/MS

Les anàlisis de LC-MS/MS es van dur a terme usant un espectròmetre de masses de triple quadrupol (Xevo TQ XS) amb ionització electroesprai (ESI) (Waters Associates, Milford, MA, USA) acoblat prèviament a un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia (UPLC) (Acquity, Waters Associates) per a la separació cromatogràfica. El gas de conus i de desolvatació va ser nitrogen. El flux de desolvatació va ser de 1200 L/h i el flux del gas del conus 150 L/h. La temperatura de desolvatació del nitrogen va ser 600°C i la temperatura de la font 150°C. L'Argó es va utilitzar com a gas de col·lisió. La ionització per electroesprai va ser en mode positiu a un voltatge de capil·lar de 2.5 kV.

La detecció va ser en mode de monitorització de reaccions múltiples (MRM). Els paràmetres de ESI (voltatge de conus i energia de col·lisió) van ser optimitzats per a cada analit per infusió directa de solucions patró d'1 µg/ml a l'espectròmetre de masses a un flux de 10 µl/min. Per adquirir i processar les dades es va utilitzar el software MassLynx (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

La separació cromatogràfica es va dur a terme en el cromatògraf de líquids Waters Acquity UPLC system amb columna Acquity BEH C₁₈ (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm de mida de partícula) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La temperatura del forn es manté constant a 45°C. La fase mòbil consisteix en acetonitril al 0.1% d'àcid fòrmic (solvent A) i aigua MilliQ amb 0.1% d'àcid fòrmic (solvent B). El flux és de 0.6 ml/min amb les següents condicions de gradient: 5% de solvent A incrementant fins a 35% A en 8 min, augmentant fins a 80% A en 2 min, baixant fins a 5% A en 1 min i mantenint les condicions inicials durant 4 min. El temps total d'anàlisi és de 15 min i el volum de mostra injectat de 10 µl.

El voltatge de conus, les transicions característiques de cada analit i les energies de col·lisió de cada analit estan detallades a la taula 4.

Taula 4: condicions de LC-MS/MS per a cada analit

Analit	TR (min)	TRR (min)	Precursor (m/z)	Producte (m/z)	CV (V)	CE (Ev)
GHRP-1	4.8	0.73	478	406.2	30	20
GHRP-1	4.8	0.73	478	209	30	20
GHRP-1 2-4 OH	2.78	0.43	424.2	335.1	20	15
GHRP-1 2-4 OH	2.78	0.43	424.2	287.2	20	15
GHRP-2	6	0.91	410	550	20	15
GHRP-2	6	0.91	410	170	20	20
GHRP-2 1-3 OH	4.4	0.67	358	170	20	15
GHRP-2 1-3 OH	4.4	0.67	358	241	20	15
GHRP-2 1-3 OH	4.4	0.67	358	269	20	10
GHRP-4	6.08	1.04	608	351	20	20
GHRP-4	6.08	1.04	608	444	20	20
GHRP-4 D4 (ISTD)	6.6	1	612.2	350.9	25	20
GHRP-4 D4 (ISTD)	6.6	1	612.2	448.4	25	20
GHRP-5	7.4	1.13	771	351	20	30
GHRP-5	7.4	1.13	771	421	20	30
GHRP-5	7.4	1.13	771	754	20	30
GHRP-6	3.8	0.59	437.5	129	20	20
GHRP-6	3.8	0.59	437.5	395.3	20	20
GHRP-6	3.8	0.59	437.5	324	20	20
Hexarelin	4.3	0.66	444.68	129.2	30	15
Hexarelin	4.3	0.66	444.68	110	30	15
Hexarelin	4.3	0.66	444.68	338	30	20
Hexarelin	4.3	0.66	444.68	248	30	20
Hexarelin 1-3 OH	1.78	0.27	427.4	310.2	20	20
Hexarelin 1-3 OH	1.78	0.27	427	273	20	20
Histrelin	4.08	0.62	442	221	30	15
Histrelin	4.08	0.62	442	538	30	15
Ipamorelin	2.8	0.42	357	129	20	15
Ipamorelin	2.8	0.42	357	223	20	15

Analit	TR (min)	TRR (min)	Precursor (m/z)	Producte (m/z)	CV (V)	CE (Ev)
Ipamorelin	2.8	0.42	712	223	20	30
Ipamorelin 1-4 OH	4.58	0.70	585	223	20	25
Ipamorelin 1-4 OH	4.58	0.70	585	166	20	25
Anamorelin	8.5	1.3	547	276.2	25	20
Anamorelin	8.5	1.3	547	174	25	30
Ibutamoren	7.5	1.14	529	267	30	20
Ibutamoren	7.5	1.14	529	263.3	30	20
Alexamorelin	4.1	0.63	480	209	30	20
Alexamorelin	4.1	0.63	480	813	30	20
Alexamorelin	4.1	0.63	480	550	30	20
Alexamorelin 3-6 OH	7.04	1.1	623	352	20	20
Alexamorelin 3-6 OH	7.04	1.1	623	335	20	20
Buserelin	6	0.91	620.5	221.3	30	25
Buserelin	6	0.91	620.5	249.1	30	25
Buserelin	6	0.91	620.5	592.4	30	15
Gonadorelin	3.6	0.55	591.9	498.2	35	25
Gonadorelin	3.6	0.55	591.9	249.1	35	25
Leuprolerin	5.6	0.86	605.5	299.3	35	25
Leuprolerin	5.6	0.86	605.5	248.9	35	25
Desmopressin	4.1	0.63	535	120	25	20
Desmopressin	4.1	0.63	535	328	25	20
Felypressin	3.15	0.48	521	300	25	15
Felypressin	3.15	0.48	521	129	25	15
TB 500	1.1	0.17	445	359	30	20
TB 500	1.1	0.17	446	84	20	25
TB 500	1.1	0.17	446	147.1	30	25

