

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 402**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2012 PCT/EP2012/069878**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 12769441 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2764360**

54 Título: **Método para la detección y/o cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de como mínimo 200**

30 Prioridad:

06.10.2011 EP 11382314

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2019

73 Titular/es:

**LABORATORIS SANIFIT, S.L. (100.0%)
Parc Bit-Edifici Dissset-Oficina D3, Ctra.,
Valldemossa, Km. 7,4
07121 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES**

72 Inventor/es:

**PERELLÓ BERSTARD, JOAN;
MARASCHIELLO DE ZUANI, CIRIACO;
LENTHÉRIC, IRÉNE;
MENDOZA DE LAS HERAS, PAULA;
TUR ESPINOSA, FERNANDO;
TUR TUR, EVA;
ENCABO ALARCÓN, MÁXIMO;
MARTÍN BECERRA, EVA;
BENITO AMENGUAL, MARÍA DE MAR y
ISERN AMENGUAL, BERNAT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 714 402 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Método para la detección y/o cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de como mínimo 200

5 La presente invención hace referencia a un método directo de cromatografía de líquidos para la cuantificación de moléculas químicamente complejas, donde la molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato, seleccionado del grupo que contiene entre 2 y 6 grupos fosfato, incluyendo iones o sales de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 La determinación analítica de la presencia de moléculas químicamente complejas que contengan fósforo está plagada de importantes dificultades, principalmente debido a sus propiedades fisicoquímicas. Estas moléculas cuentan con una carga elevada y, a causa de la presencia de grupos funcionales complejos, como fosfatos o fosfonatos, muestran un grado de ionización distinto en función del pH. Esta cuestión es especialmente relevante para moléculas con más de un grupo que contenga fósforo.

20 Asimismo, la ausencia de bandas de absorción en la región del espectro UV-visible en la mayoría de estas moléculas químicamente complejas dificulta su cuantificación mediante métodos espectrofotométricos directos.

Además, la determinación de la presencia de moléculas químicamente complejas en una matriz biológica implica dificultades adicionales a causa del efecto matriz, de modo que se deben desarrollar y validar nuevos métodos bioanalíticos para su uso rutinario.

25 La baja concentración del analito en comparación con la de otros componentes de la matriz puede eliminar la respuesta del analito. Estos efectos pueden provocar diferencias en la respuesta entre la muestra de la matriz y los estándares, lo que se traduce en dificultades para el análisis cuantitativo y la identificación de compuestos (Biol Pharm Bull 25, 547—557; 2002).

30 Por ejemplo, los bifosfonatos presentan dos grupos fosfónicos por molécula, lo que confiere un carácter fuertemente iónico y una mayor polaridad. Además, la mayoría de los miembros de esta familia no cuenta con cromóforos, lo que impide una conveniente detección directa por UV (J Pharm Biomed Anal 48, 483—496; 2008). Se han desarrollado otros métodos bioanalíticos para la determinación de la presencia de bifosfonatos, que incorporan un paso de derivación para su determinación o fragmentación, por lo que no se trata de métodos directos, entendiéndose por método directo como la determinación de la presencia de la molécula per se o de un aducto de dicha molécula, hecho que proporciona un método más sensible, específico, exacto y robusto, pero sobre todo un método más aplicable, rápido y fiable para la realización de análisis rutinario (J Chromatogr B 877, 3159—3168; 2009, Int J Mass Spectrom 295, 85—93; 2010, J Mass Spectrom 37, 197—208; 2002).

40 Otro ejemplo de molécula químicamente compleja que contiene fósforo son los pirofosfatos. Los pirofosfatos se diferencian de los bifosfonatos en el átomo de carbono que enlaza los dos átomos de fósforo (el átomo de carbono de los bifosfonatos (P—C—P) se sustituye por uno de oxígeno (P—O—P).

45 Los nucleótidos son otro ejemplo de moléculas químicamente complejas, con una carga elevada y de naturaleza polar (a causa de la presencia de uno o varios grupos fosfato), por lo que la presente invención es especialmente relevante para los que presentan más de un grupo fosfato.

50 La determinación selectiva de la presencia de inositoles polifosfato (entre 2 y 6 grupos fosfato), junto con otras impurezas relacionadas, y especialmente en matrices biológicas, es uno de los principales avances en materia analítica que se consigue con la presente invención. En el caso más extremo, el inositol hexafosfato, también denominado InsP6 o IP6, presenta 12 protones disociables, con unos valores de pKa que oscilan entre valores negativos y valores superiores a 10 (Carbohydr Res 46, 159—171; 1976).

55 En la bibliografía existente se han descrito numerosos métodos analíticos para la cuantificación de InsP6. Sin embargo, la mayoría de ellos se han desarrollado para la determinación de su presencia en matrices simples (por ejemplo, los procedentes de métodos para extractos alimentarios o preparados farmacéuticos), en los que las concentraciones de InsP6 son superiores a las esperadas en matrices biológicas.

60 En el caso de matrices complejas (por lo general, las de origen biológico), los métodos citados con anterioridad no cuentan con la sensibilidad y especificidad suficientes para la determinación de la presencia de InsP6 cuando las concentraciones que se deben cuantificar son bajas, como sucede con el plasma, la orina, y otros fluidos, tejidos o células biológicas.

Así pues, se necesita un método muy sensible y selectivo para la cuantificación de inositol polifosfatos en este tipo de matrices, puesto que sus propiedades fisicoquímicas especiales hacen que la mayoría de los métodos actuales no sean útiles para este fin.

5 Además, aunque algunos de los métodos actuales permiten detectar inositol polifosfatos, no cuentan con la reproducibilidad y solidez suficiente para poderlos utilizar en estudios clínicos, en los que se deben realizar análisis sistemáticos de muestras.

10 En la patente WO/2009/109647 se presenta la determinación de la cantidad de inositol fosfato (IP1 o InsP1, solo un grupo fosfato) en una muestra (orina, plasma) mediante una prueba LC-ESI/MS/MS. En la patente US20100136600 se presenta la determinación de la presencia de mioinositol en una muestra (orina, plasma) mediante el uso de técnicas LC-MS/HPLC-MS. Sin embargo, ninguno de estos métodos presenta un método de determinación de la presencia de IP6, y la técnica de determinación descrita en estas patentes puede no tener la eficacia/idoneidad necesarias para la determinación de la presencia de IP2-IP6, porque se trata de moléculas con una carga elevada en comparación con el inositol (sin grupos fosfato ni carga) o IP1 (solo un grupo fosfato, carga limitada).

15 Previamente, se han desarrollado métodos indirectos para la determinación de la presencia de InsP6 e InsP3 en plasma mediante análisis de detección de masa-cromatografía de gases de fracciones cromatográficas de HPLC, que implica la hidrólisis del IP6 y, además, la determinación de la presencia de inositol o fosfato, por lo que se trata de un método que consume mucho tiempo (tres días por muestra) y ofrece unos resultados con una exactitud reducida (Life Sci 71, 1535–1546; 2002).

20 También se ha descrito la HPLC-MS directa para su cuantificación en extractos vegetales y células cultivadas *in vitro* (Mass Spectrom 23, 705–712; 2009). Sin embargo, las condiciones de la HPLC descritas, basadas en el uso de una columna de intercambio iónica, hacen que este método no se pueda aplicar a todas las demás matrices biológicas con baja concentración de analito.

25 La HPLC/MS con ionización por nebulización térmica permite determinar la presencia de inositol fosfato, pero en el propio documento se especifica la falta de sensibilidad como limitación para su uso en aplicaciones biológicas (Biomed Environ Mass Spectrom 19, 597–600; 1990).

30 Se han descrito otros métodos indirectos para la determinación de la presencia de IP6 en orina humana que se basan en la medición del fósforo total de extractos purificados de ácido fítico. En este caso, se requiere un pretratamiento específico de la muestra para evitar interferencias de otros compuestos que contengan fósforo que se encuentren junto con el ácido fítico en la muestra de orina, como fosfato o pirofosfato (Anal Chem 75, 6374–6378; 2003, Anal Chim Acta 510, 41-43; 2004). Uno de los inconvenientes de estos métodos es que, a causa de sus problemas de sensibilidad y selectividad, su aplicación se limita a muestras de orina, y no se pueden aplicar a muestras de tejido o sangre ni a la cuantificación de impurezas relacionadas. Además, la determinación indirecta de la presencia de IP6 mediante el fósforo total es una extrapolación que arroja valores elevados de forma sistemática, puesto que todo el fósforo cuantificado se identifica como IP6.

35 Se ha descrito otro método indirecto para la determinación de la presencia de fitato en orina humana. Este método se basa en la hidrólisis del fitato y la determinación de la presencia de mioinositol, uno de los productos de la hidrólisis (Chromatographia 60, 265 –268; 2004). Se trata de un método que consume mucho tiempo (dos días por muestra) porque se debe realizar una hidrólisis ácida. Asimismo, la sensibilidad limitada y la falta de especificidad de la hidrólisis hacen que este método no sea aplicable a otras matrices biológicas ni a la cuantificación conjunta de las impurezas relacionadas.

40 A continuación, se citan otros documentos considerados antecedentes del estado de la técnica para la determinación de la presencia de IP6 en muestras biológicas (principalmente en orina):

45 En 2001, March y cols. describieron un método único para cuantificar inositol fosfatos en sangre, pero este método también es aplicable a orina y tejidos (J Chromatogr B 757, 247-255; 2001). Se trata de un método indirecto que consume mucho tiempo (tres días por muestra) basado en la hidrólisis enzimática del IP6 y la determinación de la presencia de la molécula de inositol (hidrolizado) mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Es un método sensible, aunque indirecto, basado en diversos principios de la presente invención, que en cualquier caso presenta una especificidad limitada, puesto que todos los inositol fosfatos se hidrolizan de forma inespecífica y todo el hidrolizado se cuantifica como IP6.

50 La fluorescencia ha sido un recurso ampliamente utilizado para la cuantificación del IP6, aunque su reducida sensibilidad solo permite aplicar esta técnica a alimentos y orina como muestras biológicas (Anal Chim Acta 605, 185-191; 2007).

Son métodos totalmente diferentes de la invención que se describe en el presente documento que, en cualquier caso, no permiten determinar las impurezas relacionadas y no son aplicables a otras matrices biológicas que no sean orina.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un método directo de cromatografía de líquidos para la cuantificación de moléculas químicamente complejas, entendiéndose, en el ámbito de la presente invención, que dichas moléculas tienen como mínimo dos grupos que contienen fósforo y un peso molecular de al menos 200. Estas moléculas complejas son altamente polares y presentan una carga elevada a causa de la presencia de diversos grupos ionizables. Además, en muchos casos, la ausencia de bandas de absorción en la región del espectro UV-visible hace que estas moléculas sean invisibles para las técnicas clásicas.

La identificación y cuantificación del compuesto diana se realiza mediante detección directa. En el ámbito de la presente invención, por detección directa se entiende la identificación/cuantificación del analito mediante una propiedad del compuesto (o sus iones o sales) "tal cual" o bien una propiedad del compuesto que forma un aducto (por ejemplo, pero no limitado, asociados iónicos, entre otros), metabolitos, preferiblemente metabolitos en fase II, de compuestos parentales, incluidos los fragmentos del analito principal en la detección de masa. Esta propiedad medida a través de detección directa puede ser, pero sin ser limitante, la detección de masa, conductividad, radiactividad (y, por tanto, el analito se puede radiomarcarse), RMN, siendo preferiblemente la detección de masa. Los inventores de la presente invención han descubierto que, cuando la masa de la molécula químicamente compleja es inferior a 200, la selectividad se ve comprometida a estos niveles a causa de la interferencia de diversos compuestos de las fases móviles y la atmósfera.

Además, la sensibilidad del método de la presente invención puede estar en el intervalo de 1 pmol, un valor que se encuentra en el intervalo alto de los métodos actualmente disponibles. Además, la combinación de la sensibilidad con la especificidad/selectividad del método de la presente invención permite aplicarlo a cualquier tipo de matriz biológica, así como cuantificar el analito principal junto con las impurezas relacionadas en el caso de aplicaciones de control de calidad de ingredientes activos farmacéuticos, alimentos medicinales, reactivos, aditivos alimentarios, compuestos farmacéuticos o nutraceúticos.

En la presente invención, "matriz biológica" se refiere a un entorno que puede o no ser aislado de un animal de sangre caliente. Algunos ejemplos no limitantes de matrices biológicas son: fluidos, tejidos, contenido estomacal, contenido intestinal, muestras de heces, cultivos celulares, orina, heces, sangre, suero, plasma, saliva, sudoración, fluidos hísticos, citoplasma celular, hepatocitos, microsomas, fracciones S9, tejidos, como tejido muscular, tejido hepático, tejido cardíaco, tejido renal y de otros entornos corporales, y/o matrices de un animal de sangre caliente, preferentemente un humano. Una matriz biológica se puede presentar en forma de solución o de sólido, o bien una forma que sea una mezcla de las mismas, y puede estar presente en un organismo vivo o ser parte de él, o se puede aislar de un organismo vivo de tal modo que constituya una muestra de dicho organismo. Los métodos que se describen en el presente documento proporcionan unos resultados excelentes, incluso cuando se trabaja con una matriz biológica que contiene niveles muy bajos de la molécula químicamente compleja, siendo preferiblemente aquellas concentraciones inferiores a 0,001 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ (para matrices sólidas) o $\mu\text{mol}/\text{l}$ (para matrices en otros estados físicos), más preferiblemente aquellas inferiores a 0,000001 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ o $\mu\text{mol}/\text{l}$, y aún más preferibles las comprendidas en el rango de 0,0000001 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ o $\mu\text{g}/\text{l}$. La matriz biológica puede ser un fluido biológico que, sin ser limitante, puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y combinaciones de las mismas, preferiblemente sangre o plasma. La matriz biológica también puede ser un tejido biológico que, puede ser sin limitarse, tejido pulmonar, hepático, renal, cardíaco, de vasos sanguíneos, cerebral, óseo, dérmico, muscular, nervioso, vascular, y combinaciones de los mismos, preferiblemente tejido cardíaco.

El método descrito en el presente documento, también es un método fiable para matrices biológicas de diversas especies, como por ejemplo y sin limitarse a, ratas, ratones, perros, monos, humanos, cerdos, cerdos enanos, conejos y cobayas.

Según un aspecto de la presente invención, se describe un método para la detección o cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, donde el compuesto detectado o cuantificado es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato seleccionado del grupo que contiene de 2 a 6 grupos fosfato, incluyendo iones o sales de los mismos, en donde el compuesto o los compuestos están dentro de una matriz biológica, en donde dicha matriz biológica es un fluido biológico seleccionado de la lista que consiste en sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y mezclas de los mismos, en donde el método para la detección y cuantificación directa comprende al menos las siguientes etapas:

i) preparación de, al menos una muestra estándar de la molécula químicamente compleja para ser detectada y cuantificada, ii) introducción de la muestra estándar en el flujo de un sistema disolvente, donde el sistema de disolvente consiste en una solución acuosa de una amina donde el pH del disolvente ha sido regulado entre 8 y 13,

iii) paso de la muestra y del sistema disolvente a través de al menos una columna donde la columna es una fase estacionaria de fase reversa siendo el tamaño de partícula entre 1,5-15 micrones y el tamaño del poro entre 60-500 Angstroms, al mismo tiempo que se mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm.

iv) identificación del tiempo de retención o cuantificación de la intensidad de la señal del momento en el que la molécula químicamente compleja se eluye mediante un detector de masa,

v) preparación de una muestra de la molécula químicamente compleja a partir de una matriz biológica que comprende la molécula químicamente compleja objeto de detección y cuantificación, donde el proceso para preparar la muestra comprende al menos la disolución total o parcial de la matriz biológica para formar una solución o suspensión y, si resulta necesario, el tratamiento de la solución o suspensión para eliminar las partículas que haya en suspensión,

vi) repetición de los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v), junto con el estándar o bien secuencialmente, y

vii) detección y cuantificación de la presencia de la molécula químicamente compleja mediante la comparación del tiempo de retención y intensidad de la señal de la muestra o muestras estándar, o bien mediante la comparación del tiempo de retención y intensidad de la señal obtenida de estudios anteriores o de la bibliografía existente,

donde el detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja es un espectrómetro de masas; un espectrómetro de masas en tándem o un cuadrupolo único; trabajando bajo cualquiera de los siguientes modos de operación: supervisión de iones seleccionados (SIM); supervisión de reacción múltiple (MRM); supervisión de la reacción seleccionada (SRM) y SCAN (negativo / positivo); o una combinación de ellos.

Otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el análisis de un ingrediente activo farmacéutico (API), alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o nutracéutico donde el API, alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o nutracéutico incluye al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, donde dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja se sustituye con al menos dos grupos -R, preferentemente un cicloalquilo C3-C7, donde dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, donde cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos sus iones y sales, donde este compuesto también se puede cuantificar junto con sus impurezas relacionadas, donde el método para el análisis comprende como mínimo las siguientes etapas:

i) preparación de al menos una muestra estándar, preferiblemente con una concentración conocida, o a partir de una concentración conocida, de la molécula químicamente compleja objeto de detección o cuantificación,

ii) introducción de la muestra estándar en el flujo de un sistema disolvente, donde el sistema disolvente es un disolvente polar o una mezcla de disolventes que comprende al menos un disolvente polar, donde el pH de al menos uno de los disolventes que componen el sistema disolvente preferiblemente se ha regulado entre 7 y 14,

iii) paso de la muestra y del sistema disolvente por al menos una columna cromatográfica donde la columna básicamente está llena de pequeñas partículas de una fase estacionaria, preferiblemente una fase estacionaria no polar, al mismo tiempo que se mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm,

iv) identificación del tiempo de retención y/o cuantificación de la intensidad de la señal del momento en el que la molécula químicamente compleja se eluye mediante un detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja,

v) preparación de una muestra de la molécula químicamente compleja a partir de un API, un alimento medicinal, un reactivo, un aditivo alimentario, un compuesto farmacéutico o un nutracéutico que comprende la molécula químicamente compleja objeto de detección y/o cuantificación, donde el proceso de preparar la muestra comprende al menos la disolución total o parcial del API, alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o nutracéutico para formar una solución o suspensión y, si resulta necesario, el tratamiento de la solución o suspensión para eliminar las partículas que haya en suspensión,

vi) repetición de los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v), junto con el estándar o bien secuencialmente,

vii) detección y/o cuantificación de la presencia de la molécula químicamente compleja mediante la comparación del tiempo de retención y/o intensidad de la señal de la muestra o muestras estándar, o bien mediante la comparación del tiempo de retención y/o intensidad de la señal obtenida de estudios anteriores o de la bibliografía existente.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método para la preparación de un fármaco, un alimento medicinal, un compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico nutracéutico, que comprende al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, donde dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja se sustituye con al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, donde dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, en el que cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos sus iones y sales del mismo, donde el fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico nutracéutico debe tener un porcentaje predeterminado de la molécula químicamente compleja, donde el proceso comprende: la obtención de un lote de un fármaco, un alimento medicinal, un compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico

nutraceútico; la medición del porcentaje de pureza de la molécula químicamente compleja del lote mediante un proceso que comprende el método de acuerdo con el segundo aspecto; e incluye al lote el fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico nutraceútico únicamente si su porcentaje de la molécula químicamente compleja medido cumple los requisitos o especificaciones predefinidas, siendo el resultado de la prueba normal, aplicada a contenido seco, superior al 60%, preferiblemente superior al 70%, y aún más preferible superior al 80%.

Otro aspecto de la presente invención, proporciona un proceso para la producción de un compuesto farmacéutico que comprende al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, donde dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja se sustituye por al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, donde dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, donde cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos iones y sales de los mismos, donde el proceso comprende esencialmente las mismas etapas de un proceso para la producción de un primer lote, siempre que después del análisis, mediante cualquier método del primer aspecto, de una muestra biológica aislada, preferiblemente una muestra de sangre o suero recogida de sujetos a los que se administraron los compuestos farmacéuticos obtenidos del primer lote, los valores calculados de AUC y C_{máx} cumplen los requisitos que se desean o son bioequivalentes a un fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o sustancia nutraceútica de referencia. "AUC" se refiere al área bajo la curva que representa la concentración de un compuesto, o de uno de sus metabolitos, en un fluido biológico de un paciente, como por ejemplo plasma o sangre, en función del tiempo tras la administración del compuesto al paciente. Por su parte, "C_{máx}" es la concentración máxima de un fármaco en el plasma o la sangre de un paciente tras la administración de una dosis del fármaco o forma de fármaco al paciente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se describen diversas realizaciones de la presente invención.

La molécula químicamente compleja puede ser un bifosfonato, hexametafosfato o un cicloalquilo C3-C7, donde dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, con la condición de que se seleccionen independientemente por lo menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂. El término "cicloalquilo C3-C7" hace referencia a un grupo alquilo cíclico saturado que cuenta con entre tres y siete átomos de carbono e incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. La molécula químicamente compleja preferiblemente es un cicloalquilo C6. Asimismo, la molécula químicamente compleja también puede ser un derivado de cicloalquilo. Se han logrado unos resultados excelentes cuando la molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato.

La molécula químicamente compleja puede estar radiomarcada.

La muestra estándar preparada en el paso (ii) puede ser un estándar de referencia, un estándar externo, un estándar interno o bien una adición de estándar, siendo esta última un estándar preparado por el método de adición de estándar, que también se describe más adelante.

El término "estándar de referencia", como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un compuesto que se puede utilizar para análisis tanto cuantitativos como cualitativos de un analito, que puede ser, sin limitar, un ingrediente activo farmacéutico. Por ejemplo, el tiempo de retención del compuesto en la cromatografía de líquidos (LC), que puede ser HPLC o UPLC, permite la fijación de un tiempo de retención relativo, lo que posibilita la realización de análisis cualitativos. La concentración del compuesto en la solución antes de la inyección en una columna de LC permite la comparación de las áreas situadas bajo los picos de un cromatograma de LC, lo que posibilita la realización de análisis cuantitativos.

El término estándar externo, como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una molécula químicamente compleja cuya concentración se conoce. Si se utiliza para determinar una concentración, preferiblemente se pueden añadir a la muestra de prueba estándares externos a una concentración conocida, técnica que se conoce como adición de estándar.

El término "estándar interno", como se utiliza en el presente documento, hace referencia a la sustancia que se añade a la muestra y que, posteriormente, se detecta y cuantifica en la muestra. La adición del estándar interno puede producirse antes, durante o después de la recogida o procesado de la muestra. El estándar interno, tal y como se concibe para la presente invención, es un compuesto que se añade a la muestra, y este compuesto similar se cuantifica con los métodos descritos en el presente documento.

El sistema disolvente comprende preferiblemente un disolvente orgánico polar. En la presente invención son de especial interés los sistemas disolventes que comprenden un disolvente orgánico polar hidromiscible. Los sistemas

disolventes preferibles incluyen acetonitrilo, metanol o mezclas de los mismos. Más preferible, el sistema disolvente incluye acetonitrilo.

5 Además, el sistema disolvente puede incluir agua. Uno de los sistemas disolventes más preferibles comprende, preferiblemente consiste esencialmente en, agua y acetonitrilo.

10 El sistema disolvente puede ser isocrático o gradiente. En una realización preferida, durante el paso (iii) la composición del sistema disolvente, esto es, el gradiente, se incrementa gradualmente, es decir, la fuerza de la fase móvil aumenta gradualmente. Preferiblemente, el sistema empieza con un elevado contenido de agua en el momento en el que la muestra y el sistema disolvente inician el paso por la columna y, entonces, el contenido de agua se reduce gradualmente durante la elución de la molécula químicamente compleja.

15 Opcionalmente, durante el paso (iii) la composición del sistema disolvente y, por consiguiente, la fuerza de la fase móvil, se mantienen esencialmente sin cambios.

En una realización particular, durante el paso (iii) el sistema disolvente comprende al menos un disolvente, en el que el pH de dicho disolvente se ha ajustado de 7 a 14, preferiblemente el pH del citado disolvente se ha ajustado de 8 a 13 y, de aún más preferiblemente, de 8,5 a 12.