3.5. Validació del mètode

Aquest procediment experimental va ser validat seguint els paràmetres d'acord amb la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 i els requisits de la WADA. D'aquesta manera el mètode va ser validat en termes de recuperació d'extracció, precisió intra-assajos (repetibilitat) i límits de detecció (LOD).

Per tal d'avaluar la repetibilitat es van analitzar 6 replicats de blanc d'orina fortificats amb els patrons a concentració inferior (control inferior, CI) i 6 replicats a concentració superior (control superior, CS) , el doble que la concentració inferior, aproximadament, el mateix dia.

Per avaluar el rendiment d'extracció, es van analitzar 6 replicats d'orina de control superior (carregats a l'inici de l'extracció) sotmeses al procediment normal d'extracció i 6 replicats amb l'extracció prèvia de la matriu (patrons addicionants després de l'elució de l'extracció).

4. Resultats

4.1. Cromatogrames dels analits analitzats al mètode

A la figura 1 es mostren els cromatogrames d'un blanc d'orina carregat només amb el ISTD i a la figura 2 els cromatogrames d'un blanc d'orina carregat amb els patrons dels peptids petits.

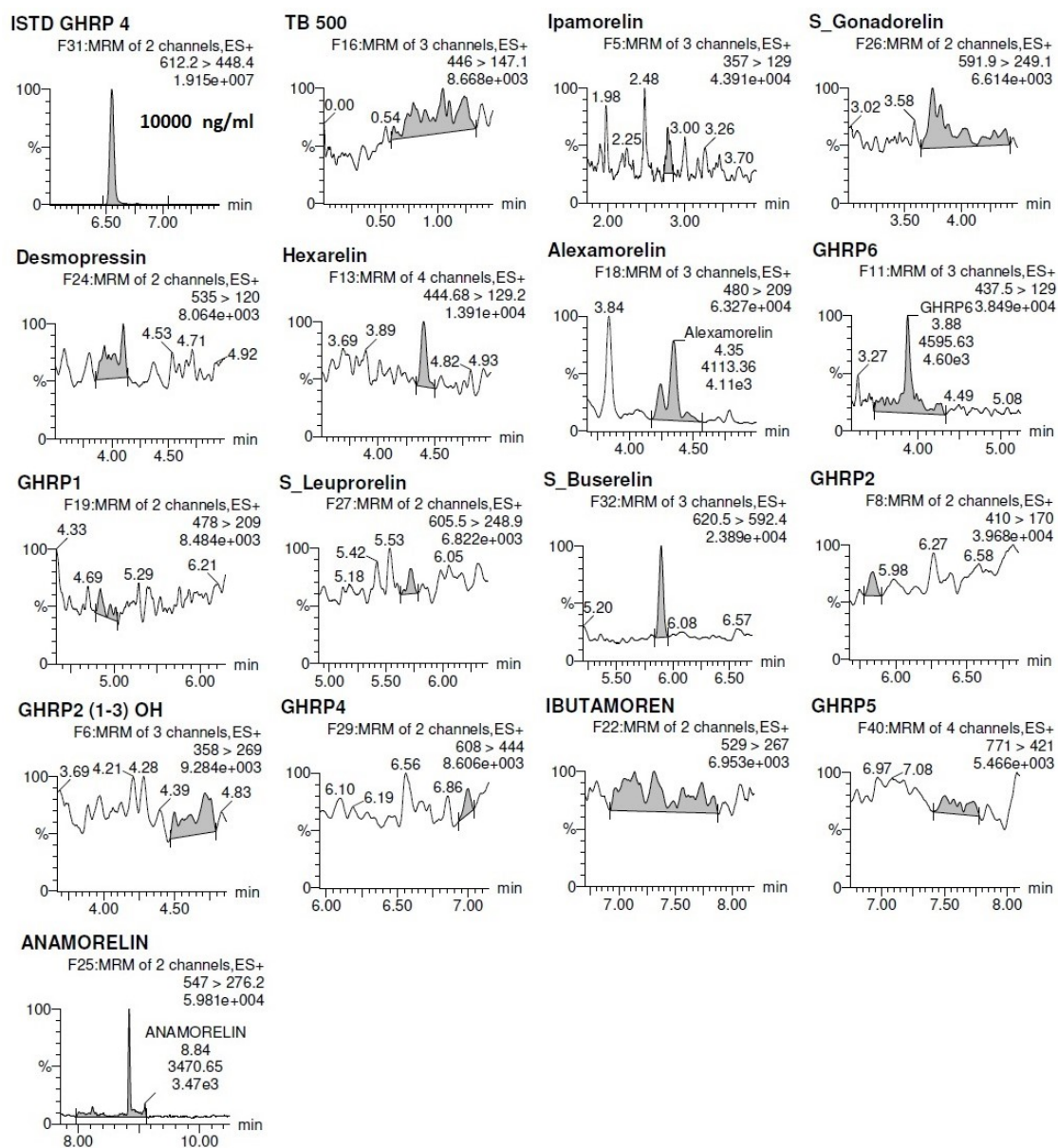


Figura 1: cromatogrames d'un blanc d'orina carregat amb el ISTD

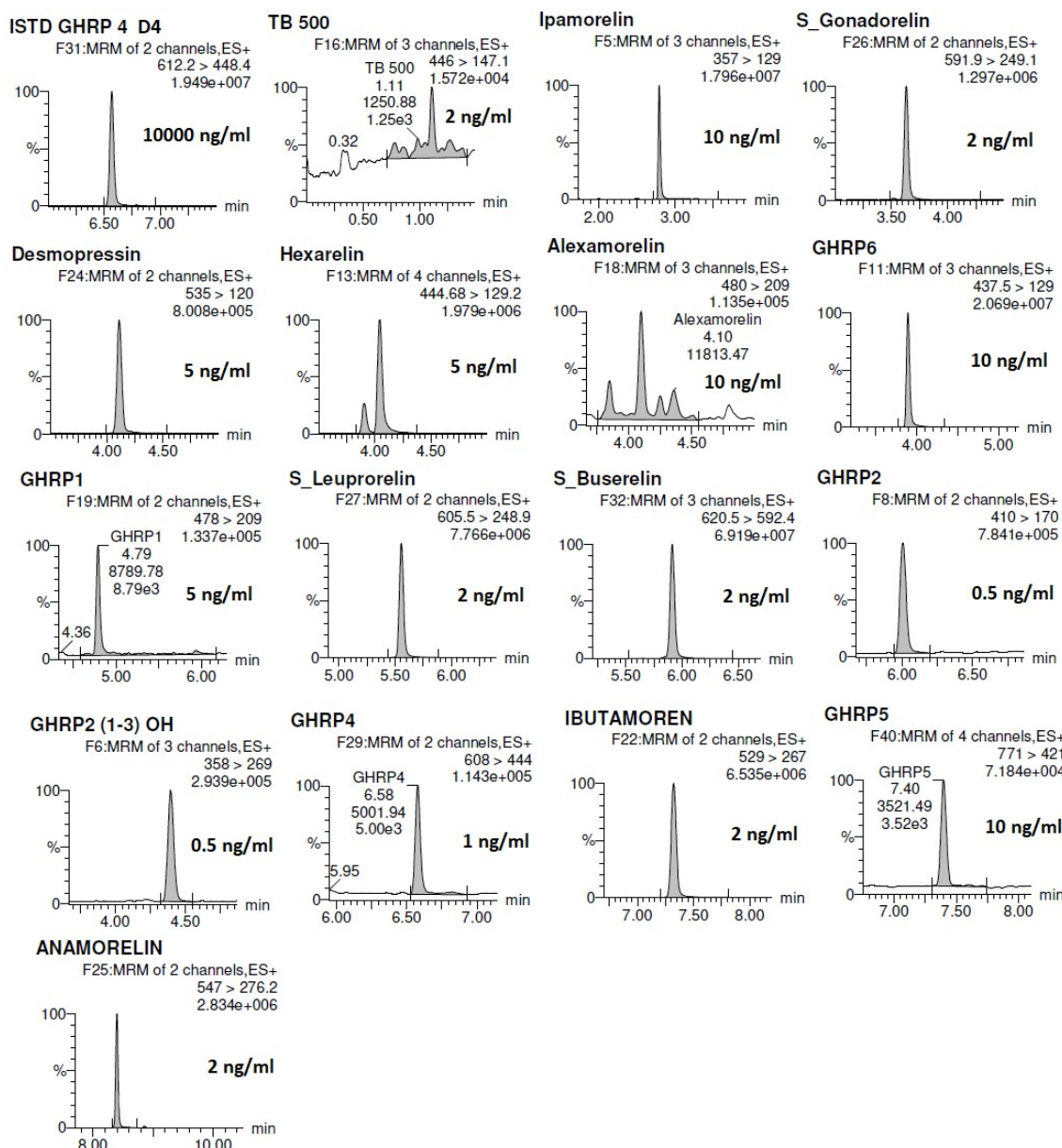


Figura 2: cromatogrames d'un blanc d'orina carregat amb els patrons dels pèptids petits

4.2. Optimitzacions de les condicions de l'espectrometria de masses

Per tal d'incorporar al mètode d'anàlisi els analits Ipamorelin 1-4 OH, Hexarelin 1-3 OH, GHRP-1 2-4 OH, Alexamorelin 3-6 OH, Histrelin i Felypressin, s'han d'estudiar i optimitzar els paràmetres instrumentals del ESI-MS/MS. Primer de tot, es preparen alíquotes d'aquests patrons de concentració d'1 µg/ml i alíquotes de blancs d'orina fortificats amb concentracions dels patrons de 2 ng/ml. S'infusionen directament els

patrons a l'espectròmetre de masses i s'obtenen els espectres de masses en scan i els espectres de masses d'ions producte de cadascun.