20 Las personas expertas en la materia disponen de diversas técnicas para ajustar el pH. El pH se puede modificar con una sustancia capaz de alterar el pH, por lo general, un ácido, una base o una sal con propiedades ácidas o básicas, entre otras sustancias. Existen múltiples sustancias capaces de modificar el pH, como por ejemplo una amina, una base inorgánica, una sal de un ácido orgánico o cualquier mezcla de estas sustancias. Sin embargo, se prefiere el uso de una amina y, en particular, de trietilamina. La base inorgánica puede ser un hidróxido, preferiblemente KOH. Se puede utilizar como sal de un ácido orgánico, como, por ejemplo, acetato.

25 En una realización particular de la presente invención, antes de inyectar la muestra ya preparada en el equipo correspondiente, se realiza un control de pH adicional. Preferiblemente, el pH se ajusta al mismo valor de pH que la fase móvil. Se puede ajustar con un ácido, una base o una sal, preferiblemente una base amina y, aún más preferible dicha amina es trietilamina.

30 El término "columna cromatográfica", como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un tubo lleno de partículas adsorbentes que se utiliza para realizar la cromatografía. Para la presente invención son especialmente interesantes las columnas en las que las pequeñas partículas de una fase estacionaria no polar presentan una base de sílice, preferiblemente una base de gel de sílice. Se obtienen buenos resultados cuando las pequeñas partículas constituyen una fase estacionaria no polar, preferentemente con un base de gel de sílice y enlazadas de forma covalente a un grupo alquilo de cadena. El grupo alquilo de cadena puede ser un alquilo C₂-C₂₀, preferiblemente un alquilo C₈-C₁₈.

40 Las pequeñas partículas de una fase estacionaria no polar pueden presentar un tamaño medio de partícula de entre 0,5 y 20 micras, preferiblemente de entre 1,5 y 15 micras y, aún más preferible, de entre 5 y 10 micras.

45 El tamaño del poro puede oscilar entre 10 y 1000 Angstroms, preferiblemente entre 60 y 500 Angstroms y, aún más preferible entre 100 y 300 Angstroms.

50 La reproducibilidad del sistema aumenta y se consiguen otras ventajas cuando la temperatura de la columna durante el paso (iii) se mantiene esencialmente sin cambios. Por lo general, la temperatura de la columna durante el paso (iii) se mantiene esencialmente sin cambios en un intervalo que oscila entre 10 y 70°C. Preferiblemente, se mantiene esencialmente sin cambios en un intervalo que oscila entre 45 y 55°C y, aún más preferible, se mantiene esencialmente sin cambios a unos 50°C.

55 El término "detector" hace referencia a cualquier dispositivo, equipo, máquina, componente o sistema que puede detectar la molécula químicamente compleja. Los detectores pueden incluir o no hardware y software. En un detector de masa (espectrómetro de masas), el detector habitual incluye un analizador de masa y/o conectado a un analizador de este tipo. Algunos ejemplos de detectores capaces de detectar la elución de la molécula químicamente compleja son un espectrómetro de masas, un espectrómetro de masas en tándem (o triple cuadrupolo) o un cuadrupolo único.

60 Estos detectores de masa pueden operar en distintos modos de funcionamiento, entre otros, supervisión de iones seleccionados (SIM), supervisión de reacciones múltiples (MRM), supervisión de reacciones seleccionadas (SRM) y SCAN (negativo/positivo), o varios de ellos. También se puede utilizar un detector de radiactividad. Para el segundo aspecto de la presente invención, también se puede utilizar una conductimetría o un detector de RMN.

El uso de un detector de masa normalmente implica un paso adicional, a saber, un paso previo de cambio de fase e ionización de la molécula químicamente compleja entre la elución y la detección. El cambio de fase e ionización puede ser, sin limitar, una ionización química (APCI), una fotoionización a presión atmosférica (APPI) o una ionización por nebulización eléctrica (ESI) o nebulización térmica. La ionización por nebulización eléctrica (ESI) se puede realizar en una atmósfera de N₂ a una temperatura de entre 250 y 1000°C, preferiblemente entre 300 y 800°C y, aún más preferible, de entre 400 y 600°C.

Para el tratamiento previo de la muestra biológica, en el paso (v) puede ser necesario el uso de un agente precipitante de proteínas, preferiblemente ácido tricloroacético para el tratamiento previo de la muestra. Este tratamiento adicional permite simplificar la matriz biológica, de modo que aumenta la selectividad y la sensibilidad al reducir los efectos de matriz. El paso (v) también puede comprender el uso de un quelante para el tratamiento previo de la muestra, como por ejemplo EDTA. Estos quelantes reducen la concentración de calcio libre en la muestra biológica, de modo que se evita la formación de compuestos lábiles junto con el analito, lo que reduciría la recuperación y pondría en peligro la exactitud del método.

La matriz biológica también puede estar preconcentrada, incrementando así la sensibilidad del método.

Una realización de la presente invención es un método para la detección o cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, donde el compuesto es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato seleccionado del grupo que contiene de 2 a 6 grupos fosfatos, incluidos iones y sales de los mismos, donde el compuesto o compuestos están en una matriz biológica, donde dicha matriz biológica es un fluido biológico, seleccionado de la lista que consiste en: sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y combinaciones de los mismos, en el que el método comprende al menos una de las siguientes etapas:

- i) preparación de al menos una muestra estándar de la molécula químicamente compleja para ser detectada y cuantificada;
- ii) introducción de la muestra estándar en el flujo de un sistema disolvente, donde el sistema disolvente consiste en una solución acuosa de una amina, donde el pH del disolvente se ha ajustado a un valor de entre 8 y 13;
- iii) paso de la muestra y el sistema disolvente a través de al menos una columna donde la columna es una fase estacionaria de fase inversa, siendo el tamaño de partícula entre 1,5 y 15 micras, y un tamaño de poro de entre 60 y 500 Angstroms, mientras se mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm;
- iv) identificación del tiempo de retención y cuantificación de la intensidad de la señal del momento en el que la molécula químicamente compleja se eluye mediante un detector de masa;
- v) preparación de una muestra de la molécula químicamente compleja a partir de una matriz biológica que comprende la molécula químicamente compleja objeto de detección o cuantificación, donde el proceso de preparar la muestra comprende al menos la disolución total o parcial de la matriz biológica para formar una solución o suspensión y, si resulta necesario, el tratamiento de la solución o suspensión para eliminar las partículas que haya en suspensión;
- vi) repetición de los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v), junto con el estándar o bien secuencialmente; y
- vii) detección y cuantificación de la presencia de la molécula químicamente compleja mediante la comparación del tiempo de retención y la intensidad de la señal de estudios previos o de la literatura,

donde el detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja es un espectrómetro de masas; un espectrómetro de masas en tándem o un cuadrupolo único; trabajando bajo cualquiera de los siguientes modos de operación: supervisión de iones seleccionados (SIM); supervisión de reacción múltiple (MRM); supervisión de la reacción seleccionada (SRM) y SCAN (negativo / positivo); o una combinación de ellos.

En una realización particular de la presente invención, el método comprende además un paso previo de fase cambio e ionización de la molécula químicamente compleja entre la elución y la detección y en donde la fase de cambio y la ionización son la ionización química (APCI), la fotoionización de la presión atmosférica (APPI), la ionización por electrospray (ESI) o termospray.

En una realización particular de la presente invención, la matriz biológicamente a analizar es una muestra aislada de un ser humano que está bajo un estudio de bioequivalencia.

En una realización particular de la presente invención, el método se usa para detectar y cuantificar cualquiera de los metabolitos de un compuesto en un perfil metabólico.

Durante el tratamiento previo de la muestra, se puede incluir un paso para la separación de sólidos y líquidos, normalmente mediante centrifugado o filtrado, para eliminar cualquier partícula sólida que pueda haber aparecido durante el proceso. En este paso, es preferible controlar la temperatura en un valor entre 2 y 8°C durante el tratamiento previo de la muestra y, más preferiblemente a unos 4°C.

El método que se describe en el presente documento resulta de utilidad para el análisis de moléculas químicamente complejas. Un uso particular de los métodos que se describen en el presente documento es el análisis de matrices biológicas de seres humanos cuando el ser humano es objeto de un estudio de bioequivalencia. Otro uso particular de los métodos descritos en el presente documento es la determinación simultánea de las impurezas relacionadas de la molécula químicamente compleja, especialmente de IP6.

Tal como se usa en el presente documento, el término "perfil metabólico" comprende la identificación, semicuantificación y / o cuantificación de uno o más metabolitos derivados de un compuesto parental, en una matriz biológica, que consisten principalmente en fosforilación-desfosforilaciones metabólicas.

El término "perfil de impurezas" comprende la identificación, semicuantificación y / o cuantificación de una o más impurezas derivadas de un compuesto parental, principalmente impurezas relacionadas con la desfosforilación, en una formulación de un API, un alimento médico, un reactivo, un aditivo alimentario, una composición farmacéutica o nutracéutica.

En las siguientes cláusulas se describen otros aspectos y otras formas de realización de la presente invención:

Cláusula 1.- Método para la detección y/o cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, en el que el compuesto objeto de detección o cuantificación es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja se sustituye por al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, donde dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, en el que cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)2 o -P(O)(OH)2, con la condición de que al menos se seleccionen independientemente dos R de entre -P(O)(OH)2 y -OP(O)(OH)2, incluidos sus iones y sales, donde el compuesto o compuestos objeto de detección y/o cuantificación forman parte de una matriz biológica, donde dicha matriz biológica es un fluido biológico, un tejido biológico, contenido estomacal, contenido intestinal, una muestra de heces o un cultivo celular, y en el que el método para la detección y/o cuantificación directa conlleva como mínimo los pasos siguientes:

i) preparación de al menos una muestra estándar, preferiblemente con una concentración conocida, o a partir de una concentración conocida, de la molécula químicamente compleja objeto de detección y/o cuantificación;

ii) introducción de la muestra estándar en el flujo de un sistema disolvente, donde el sistema disolvente es un disolvente polar o una mezcla de disolventes que comprende al menos un disolvente polar, en el que, preferiblemente, el pH de al menos uno de los disolventes que componen el sistema disolvente se ha ajustado a un valor de entre 7 y 14;

iii) paso de la muestra y del sistema disolvente al menos por una columna, donde la columna básicamente está llena de pequeñas partículas de una fase estacionaria, preferiblemente una fase estacionaria no polar, al mismo tiempo que se mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm;

iv) identificación del tiempo de retención y/o cuantificación de la intensidad de la señal del momento en el que la molécula químicamente compleja se eluye mediante un detector de masa o radiactividad;

v) preparación de una muestra de la molécula químicamente compleja a partir de una matriz biológica que comprende la molécula químicamente compleja objeto de detección y/o cuantificación, donde el proceso de preparar la muestra comprende al menos la disolución total o parcial de la matriz biológica para formar una solución o suspensión y, si resulta necesario, el tratamiento de la solución o suspensión para eliminar las partículas que haya en suspensión;

vi) repetición de los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v), junto con el estándar o bien secuencialmente;

vii) detección y/o cuantificación de la presencia de la molécula químicamente compleja mediante la comparación del tiempo de retención y/o intensidad de la señal de la muestra o muestras estándar, o bien mediante la comparación del tiempo de retención y/o intensidad de la señal obtenida de estudios anteriores o de la bibliografía existente.

Cláusula 2.- El método acuerdo con la cláusula anterior, donde la molécula químicamente compleja es un bifosfonato, hexametáfosfato, nucleótido o cicloalquilo C3-C7, en el que dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R.

Cláusula 3.- El método acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que la molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato, seleccionado del grupo que contiene entre 2 y 6 grupos de fosfato.

Cláusula 4.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que la muestra estándar preparada en el paso (ii) es un estándar de referencia, estándar externo, estándar interno o adición de estándar.

Cláusula 5.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el sistema disolvente comprende un disolvente orgánico polar hidromiscible.

Cláusula 6.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que durante el paso (iii) la composición del sistema disolvente se incrementa gradualmente, es decir, la fuerza de la fase móvil aumenta gradualmente.

- 5 Cláusula 7.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas de la 1 a la 5, en el que durante el paso (iii) la composición del sistema disolvente, es decir, la fuerza de la fase móvil, se mantiene esencialmente sin cambios.

10 Cláusula 8.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el sistema disolvente incluye agua, y el pH del agua se ha ajustado a un valor de entre 7 y 14, preferiblemente de 8 a 13 y, más preferiblemente de 8,5 a 12, con una sustancia capaz de modificar el pH, donde la sustancia capaz de modificar el pH es preferentemente una amina, una base inorgánica, una sal de un ácido orgánico, o cualquier combinación de estas sustancias, más preferiblemente una amina y/o NH₃, una sal de un ácido orgánico o un hidróxido y, aún más preferible, trietilamina y/o NH₃.

- 15 Cláusula 9.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, que además comprende al menos un paso adicional de control del pH, preferiblemente durante el tratamiento previo de la muestra antes de la inyección en el equipo.

20 Cláusula 10.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que las partículas pequeñas de una fase estacionaria no polar presentan una base de gel de sílice y están enlazadas de forma covalente a un grupo alquilo de cadena, donde el grupo alquilo de cadena es preferiblemente un alquilo C₂-C₂₀ y, de forma todavía más preferible, un alquilo C₈-C₁₈.

25 Cláusula 11.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja es un espectrómetro de masas, un espectrómetro de masas en tándem (o triple cuadrupolo) o un cuadrupolo único, que opera en cualquiera de los modos de funcionamiento siguientes: supervisión de iones seleccionados (SIM), supervisión de reacciones múltiples (MRM), supervisión de reacciones seleccionadas (SRM) y SCAN (negativo/positivo), o una combinación de ellos.

- 30 Cláusula 12.- El método de acuerdo con la cláusula anterior, que además comprende un paso previo de cambio de fase e ionización de la molécula químicamente compleja entre la elución y la detección.

35 Cláusula 13.- El método de acuerdo con la cláusula anterior, en el que el cambio de fase y la ionización corresponden a ionización química (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización por nebulización eléctrica (ESI) o nebulización térmica.

40 Cláusula 14.- El método de acuerdo con la cláusula anterior, en el que la ionización por nebulización eléctrica (ESI) se realiza en una atmósfera de N₂ a una temperatura de entre 250 y 1000°C, preferiblemente de entre 300 y 800°C y, aún más preferible entre 400 y 600°C.

Cláusula 15.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el paso (v) también comprende el uso de un agente precipitante de proteínas, preferiblemente ácido tricloroacético para el tratamiento previo de la muestra.

45 Cláusula 16.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el paso (v) también comprende el uso de un quelante para el tratamiento previo de la muestra, preferiblemente EDTA o sus sales, o cualquier mezcla de las mismas.

50 Cláusula 17.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que la matriz biológica está preconcentrada.

Cláusula 18.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores que, además, incluye una etapa para la separación de sólidos y líquidos durante el tratamiento previo de la muestra.

55 Cláusula 19.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que la matriz biológica es un fluido biológico, preferiblemente seleccionado de la lista que consiste en: sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y mezclas de las mismas, preferiblemente sangre o plasma.

60 Cláusula 20.- El método de acuerdo con las cláusulas de la 1 a la 18, en el que la matriz biológica es un tejido biológico, preferiblemente se selecciona de la lista que consiste en: tejido pulmonar, renal, cardíaco, cerebral, hepático, de vasos sanguíneos, óseo, dérmico, muscular, nervioso, vascular, y mezclas de dichos tejidos, preferiblemente tejido cardíaco.

Cláusula 21.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que la matriz biológica que se va a analizar es una muestra aislada de un ser humano objeto de un estudio de bioequivalencia.

5 Clausula 23.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, donde se usa una matriz sustituta para preparar la curva de calibración, preferiblemente la matriz utilizada, está formada por albúmina de suero bovino.

Clausula 24.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, cuando se utiliza para detectar y cuantificar cualquiera de los metabolitos de un compuesto en un perfil metabólico.

10 Cláusula 25.- El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el compuesto está radiomarcado.

15 Cláusula 26.- Método para el análisis de un ingrediente activo farmacéutico, alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o nutraceútica, donde el ingrediente activo farmacéutico, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o nutraceútico comprende al menos un compuesto con un peso molecular de como mínimo 200, donde dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, donde dicha molécula químicamente compleja se sustituye por al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, en el que dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, en el que cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos sus iones y sales de las mismas, este compuesto también se puede cuantificar junto a sus impurezas relacionadas y donde el método para el análisis comprende al menos una de las siguientes etapas:

20 i) preparación de al menos una muestra estándar, preferiblemente con una concentración conocida, o a partir de una concentración conocida, de la molécula químicamente compleja objeto de detección y/o cuantificación;

25 ii) introducción de la muestra estándar en el flujo de un sistema disolvente, donde el sistema disolvente es un disolvente polar o una mezcla de disolventes que comprende al menos un disolvente polar, en el que preferiblemente el pH de al menos un disolvente que componen el sistema disolvente se ha ajustado;

30 iii) paso de la muestra y del sistema disolvente por al menos una columna, donde la columna básicamente está llena de pequeñas partículas de una fase estacionaria, preferiblemente una fase estacionaria no polar, al mismo tiempo que se mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm;

iv) identificación del tiempo de retención y/o cuantificación de la intensidad de la señal del momento en el que la molécula químicamente compleja se eluye mediante un detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja;

35 v) preparación de un muestra de la molécula químicamente compleja a partir de un ingrediente activo farmacéutico, alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o nutraceútico que comprende la molécula químicamente compleja objeto de detección y/o cuantificación, cuyo proceso de preparar la muestra comprende al menos la disolución total o parcial del ingrediente activo farmacéutico, compuesto farmacéutico o nutraceútico para formar una solución o suspensión y, si resulta necesario, el tratamiento de la solución o suspensión para eliminar las partículas que haya en suspensión;

40 vi) repetición de los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v), junto con el estándar o bien secuencialmente;

vii) detección y/o cuantificación de la presencia de la molécula químicamente compleja mediante la comparación del tiempo de retención y/o la intensidad de la señal de la muestra o muestras estándar.

45 Clausula 27.- El método de acuerdo a la cláusula anterior, cuando se utiliza para detectar y cuantificar cualquiera de las impurezas de un compuesto en un perfil de impurezas.

50 Cláusula 28.- Un proceso para la preparación de un fármaco, alimento medicinal, reactivo, aditivo alimentario, compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico nutraceútico que comprende al menos un compuesto con un peso molecular de como mínimo 200, en el que dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, en el que la citada molécula químicamente compleja se sustituye por al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, en el que dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, en el que cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos los iones y sales de los mismos, en el que el fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o nutraceútico debe tener un porcentaje predeterminado de la molécula químicamente compleja, en el que el proceso comprende: la obtención de un lote de un fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o compuesto farmacéutico nutraceútico; la medición del porcentaje de pureza de la molécula químicamente compleja del lote mediante un proceso que comprende el método de conformidad con la cláusula anterior; y la inclusión del lote del fármaco, alimento medicinal, compuesto farmacéutico o nutraceútico únicamente si su porcentaje de la molécula químicamente compleja medido de este modo cumple los requisitos o especificaciones, preferiblemente un porcentaje superior al 70% por peso y, de forma todavía más preferible, superior al 80% por peso (correspondiente a contenido seco).

Cláusula 29.- Un proceso para la producción de un compuesto farmacéutico que comprende al menos un compuesto con un peso molecular de como mínimo 200, en el que dicho compuesto es una molécula químicamente compleja, en el que la citada molécula químicamente compleja se sustituye por al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, en el que dicho cicloalquilo C3-C7 se sustituye por al menos dos grupos -R, en el que cada grupo R corresponde independientemente a -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que se seleccionen independientemente al menos dos R de entre -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluidos los iones y sales de los mismos, en el que el proceso comprende esencialmente los mismos pasos de proceso de un proceso para la producción de un primer lote, siempre que después del análisis, mediante cualquier método de las cláusulas de la 1 a la 22, de una muestra biológica aislada, preferiblemente una muestra de sangre o suero recogida de sujetos a los que se administraron los compuestos farmacéuticos obtenidos del primer lote, los valores calculados de AUC y C_{máx} cumplen los requisitos que se desean o son bioequivalentes a un fármaco de referencia.

Clausula 30.- Perfil metabólico de un compuesto con un peso molecular de al menos 200, en donde el compuesto a ser detectada y/o cuantificada es una molécula químicamente compleja, en donde dicha molécula químicamente compleja está sustituida con al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, en donde dicho cicloalquilo C3-C7 está sustituido con al menos dos grupos -R, en donde cada grupo R corresponde independientemente -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que al menos dos R se seleccionen independientemente de -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluyendo iones o sales del mismo, en donde el compuesto o compuestos están dentro de una matriz biológica, en donde dicha matriz biológica es un fluido biológico, tejido biológico, contenido del estómago, contenido del intestino, muestra de heces o células de cultivo.

Clausula 31.- Perfil de impurezas de un compuesto con un peso molecular de al menos 200, en donde el compuesto a ser detectada y/o cuantificada es una molécula químicamente compleja, en donde dicha molécula químicamente compleja está sustituida con al menos dos grupos -R, preferiblemente un cicloalquilo C3-C7, en donde dicho cicloalquilo C3-C7 está sustituido con al menos dos grupos -R, en donde cada grupo R corresponde independientemente -OH, -OP(O)(OH)₂ o -P(O)(OH)₂, con la condición de que al menos dos R se seleccionen independientemente de -P(O)(OH)₂ y -OP(O)(OH)₂, incluyendo iones o sales del mismo, en donde el compuesto o compuestos están presentes en una formulación de un API, un alimento médico, un reactivo, un aditivo alimentario, una composición farmacéutica o nutracéutica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma UPLC®-MS obtenido para IP6 en plasma de rata tras la cromatografía de fase inversa de elución en gradiente del ejemplo 1.

Figura 2. Cromatograma HPLC-MS obtenido para IP6 en orina de rata tras la cromatografía de fase inversa de elución en gradiente del ejemplo 4.

Figura 3. Cromatograma típico de una muestra de un ingrediente activo farmacéutico (detalle en el caso de la muestra) del ejemplo 8 (perfil de impurezas). Figura 3a: En blanco. Figura 3b: Muestra (P: Fosfato; IP6: Inositol hexafosfato; 1, 2, 3 y 4: Impurezas relacionadas).

Figura 4. Cromatograma típico de ATP para una muestra de plasma de rata (ejemplo 9).

Figura 5. Cromatograma típico de IP3 para una muestra de plasma de rata (ejemplo 10).

Figura 6. Cromatograma típico de IP6 en orina humana (Ejemplo 11).

Figura 7. Cromatograma típico de IP6 usando una solución de 30 mg de BSA (albúmina de suero bovino) / mL en PBS como una matriz sustituta para plasma o suero (Ejemplo 12).

Figura 8. Cromatograma típico de las impurezas presentes en una solución de ácido fítico: IP5, IP4, IP3 y m / z 779(Ejemplo 13).

Figura 9. Cromatograma típico de metabolitos del ácido fítico m/z 779, m/z 740 y m/z 579 después de la incubación de ácido fítico en hepatocitos de rata (Ejemplo 14).

Figura 10. Cromatograma típico de metabolitos del ácido fítico m/z 499, m/z 419, m/z 339 y m/z 259 después de la incubación de ácido fítico en hepatocitos de rata (Ejemplo 14).

Figura 11. Cromatograma típico de ácido fítico después de la incubación de ácido fítico en hepatocitos de rata (Ejemplo 14).

Figura 12. Cromatograma típico de IP5 en plasma de rata (Ejemplo 15).

Figura 13. Cromatograma típico de metabolitos del ácido fítico (perfil metabólico) en plasma de rata (Ejemplo 16).

Figura 14. Cromatograma típico de metabolitos del ácido fítico (perfil metabólico) en plasma de perro (Ejemplo 17).

Figura 15. Cromatograma típico de una muestra de API, que muestra los picos correspondientes para el ácido fítico y sus correspondientes impurezas (perfil de impurezas) (Ejemplo 18).