Primer es van adquirir les dades en mode Full-Scan per identificar i seleccionar els ions precursors més abundants. Aquests ions corresponen a les càrregues dominants de l'analit. Experimentalment, es modifiquen les condicions de voltatge de conus i d'energia de col·lisió per tal d'obtenir els espectres de masses d'ions producte i valorar quins són els ions producte més abundants. Es trien les transicions òptimes a incloure en el mètode MRM i s'injecten els patrons purs amb el gradient cromatogràfic del mètode per identificar el temps de retenció. Paral·lelament s'extreuen una mostra blanc i una mostra carregada amb els analits a incorporar per verificar de nou el temps de retenció i la senyal obtinguda després d'un procediment d'extracció.

S'analitzen els cromatogrames del patró sol i el d'orina fortificada i es busquen dos transicions ió pare – ió fill que apareguin en els dos experiments, que donin bona senyal al detector i que no tinguin pics interferents propers a la zona on apareix el pic de l'analit.

A continuació es mostra a la figura 3 els espectres de masses dels ions producte dels analits incorporats al mètode analític.

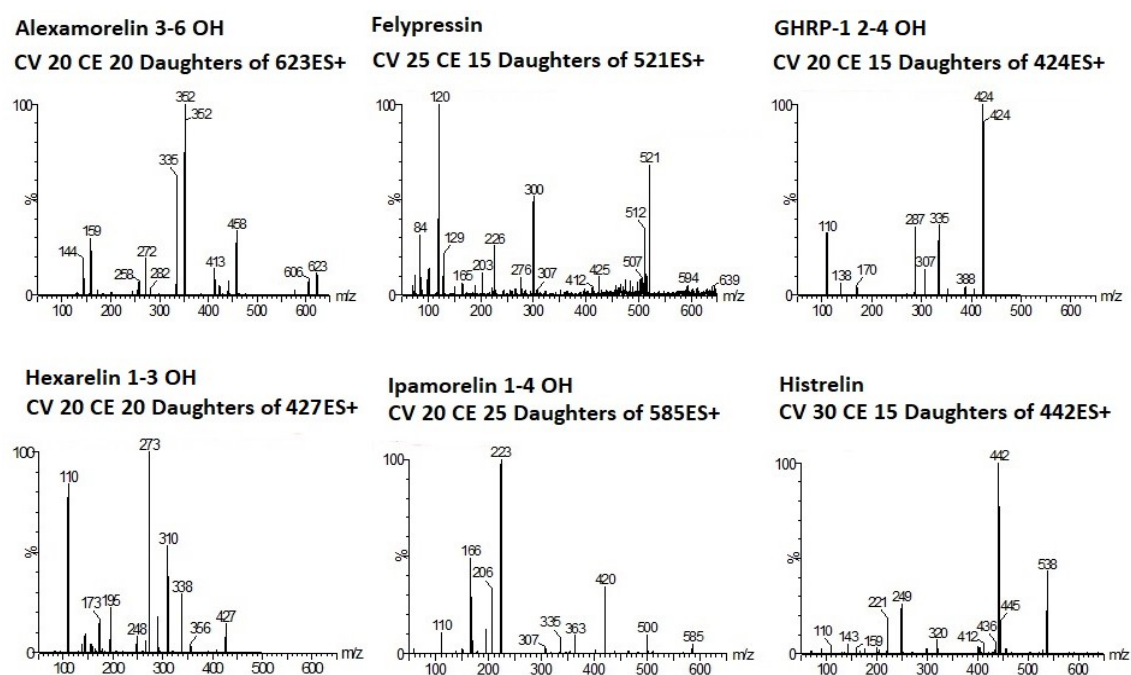


Figura 3: espectres de massa dels nous analits incorporats al mètode analític

4.3. Validacions del mètode

En la validació del mètode s'han avaluat els paràmetres del límit de detecció, la recuperació de l'extracció i la repetitibilitat.

La repetitibilitat s'expressa com el percentatge de la divisió de la desviació estàndard i la mitjana dels valors de les ratios d'àrees de patró i patró intern en els diferents replicats (n=6).

$$\% RSD = \frac{\sigma(A \text{ Patró} / A \text{ ISTD})}{\bar{X}(A \text{ Patró} / A \text{ ISTD})} \times 100$$

La recuperació de l'extracció s'expressa com el percentatge de la divisió de la ratio de l'àrea del control superior sotmès al procediment normal d'extracció i l'àrea del patró intern entre el promig de la ratio de les àrees dels patrons amb extracció de les matrius i les àrees del patró intern.

$$\% \text{ Rendiment extracció} = \frac{(A \text{ Patró sense extracció matriu} / A \text{ ISTD})}{\bar{X}(A \text{ Patró extracció matriu} / A \text{ ISTD})} \times 100$$

El coeficient de variació CV s'expressa com el percentatge de la ratio entre la desviació estàndard i la mitjana dels valors del rendiment d'extracció en els diferents replicats.

$$\% CV = \frac{\sigma(\text{Rendiment extracció})}{\bar{X}(\text{Rendiment extracció})} \times 100$$

Els resultats es mostren a la taula 5.