Los ejemplos siguientes muestran la invención como se describe en el presente documento y no limitan en ningún caso el alcance de la invención que se recoge en las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Determinación de la presencia de IP6 en muestras de plasma de rata

La muestra de plasma se sometió a purificación y extracción del compuesto mediante precipitación proteínica con TCA en presencia de un quelante (EDTA). El sobrenadante se diluyó con trietilamina acetato (TEAA) y se inyectaron 20 µL en el sistema UPLC®-MS.

La ionización de ácido fítico se evaluó con espectrometría de masas con ionización por nebulización eléctrica negativa (ESI-MS).

Se realizó un análisis cuantitativo mediante espectrometría de masas en el modo de supervisión de iones seleccionados (SIM).

El compuesto se analizó mediante cromatografía de fase inversa de elución en gradiente con TEAA en solución acuosa y acetonitrilo como fase móvil. El tiempo de retención del analito en condiciones cromatográficas optimizadas fue de 3,42 minutos (véase la Figura 1 del cromatograma).

Ejemplo 2. Determinación de la presencia de IP6 en muestras de plasma canino

El procedimiento bioanalítico desarrollado en el ejemplo 1 se validó nuevamente en muestras de plasma canino con una evaluación completa de la linealidad, exactitud y precisión. La curva de calibración se desarrolló mediante la inyección de 20 µl de muestras de plasma en blanco a las que se añadió una cantidad conocida de IP6. Se consiguió una exactitud inferior al 10% y una precisión inferior al 15% con concentraciones intermedias, por lo que se trata de un método bioanalítico excelente.

Ejemplo 3. Determinación de la presencia de IP6 en muestras de plasma humano

El procedimiento bioanalítico desarrollado en el ejemplo 1 se aplicó a muestras de plasma humano, pero se doblaron las cantidades de ácido tricloroacético (TCA), matriz y quelante. El tiempo de retención del analito en condiciones cromatográficas optimizadas fue de 4,05 minutos.

Ejemplo 4. Determinación de la presencia de IP6 en muestras de orina de rata

El procedimiento bioanalítico implicó una extracción del compuesto mediante la dilución de la orina de rata en presencia de un quelante (EDTA), y no se requirió el uso de ningún agente precipitante. El sobrenadante se diluyó con trietilamina acetato (TEAA) y se inyectaron 50 µL en el sistema HPLC-MS.

La ionización de ácido fítico se evaluó con espectrometría de masas con ionización por nebulización eléctrica negativa (ESI-MS). Se realizó un análisis cuantitativo mediante espectrometría de masas en el modo de supervisión de iones seleccionados (SIM).

El compuesto se analizó mediante cromatografía de fase inversa de elución en gradiente con TEAA en solución acuosa y acetonitrilo como fase móvil. El tiempo de retención del analito en condiciones cromatográficas optimizadas fue de ~3,99 minutos (véase la Figura 3 del cromatograma).

Ejemplo 5. Determinación de la presencia de IP6 en formulaciones

Se ha identificado y cuantificado IP6 en formulaciones (soluciones) del ingrediente activo farmacéutico. En este ejemplo, sin cuantificación simultánea de impurezas relacionadas. El medio de la solución estuvo formado por agua, un 0,9% de NaCl u otras soluciones acuosas como vehículo.

La determinación y cuantificación de IP6 se realizó mediante el mismo procedimiento del ejemplo 1, sin ningún tratamiento previo de la muestra aparte de la dilución de la formulación para que se ajustara al rango de la curva de calibración.

- 5 El método analítico validado también se utilizó para evaluar la estabilidad, así como la homogeneidad del IP6 en formulaciones no filtradas. Se demostró la linealidad y especificidad del método.

Ejemplo 6. Determinación de la presencia de IP6 en cultivos celulares de hepatocitos

- 10 El método descrito en el ejemplo 1 se aplicó correctamente a cultivos celulares de hepatocitos. El estudio de la inyección de diversos cultivos celulares con una cantidad conocida de IP6 en el HPLC-MS mostró que el método era fiable para este tipo de matriz.

Ejemplo 7. Determinación de la presencia de IP6 en muestras de plasma porcino

- 15 El procedimiento bioanalítico desarrollado en el ejemplo 1 se aplicó a muestras de plasma porcino. La curva de calibración se desarrolló mediante la inyección de 50 µl de muestras de plasma en blanco a las que se añadió una cantidad conocida de IP6. Se consiguió una exactitud y una precisión inferiores al 15%, por lo que se trata de un método bioanalítico excelente.

Ejemplo 8. Determinación de la presencia de IP6 e impurezas relacionadas en formulaciones

- 20 Se ha identificado y cuantificado IP6 en formulaciones (soluciones) del ingrediente activo farmacéutico. En este ejemplo, se realizó una determinación simultánea de la presencia de impurezas relacionadas, lo que permitió el cálculo de la pureza cromatográfica del ingrediente activo farmacéutico.

25 Para la determinación y cuantificación de IP6 se utilizó hidróxido de potasio como fase móvil. Como alternativa también se puede utilizar hidróxido de sodio y se recomienda encarecidamente la adición de pequeñas proporciones de isopropanol.

- 30 La columna empleada fue un polímero divinilbenceno de intercambio aniónico. El caudal se mantuvo a 1 mL/min con una temperatura de 35°C.

- 35 Se obtuvo una mejor sensibilidad, en especial para impurezas, al utilizar la supresión iónica química o electroquímica.

- 40 El tiempo de retención del ácido fítico fue de 24,6 minutos (véase la Figura 4). La identidad del IP6 se confirmaba si el tiempo de retención del pico principal de la muestra de la prueba estaba en un intervalo de $\pm 0,5$ minutos del tiempo de retención medio del pico correspondiente a fitato para todas las inyecciones del estándar de trabajo de la prueba. Esta técnica permite la determinación simultánea del ingrediente activo farmacéutico junto con sus impurezas relacionadas en una única serie cromatográfica.

Ejemplo 9. Determinación de la presencia de ATP (adenosín trifosfato) en muestras de plasma de rata

- 45 El procedimiento bioanalítico desarrollado en el ejemplo 1 se aplicó a muestras de plasma de rata, pero se cambió la masa supervisada en el modo SIM por el peso molecular (M-1) del ATP. La curva de calibración se desarrolló mediante la inyección de 50 µl de muestras de plasma en blanco a las que se añadió una cantidad conocida de ATP. El tiempo de retención del ATP fue de 3,96 minutos. En la Figura 4 se muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

- 50 **Ejemplo 10. Determinación de la presencia de IP3 (inositol trifosfato) en muestras de plasma de rata**

- 55 El procedimiento bioanalítico desarrollado en el ejemplo 1 se aplicó a muestras de plasma de rata, pero se cambió la masa supervisada en el modo SIM por el peso molecular (M-1) del IP3. La curva de calibración se desarrolló mediante la inyección de 50 µl de muestras de plasma en blanco a las que se añadió una cantidad conocida de IP3. El tiempo de retención del IP3 fue de 2,62 minutos. En la Figura 5 se muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

- 60 **Ejemplo 11. Determinación de IP6 (hexafosfato de inositol) en plasma humano, de rata y de perro y en humano y de rata orina (modo MRM)**

El método bioanalítico desarrollado en el Ejemplo 1 y utilizado en el Ejemplo 1-10 se transfirió al modo MRM en un sistema UPLC®-MS/MS. El uso de este modo MRM dio lugar a un aumento de la sensibilidad analítica, así como a mejora de la selectividad.

Se utilizó el mismo procedimiento de extracción. Las condiciones cromatográficas también se basaron en la misma teoría. La transición de masa obtenida después de la disociación inducida por colisión y utilizada con fines cuantitativos de IP6 fue m/z 659,0 > m/z 560,9. La figura 6 muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

Ejemplo 12. Determinación de IP6 en una matriz sustituta (matriz sustituta de suero o plasma)

El procedimiento bioanalítico desarrollado en el Ejemplo 11, se aplicó en una matriz sustituta. En una situación particular (por ejemplo, se esperan niveles constitutivos del analito en la matriz en blanco) se podría utilizar una matriz sustituta para preparar la curva de calibración y cuantificación de IP6 en muestras biológicas.

Un efecto de matriz similar, así como la misma recuperación de extracción entre matriz sustituta y matriz biológica se observó que resultó en un comportamiento idéntico en el sistema UPLC®-MS/MS. Como matriz sustituta para plasma o suero, se utilizó una solución de 30 mg de BSA (albúmina de suero bovino) / ml en PBS. Esta modificación da una mayor sensibilidad y evita el uso de matrices biológicas naturales para construir la curva de calibración. La figura 7 muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

Ejemplo 13. Determinación de IP6 y las impurezas relacionadas en las formulaciones (modo SCAN)

El método cromatográfico desarrollado para la determinación de ácido fítico permitió determinar algunas impurezas presentes en una solución de ácido fítico, todas las impurezas detectadas (IP3, IP4, IP5 y m/z 779) se coeluyen con el pico de ácido fítico; sin embargo, fueron detectados debido a su diferente peso molecular. IP5 fue la impureza más abundante.

La figura 8 muestra un cromatograma obtenido para este ejemplo

Ejemplo 14. Determinación de IP6 y metabolitos relacionados en hepatocitos de rata (modo SCAN)

El ácido fítico y sus metabolitos se detectaron después de la incubación del ácido fítico en hepatocitos de rata. El paso de purificación implicó una dilución de los pellets con medio KHB después de la precipitación con EDTA y, finalmente, una dilución con TEAA.

Solo IP1 e IP2 se eluyeron con diferencias significativas en el tiempo de retención en relación con el ácido fítico.

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran cromatogramas típicos de ácido fítico y sus metabolitos después de la incubación de ácido fítico en hepatocitos de rata.

Ejemplo 15. Determinación de IP5 en muestras de plasma de perros y ratas (modo SIM)

El procedimiento bioanalítico desarrollado en el Ejemplo 1, se aplicó en la determinación de IP5 en plasma de perros y ratas.

Se detectó IP5 en el modo SIM utilizando el peso molecular (M-1) de IP5. El tiempo de retención para IP5 fue de 4,10 min.

La figura 12 muestra un cromatograma típico obtenido para IP5 en plasma de rata.

Ejemplo 16. Determinación de metabolitos de ácido fítico en muestras de plasma de rata (modo SIM)

El procedimiento bioanalítico desarrollado para la determinación de ácido fítico se aplicó a muestras de plasma de rata para detectar el máximo número de metabolitos.

Los metabolitos se detectaron primero en el modo SCAN y luego se confirmaron y se semicuantificaron mediante el modo SIM. Se pueden realizar mediciones cuantitativas obteniendo (es decir, sintetizando) los metabolitos correspondientes para preparar estándares. La figura 13 muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

Ejemplo 17. Determinación de metabolitos del ácido fítico en muestras de plasma de perro (modo SIM)

El procedimiento bioanalítico desarrollado para la determinación de ácido fítico se aplicó a muestras de plasma de perro para detectar el máximo número de metabolitos. Los metabolitos se detectaron por primera vez en el modo SCAN y luego confirmado y semi-cuantificado por el modo SIM. Se pueden realizar mediciones cuantitativas obteniendo (es decir, sintetizando) los metabolitos correspondientes para preparar los estándares.

La figura 14 muestra un cromatograma típico obtenido con estas muestras.

Ejemplo 18. Determinación de ácido fítico (identidad, ensayo) e impurezas relacionadas en formulaciones para control de calidad de un API, un alimento médico, un reactivo, un aditivo alimentario, una composición farmacéutica o nutracéutico

El ácido fítico y las impurezas relacionadas se han identificado y cuantificado en formulaciones en solución acuosa. Este método permite el cálculo del ensayo y la pureza cromatográfica del ácido fítico.

La determinación y cuantificación del ácido fítico se llevó a cabo mediante cromatografía de iones con derivatización post-columna por detección UV.

La columna de cromatografía iónica utilizada fue un poliestireno al 2% reticulado con polímero de divinilbenceno. El caudal se mantuvo a 1 ml / min, estableciendo una temperatura de columna de 35°C.

La sensibilidad adecuada para los compuestos relacionados con el ácido fítico se obtuvo mediante el uso de derivatización post-columna y detección UV.

El tiempo de retención para el ácido fítico fue de 48,06 minutos (ver Figura 15). La identidad del fítico se confirma cuando el tiempo de retención del pico principal en la muestra de ensayo está dentro de $\pm 0,5$ minutos del tiempo de retención promedio del pico correspondiente al ácido fítico para todas las inyecciones del estándar de trabajo del ensayo.

Esta técnica analítica permite la determinación simultánea de ácido fítico junto con sus impurezas relacionadas (hasta treinta y cinco) en un solo análisis cromatográfico para el control de calidad de un API, un alimento médico, un reactivo, un aditivo alimentario, una composición farmacéutica o nutracéutica.

Basado en asignaciones tentativas de comparación de los tiempos de retención relativos de las impurezas formadas con el método de la literatura, las principales impurezas formadas se identifican como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Asignaciones de picos de impurezas tentativas para muestras degradadas

Pico	Tiempo de retención	RRT
DL-Ins(1,5,6)P3	17,400	0,36
---	21,533	0,45
---	22,467	0,47
DL-Ins(1,2,4,6)P4+Ins(1,2,3,5)P4	23,709	0,49
DL-Ins(1,2,3,4)P4+Ins(1,3,4,6)P4	24,733	0,51
DL-Ins(1,2,4,5)P4	24,967	0,52
DL-Ins(1,2,4,5)P4	27,233	0,57
DL-Ins(1,2,5,6)P4	28,067	0,58
Ins(2,4,5,6)P4	30,433	0,63
	31,267	0,65
	32,067	0,67
	32,333	0,67
DL-Ins(1,4,5,6)P4	33,467	0,70
Ins(1,2,3,4,6)P5	36,100	0,75
DL-Ins(1,2,3,4,5)P5	36,933	0,77
DL-Ins(1,2,4,5,6)P5	40,867	0,85
	41,100	0,86
Ins(1,3,4,5,6)P5	42,067	0,88
	42,300	0,88
Ácido fítico	48,067	1,00

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección y cuantificación directa de al menos un compuesto con un peso molecular de al menos 200, en donde el compuesto es una molécula químicamente compleja, en donde dicha molécula químicamente compleja es un inositol polifosfato seleccionado del grupo que contiene de 2 a 6 grupos fosfato, incluidos iones o sales de los mismos, en donde el compuesto o compuestos están dentro de una matriz biológica, en donde dicha matriz biológica es un fluido seleccionado de la lista que consiste en sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y mezclas de los mismos, en donde el método comprende al menos las siguientes etapas:
- 5 i) preparar al menos una muestra estándar de la molécula químicamente compleja para ser detectada y cuantificada;
 - 10 ii) introducción de la muestra estándar en la corriente de un sistema disolvente; en donde el sistema disolvente consiste en una solución acuosa de una amina; en donde el pH del disolvente ha sido ajustado, entre 8 y 13;
 - 15 iii) pasar la muestra y el sistema disolvente a través de al menos una columna en la que la columna es una fase estacionaria de fase inversa, siendo el tamaño de partícula entre 1,5-15 micrones y el tamaño de poro entre 60-500 Angstroms, mientras mantiene la presión del sistema entre 5 y 1500 atm;
 - 20 iv) identificar el tiempo de retención y cuantificar la intensidad de la señal de cuándo la molécula químicamente compleja se eluye, mediante un detector de masas;
 - 25 v) preparar una muestra de la molécula químicamente compleja a partir de una matriz biológica que comprende la molécula químicamente compleja para ser detectar y cuantificar, en donde el proceso para preparar la muestra comprende al menos disolver total o parcialmente la matriz biológica para formar una solución o una suspensión y, si es necesario, tratar la solución o la suspensión para eliminar partículas en suspensión;
 - vi) repetir los pasos (ii) y (iii) con la muestra preparada en el paso (v); juntos o secuencialmente con el estándar; y
 - vii) detectar y cuantificar la presencia de la molécula químicamente compleja por comparación del tiempo de retención e intensidad de la señal de la muestra estándar o las muestras estándar, o por comparación del tiempo de retención e intensidad de la señal obtenida de estudios previos o de la literatura,
- 30 donde el detector capaz de detectar la elución de la molécula químicamente compleja es un espectrómetro de masas; un espectrómetro de masas en tándem o un cuadrupolo único; trabajando bajo cualquiera de los siguientes modos de operación: supervisión de iones seleccionados (SIM); supervisión de reacción múltiple (MRM); supervisión de la reacción seleccionada (SRM) y SCAN (negativo / positivo); o una combinación de ellos.
- 35 2. El método según la reivindicación 1, que además comprende una etapa previa de cambio de fase e ionización de la molécula químicamente compleja entre la elución y la detección y en donde el cambio de fase y la ionización es ionización química (APCI), fotoionización de la presión atmosférica (APPI), ionización por electrospray (ESI) o termospray.
- 40 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la matriz biológicamente a analizar es una muestra aislada de un ser humano que está bajo un estudio de bioequivalencia.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuando se usa para detectar y cuantificar cualquiera de los metabolitos de un compuesto en un perfil metabólico.
- 45