Taula 5: resultats dels paràmetres de la validació

Patró	LOD CI (ng/ml)	Repetibilitat CI (n=6) (%RSD)	CS (ng/ml)	Repetibilitat CS (n=6) (%RSD)	Rendiment extracció (%)	%CV
Alexamorelin	1	12.8	5	6.5	52.6	6.5
Alexamorelin 3-6 OH	1	12.9	2	16.4	38.0	16.4
Desmopressin	1	4.3	2	10.8	84.4	10.8
Felypressin	2	4.5	5	6.4	56.9	6.4
GHRP-1 2-4 OH	2	2.9	5	5.0	59.5	5.0
GHRP-1 2-7 OH	1	8.5	2	2.7	52.8	2.7
Hexarelin 1-3 OH	1	23.0	2	19.8	14.5	19.8
Histrelin	2	3.2	5	5.1	99.5	5.1
Ipamorelin 1-4 OH	2	19.3	5	13.0	48.0	13.0
Tabimorelin	1	7.1	5	1.3	-	-

En quant a la repetibilitat, es pot observar que hi ha bons % RSD (menors a 25 %) en el control superior i bons resultats en el control inferior. De manera general hi ha %RSD més elevats per als patrons amb les concentracions més petites tant en els controls inferiors com en els superiors.

En quant als rendiments d'extracció, superen el 50% (excepte per Hexarelin 1-3 OH i Alexamorelin 3-6 OH). No s'ha pogut calcular el rendiment d'extracció del Tabimorelin.

En les figures 4 i 5 es mostren els cromatogrames dels blancs d'orina carregats a concentracions d'1-2 ng/ml (controls inferiors), carregats a 2-5 ng/ml (controls superiors) i del blanc d'orina obtinguts durant la validació.