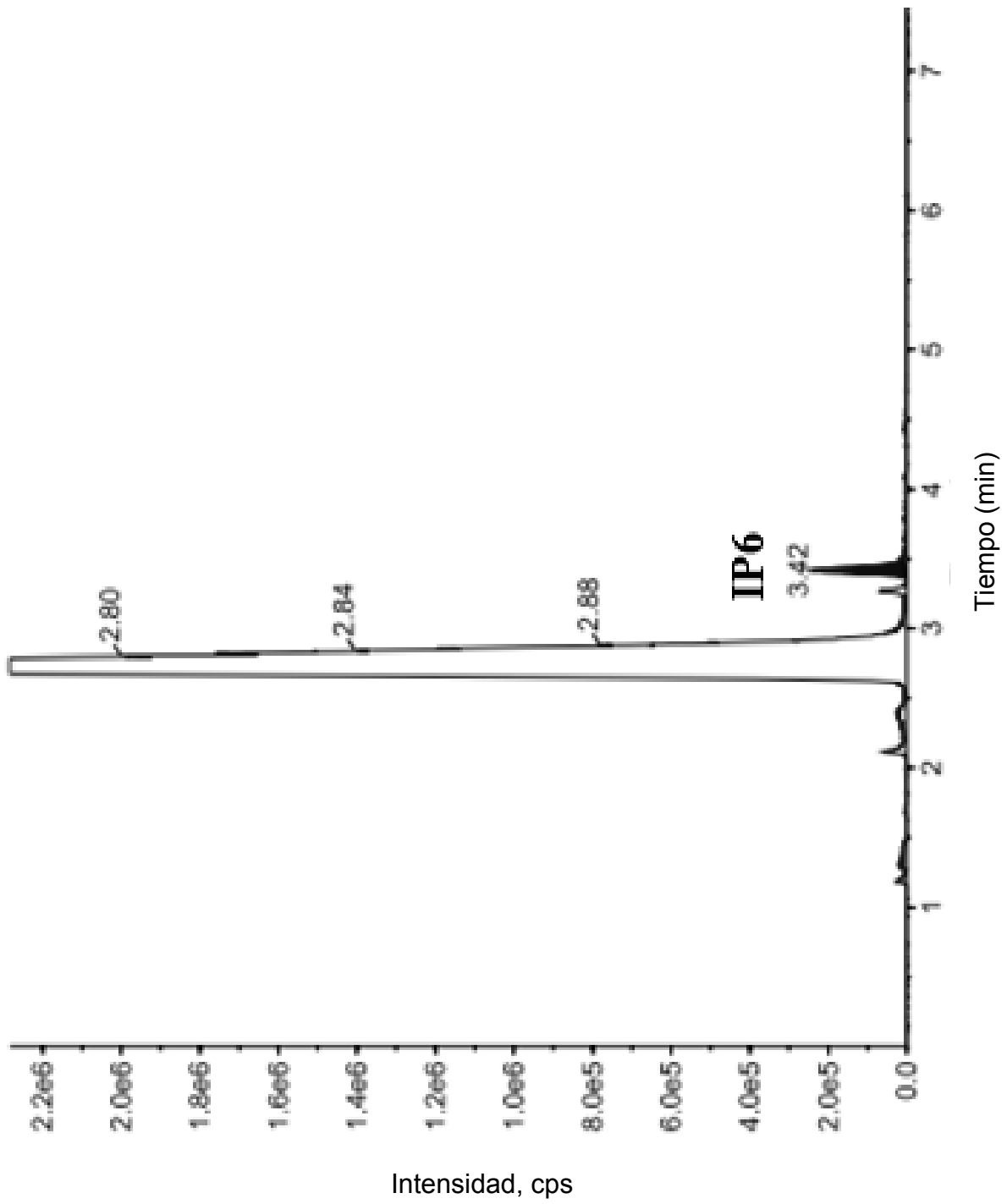


FIG. 1

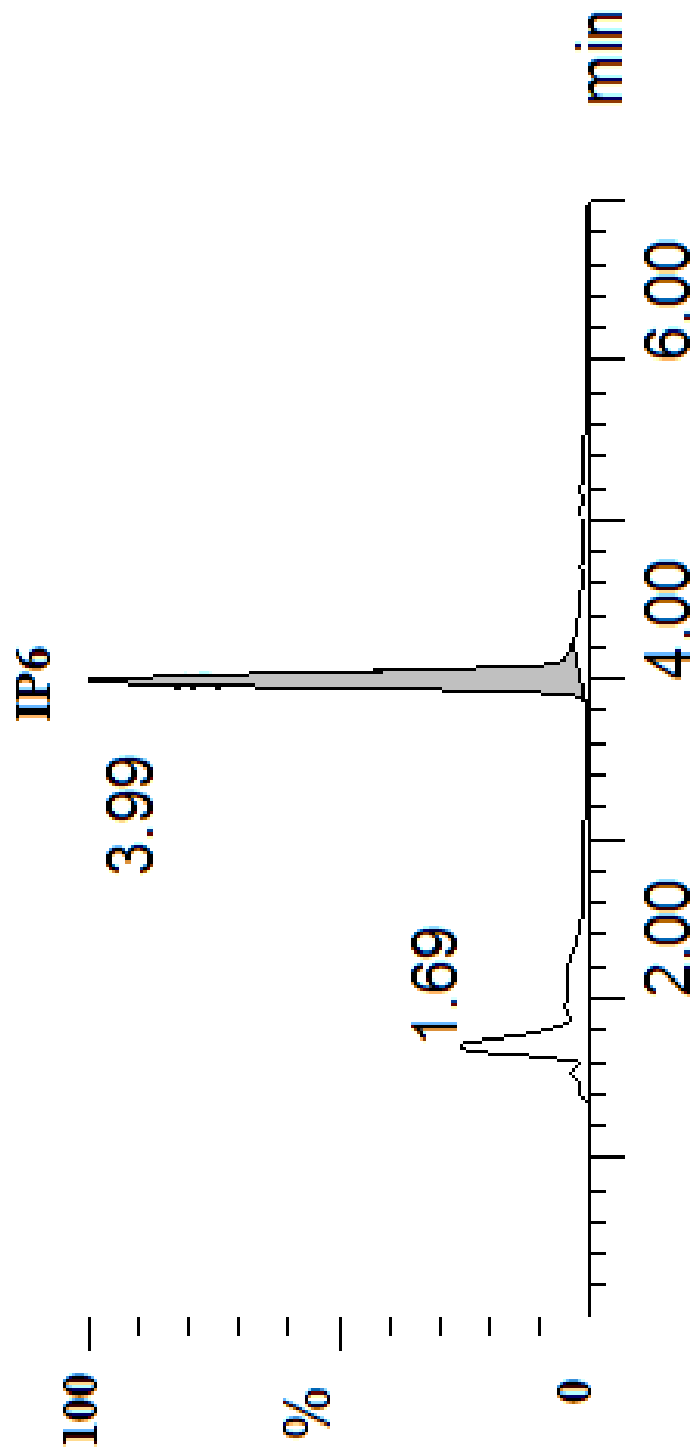


FIG. 2

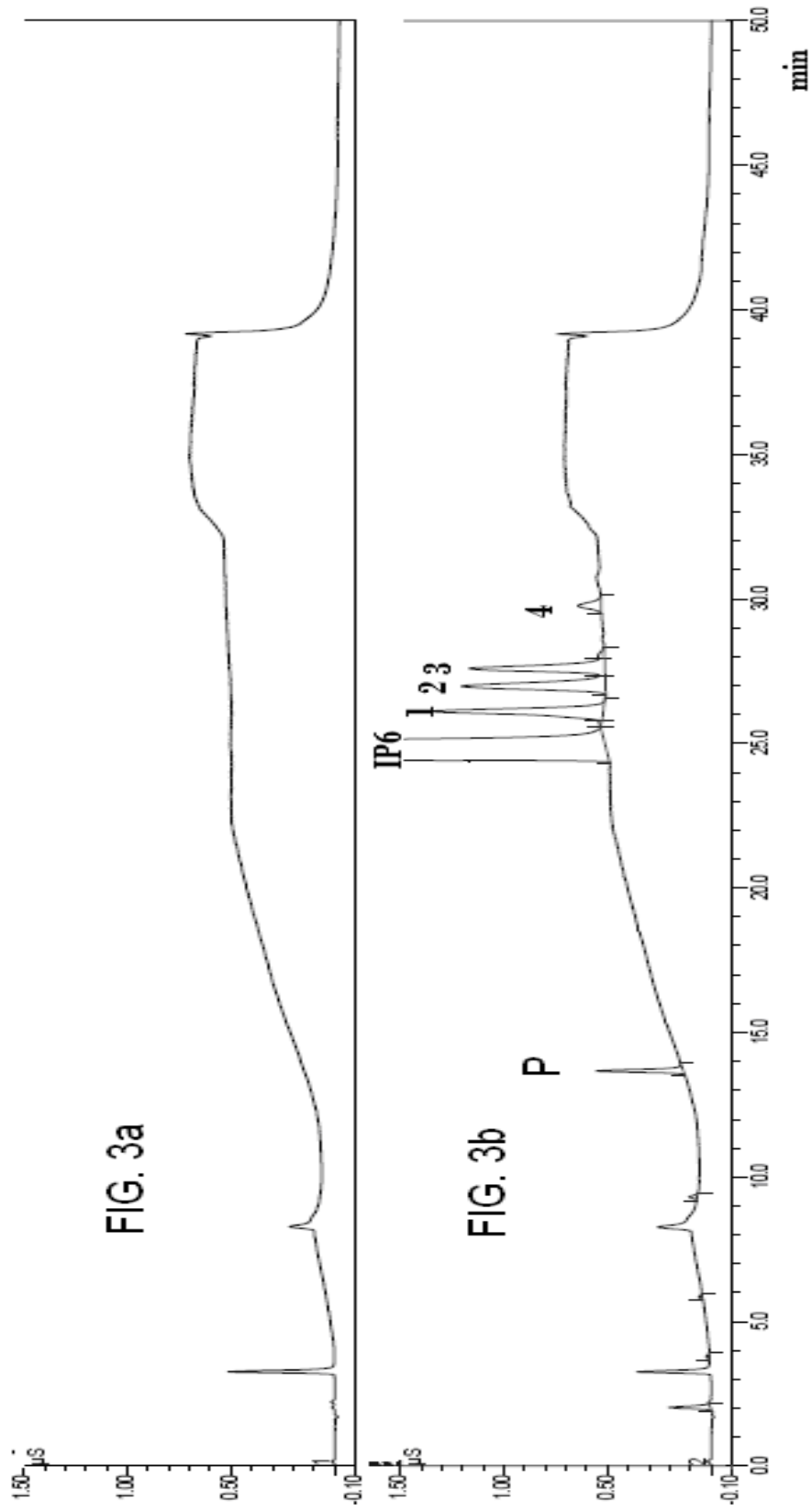


FIG. 3

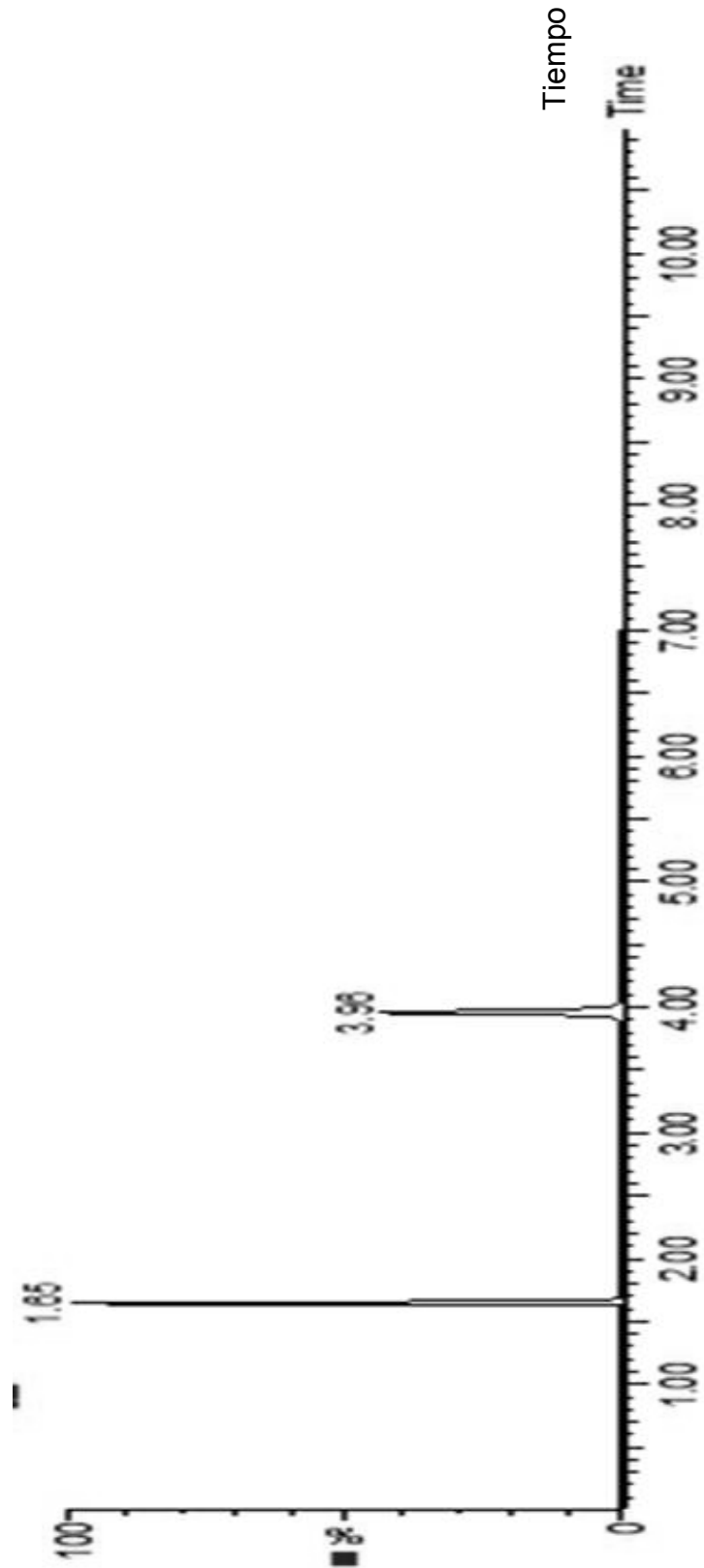


FIG. 4

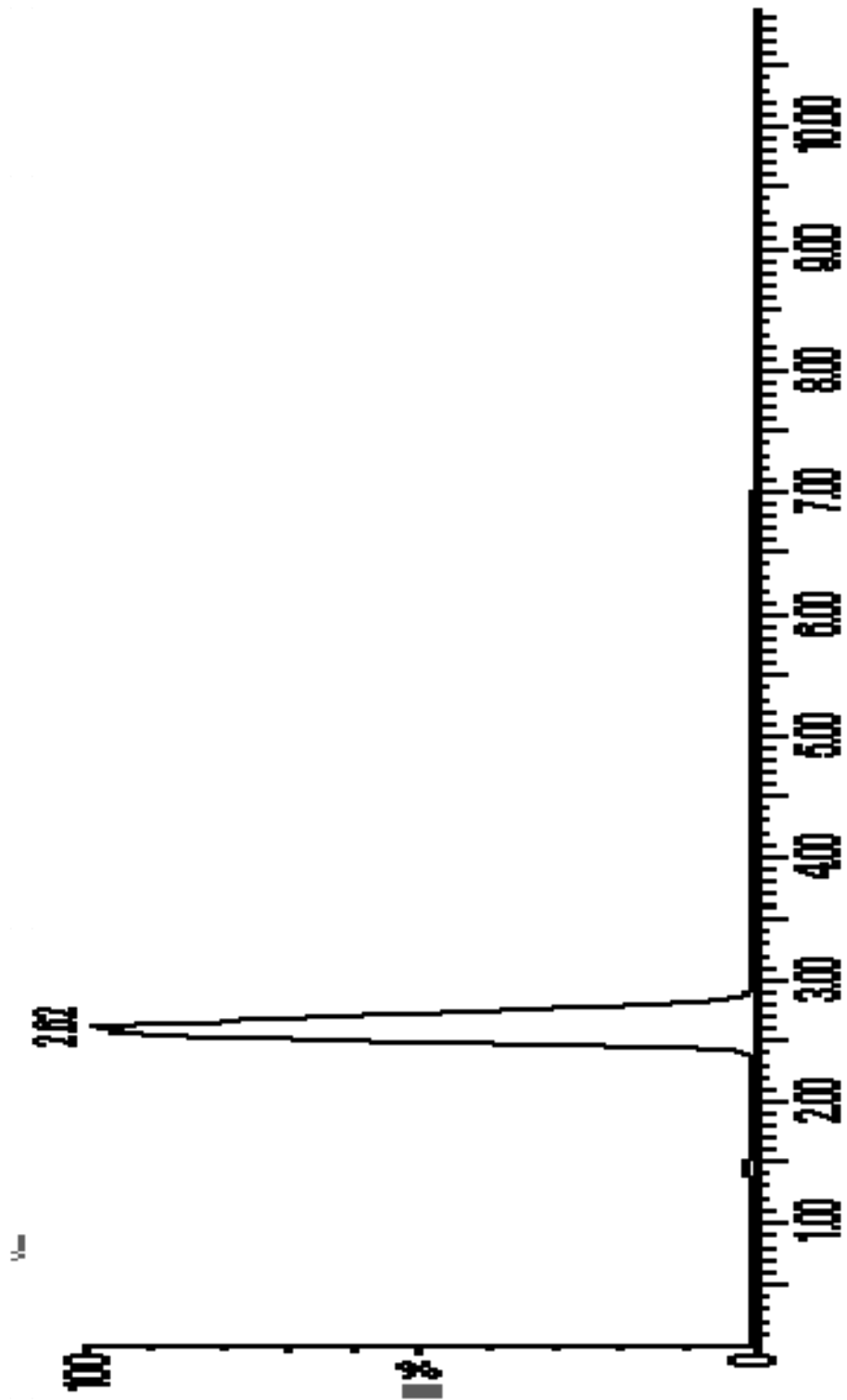