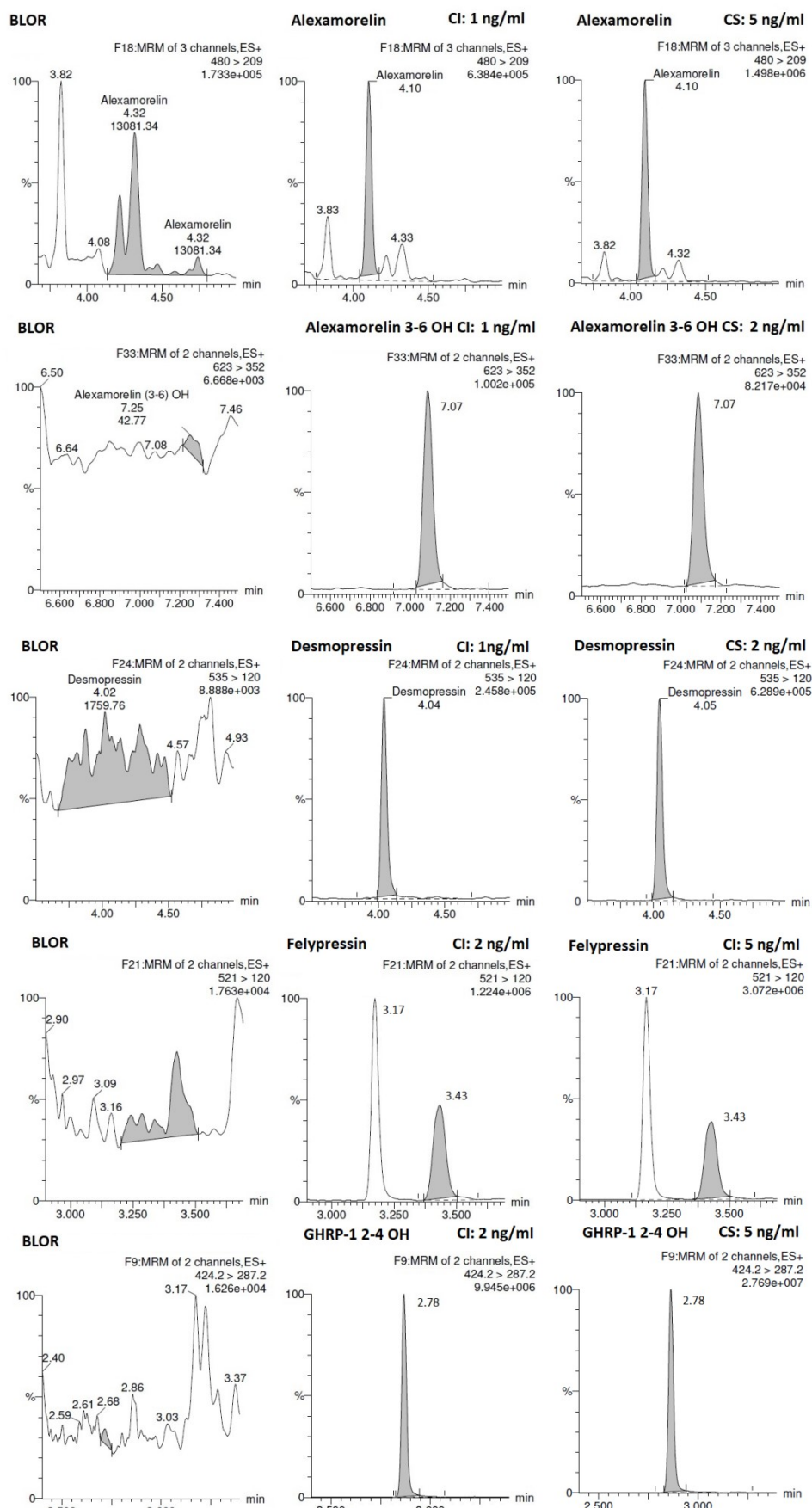


Figura 4: cromatogrames del control inferior, control superior i del blanc d'orina

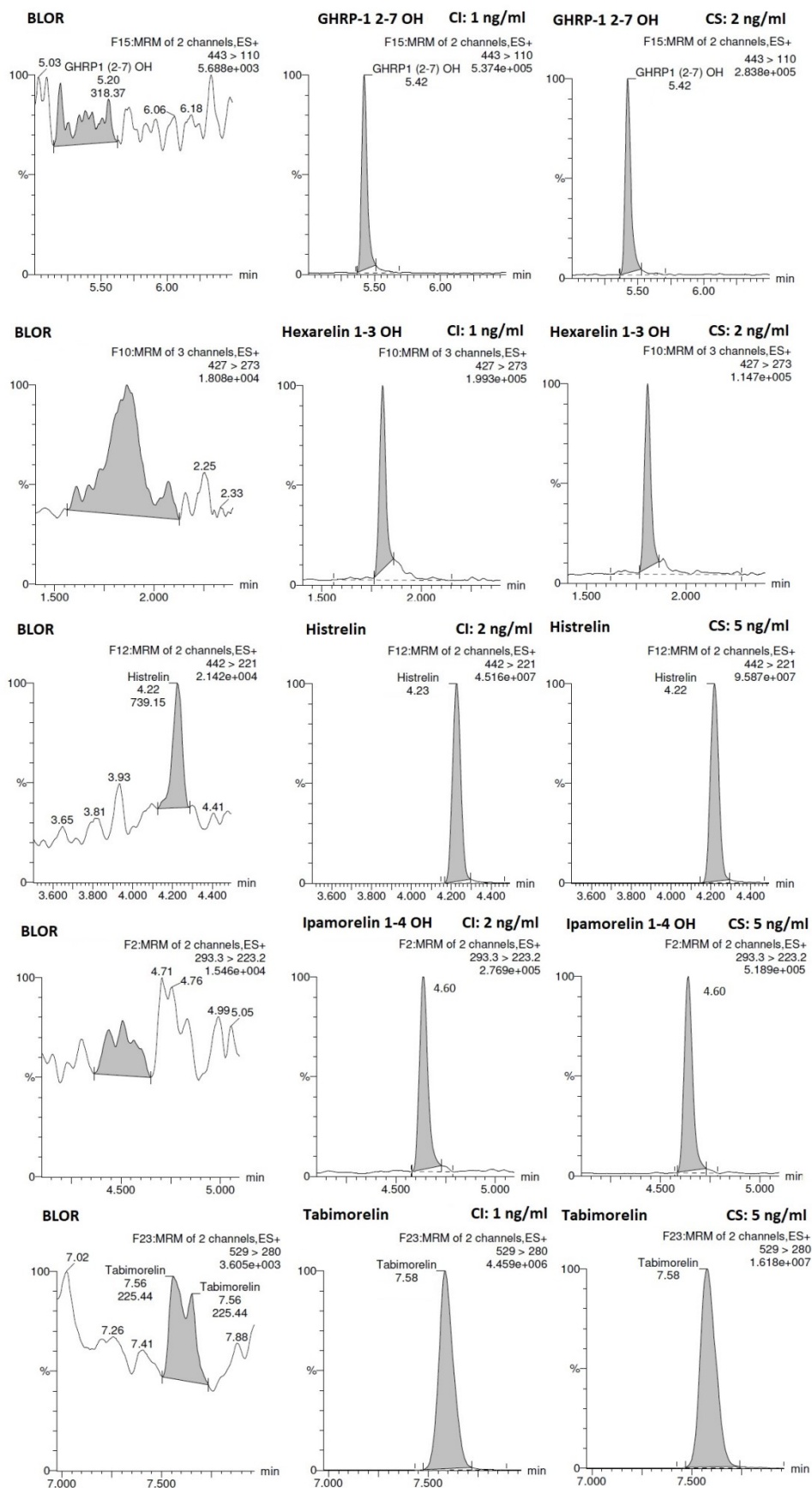


Figura 5: cromatogrames del control inferior, control superior i del blanc d'orina

5. Discussió

5.1. Comparació dels resultats amb els requisits de la WADA

S'han comparat els límits de detecció aconseguits pel Laboratori d'Antidopatge de Catalunya enfront dels límits de detecció requerits per la WADA [10]. Els requisits de la WADA posen com a límit de detecció 2 ng/ml per a les substàncies GHRP, GHS, GnRH, factors del creixement i moduladors dels factors de creixement, els agents emascarants i diürètics. Tots aquests requisits es compleixen ja que els límits de detecció al laboratori estan per sota tal i com està indicat a la taula 5.

5.2. Comparació dels resultats amb altres grups

S'han comparat els límits de detecció aconseguits pel Laboratori d'Antidopatge de Catalunya, taula 3 i taula 5, enfront dels aconseguits per onze grups de treball, taula 6, trobats a la bibliografia els quals usen LC-MS/MS amb ionització amb electroesprai i mode MRM.

La majoria dels grups de treball tenen límits de detecció entre 0.10 i 1 ng/ml excepte el laboratori 9 i laboratori 11 que són els que els tenen més baixos entre 0.002 i 0.01 ng/ml degut a una major sensibilitat de l'equip.

El Laboratori Antidopatge té límits de detecció més baixos per al GHRP-2 1-3 OH que el laboratori 5 i el mateix LOD que el laboratori 4.

El Laboratori Antidopatge té el mateix valor de LOD per al GHRP-2 que el laboratori 3 així com el mateix LOD de GHRP-4 que el laboratori 5.

Taula 6: límits de detecció dels pèptids petits d'altres grups de treball

Substància	Lab 1 [11] (ng/ml)	Lab 2 [12] (ng/ml)	Lab 3 [13] (ng/ml)	Lab 4 [14] (ng/ml)	Lab 5 [15] (ng/ml)	Lab 6 [16] (ng/ml)	Lab 7 [17] (ng/ml)	Lab 8 [18] (ng/ml)	Lab 9 [19] (ng/ml)	Lab 10 [20] (ng/ml)	Lab 11 [21] (ng/ml)
GHRP											
GHRP-1	0.50	0.50	0.50	0.50	-	0.50	0.20	0.20	0.01	-	0.01
GHRP-1 2-7 OH	-	-	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-
GHRP-2	0.20	0.10	0.50	0.20	-	0.20	0.05	0.05	0.005	-	0.002
GHRP-2 1-3 OH	0.25	0.10	0.20	0.50	1	-	-	0.20	-	-	0.005
GHRP-4	0.20	0.20	0.20	0.50	1	0.20	-	0.05	0.005	-	0.005
GHRP-5	0.25	0.20	0.50	0.20	1	0.25	-	0.10	0.005	-	0.005
GHRP-6	0.30	0.50	0.50	1	-	0.30	0.10	0.10	0.005	-	0.01
Hexarelin	0.30	0.50	0.20	0.50	-	0.30	0.20	0.20	0.01	-	0.01
Hexarelin 1-3 OH	-	-	0.20	-	-	-	0.20	0.20	-	-	-
Alexamorelin	0.25	-	1	0.50	-	0.25	-	0.50	0.025	-	0.01
Alexamorelin 3-6 OH	-	-	0.20	-	0.10	-	-	-	-	-	-
GHS											
Ipamorelin	0.25	0.20	0.10	0.50	-	0.25	0.20	0.05	0.01	-	0.01
Ipamorelin 1-4 OH	-	-	-	-	-	-	0.20	0.20	-	-	-
Anamorelin	-	0.20	0.05	0.20	0.10	-	-	-	-	-	-
Ibutamorem	-	-	0.10	0.10	-	-	-	-	-	-	-
GnRH											
Buserelin	-	0.05	-	0.20	0.50	-	-	-	-	0.10	-
Leuprolerin	-	0.05	-	0.20	0.50	-	-	-	-	0.50	-
Histrelin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-
Agents emascarants i diürètics											
Desmopressin	-	0.05	-	0.50	0.50	-	-	0.10	-	-	-
Felypressin	-	0.20	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-

6. Conclusions

El mètode analític realitzat, permet una bona detecció de 25 pèptids petits (taula 1) en mostres d'orina humana després d'una extracció en fase sòlida amb cartutxos WCX d'intercanvi iònic i posterior anàlisi LC-MS/MS.

S'han incorporat al mètode analític els següents analits: Ipamorelin 1-4 OH, Hexarelin 1-3 OH, GHRP-1 2-4 OH, Alexamorelin 3-6 OH, Histrelin i Felypressin.

Ha estat possible la validació de tots els analits incorporats juntament amb el Desmopressin, l'Alexamorelin i el Tabimorelin en termes de límits de detecció, repetibilitat i recuperació d'extracció. Els límits de detecció assolits són entre 1-2 ng/ml i estan per sota dels requerits per la WADA tal com indica la taula 5.

Agraïments

Vull agrair a tot el personal de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques per haver-me oferit l'oportunitat de treballar amb ells. He pogut veure el dia a dia d'un laboratori antidopatge, tot el procediment de treballar sota normatives de qualitat de l'acreditació ENAC i sota els requisits de la WADA, el seguiment de la cadena de custòdia de les mostres així com realitzar optimitzacions i posar a punt mètodes d'anàlisi. Juntament amb l'equip del Laboratori Antidopatge, he tingut l'ocasió única de col·laborar en les anàlisis de mostres de la competició dels "Jocs del Mediterrani Tarragona 2018".

Tot plegat m'ha permès complementar els meus estudis del grau de química i del màster així com aprofundir en coneixements tant de bioquímica com de química forense.

7. Bibliografia

- [1] Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. UNE-EN ISO/IEC 17025:2017
- [2] <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-prohibited-list> (data de consulta 5 abril 2018)
- [3] Thomas, A; Höppner, S; Geyer, H; Schänzer, W; Petrou, M; Kwiatkowska, D; Pokrywka, A; Thevis, M. Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2011**, *401*, 507 - 516.
- [4] Constanzer, M.L; Chavez-Eng, C.M; Matuszewski, B.K. Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B.* **1997**, *693*, 131-137.
- [5] Thomas, A; Geyer, H; Kamber, M; Schänzer, W; Thevis, M. Mass spectrometric determination of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in human urine for doping control purposes by means of LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 908-915
- [6] Esposito, S; Deventer, K; T'Sjoen, G; Vantilborgh, A; Van Eenoo, P. Doping control analysis of desmopressin in human urine by LC-ESI-MS/MS after urine delipidation. *Biomed Chromatogr.* **2013**, *27*, 240-245.
- [7] Ho, E. N. M; Kwok, W.H; Lau, M.Y; Wong, A.S.Y; Wan, T.S.M; Lam, K.K.H; Schiff, P.J; Stewart, B.D. Doping control analysis of TB-500, a synthetic version of an active region of thymosin 4, in equine urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J.Chromatogr.A.* **2012**, *1265*, 57-69.
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (data de consulta 6 abril 2018)
- [9] <https://www.drugbank.ca/drugs> (data de consulta 25 abril 2018)
- [10] <https://www.wada-ama.org/en/model-rules-guidelines-and-protocols> (data de consulta 15 de maig de 2018)
- [11] Thomas, A; Höppner, S; Geyer, H; Schänzer, W; Petrou, M; Kwiatkowska, D; Pokrywka, A; Thevis, M. Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* **2011**, *401*, 507–516
- [12] Mazzarino, M; Calvares, V; de la Torre, X; Parrotta, G; Sebastianelli, C; Botre, F. Development and validation of a liquid chromatography–mass spectrometry procedure after solid-phase extraction for detection of 19 doping peptides in human urine, *Forensic Toxicol.* **2015**, *33*, 21–337

- [13] Min, H; Han, B; Sung,C; Park, J; Mi Lee,K; Jun Kim, H; Hun Kim, K; Son, J; Seung Kwon, O; Lee, J. LC-MS/MS Method for Simultaneous Analysis of Growth Hormone-Releasing Peptides and Secretagogues in Human Urine. *Mass Spectrom.Lett.* **2016**, 7, 55-63.
- [14] Cuervo, D; Loli, C; Fernández, M; Muñoz, G; Carreras, D. Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accuratemass quadrupole time-of-flight LC–MS, *J.Chromatogr., B.* **2017**, 1065-1066, 134-144.
- [15] Görgens, C; Guddat, S; Thomas, A; Wachsmuth, P; Orlovius, A.K; Sigmund,G; Thevis, M; Schänzer, W. Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performanceliquid chromatography high resolution/high accuracy massspectrometry. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **2016**, 131, 482-496.
- [16] Van den Broek, I; Blokland, M; Nessen M.A; Sterk,S; Current trends in mass spectrometry of peptides and proteins: application to veterinary and sports-doping control. *Mass Spectrom. Rev.* **2015**, 34, 571–594.
- [17] Semenistaya, E; Zvereva, I; Thomas, A; Thevis, M; Krotov, G; Rodchenkov, G. Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug Test Anal.* **2015**, 7, 919–925.
- [18] Semenistaya, E; Zvereva, I; Krotov, G; Rodchenkov, G. Solid-phase extraction of small biologically active peptides on cartridges and microelution 96-well plates from human urine. *Drug Test Anal.* **2015**. DOI: 10.1002/dta.1890
- [19] Timms, M; Hall, N; Levina, V; Vine, J; Steel, R. A high-throughput LC-MS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography. *Drug Test Anal.* **2014**. DOI: 10.1002/dta.1624
- [20] Zvereva, I; Dudko, G; Dikunets, M. Determination of GnRH and its synthetic analogues' abuse in doping control: Small bioactive peptide UPLC-MS/MS method extension by addition of in vitro and in vivo metabolism data; evaluation of LH and steroid profile parameter fluctuations as suitable biomarkers. *Drug Test Anal.* **2018**, 4, 711-722.
- [21] Thomas, A; Walpurgis, K; Krug, O; Schänzer, W; Thevis, M. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry. *J.Chromatogr., A.* **2012**, 1259, 251-257.