FIG. 5

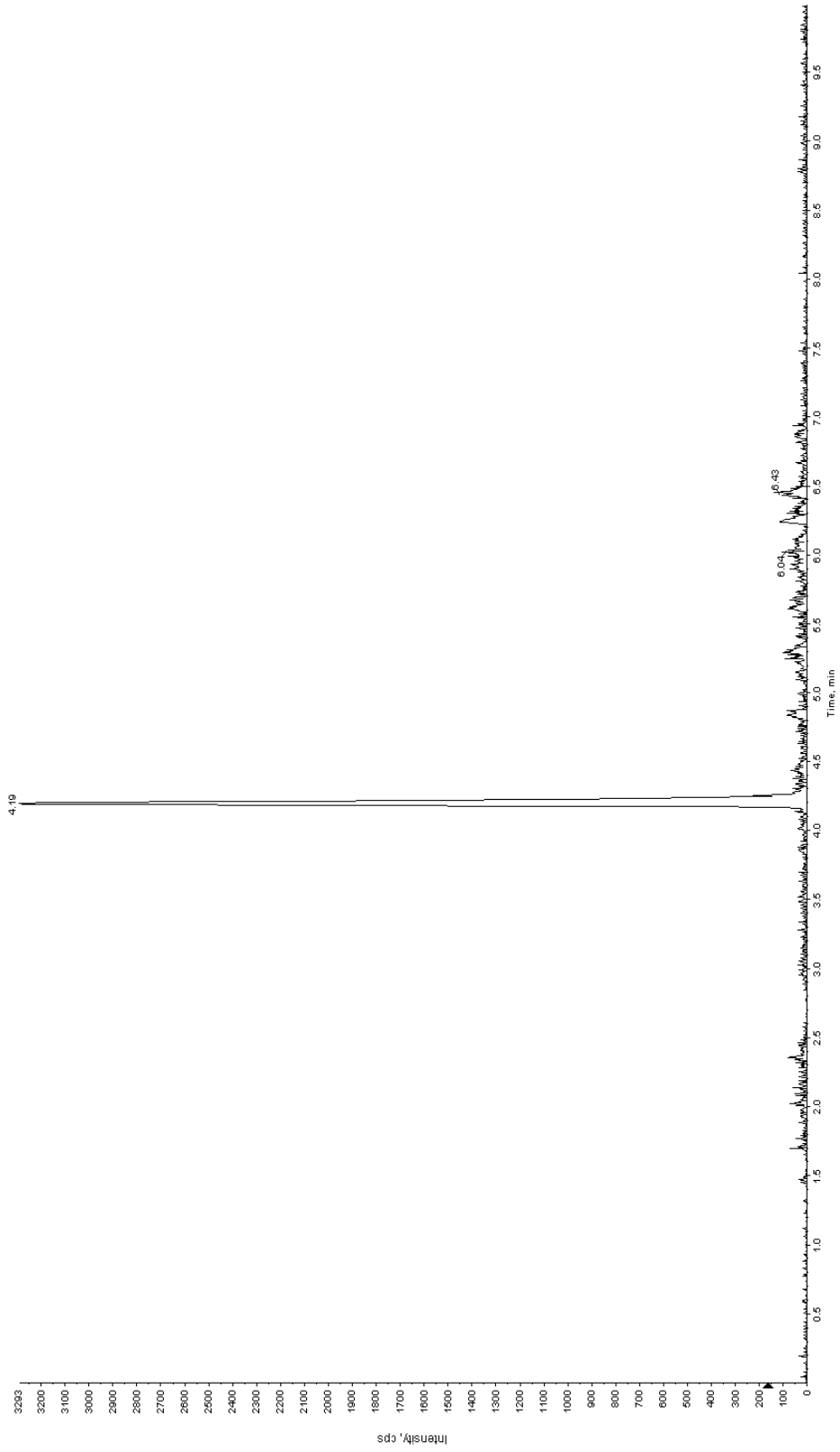


FIG. 6

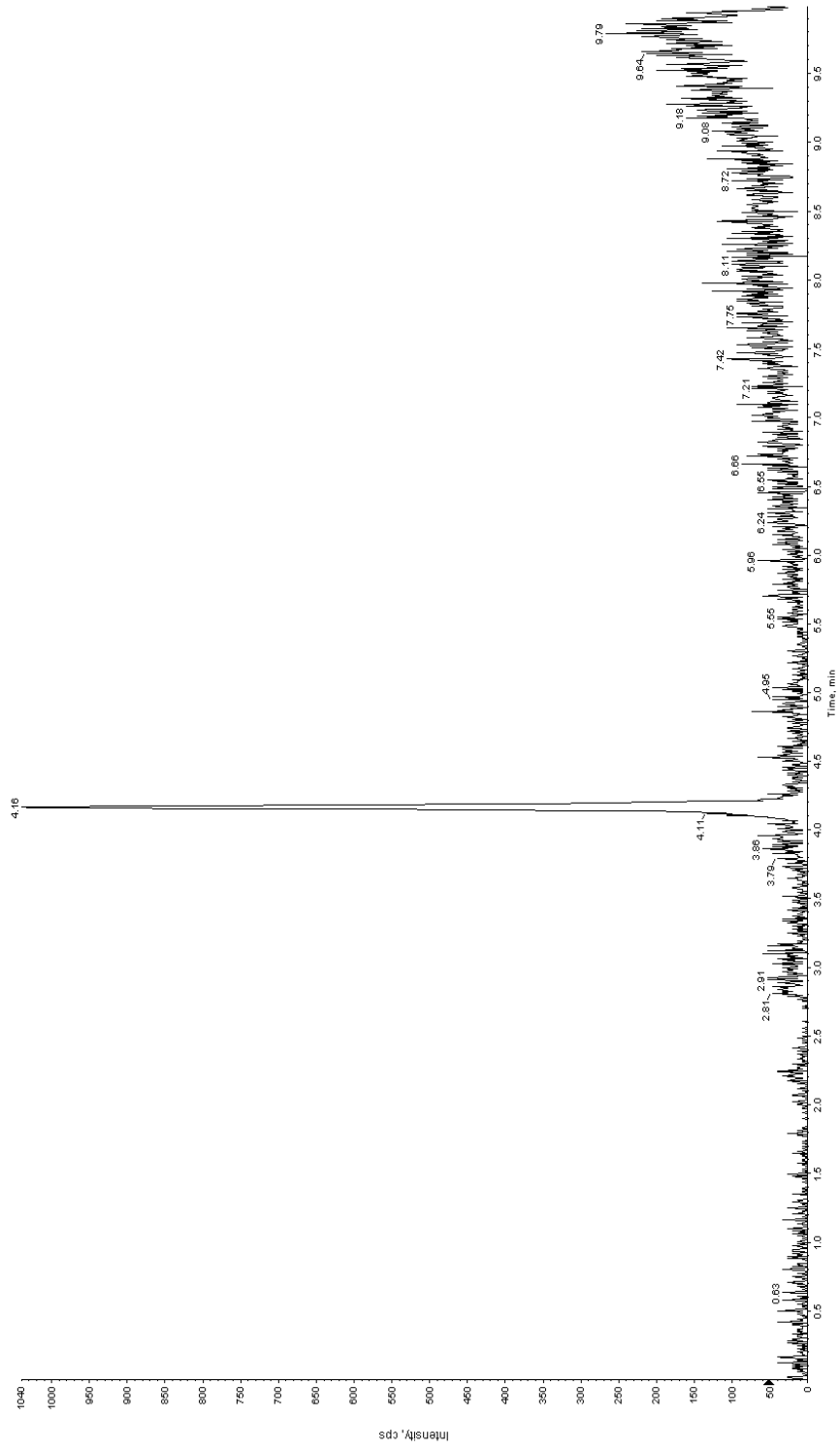


FIG. 7

Tiempo

Ácido fítico

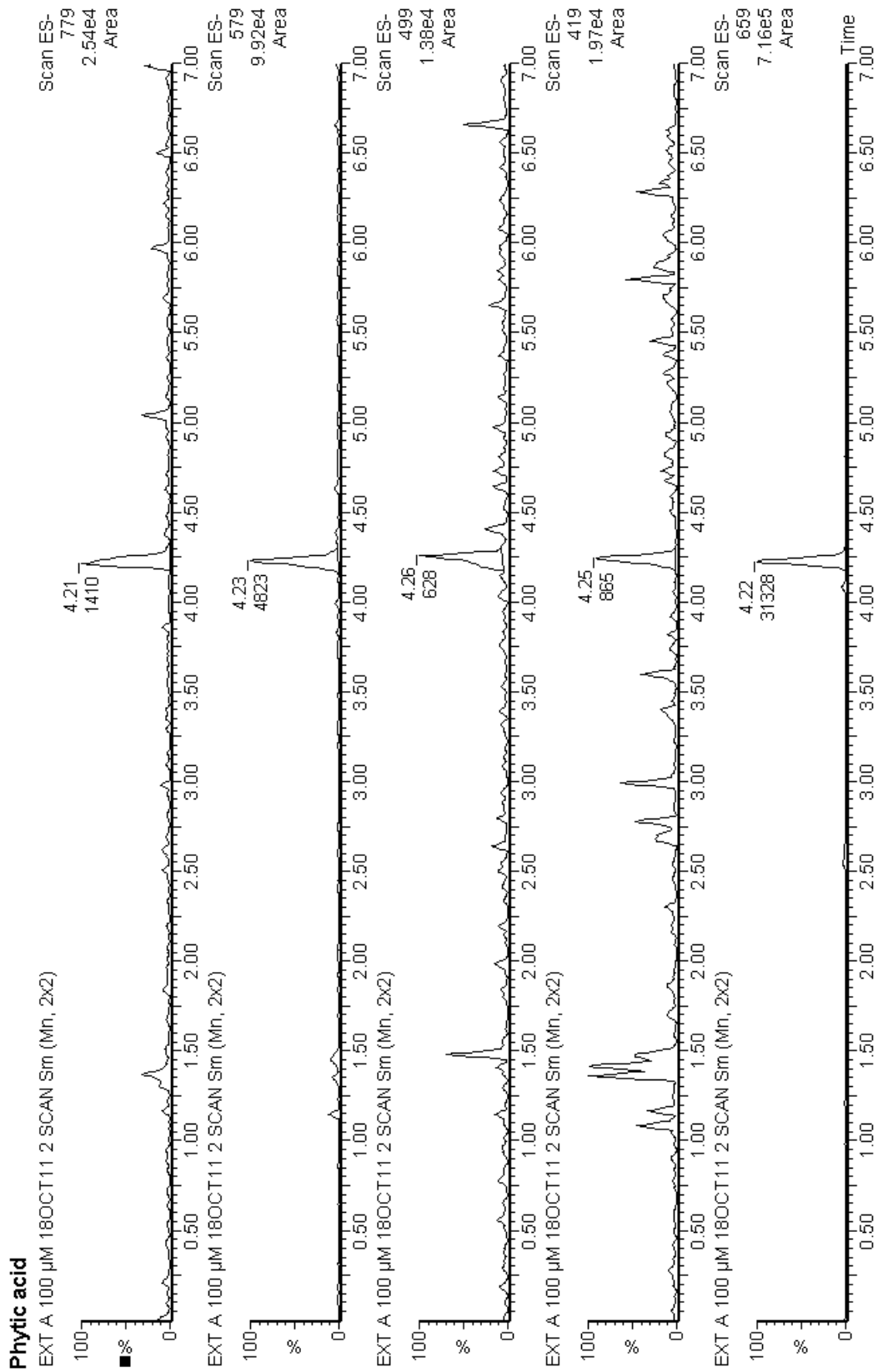


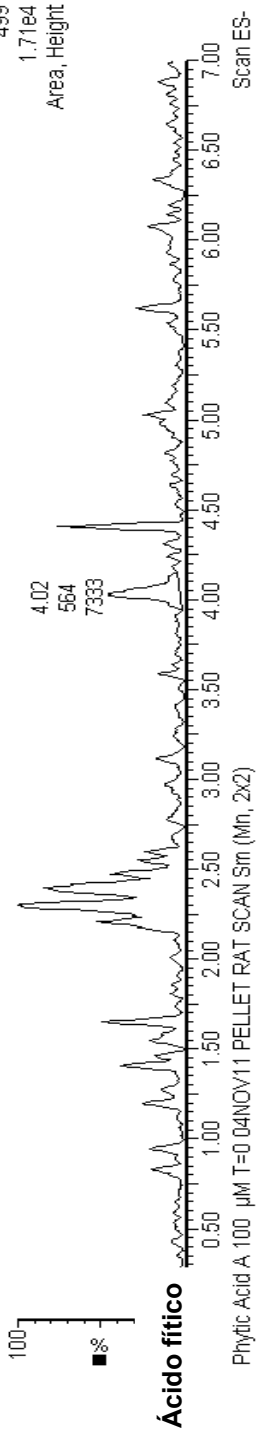
FIG. 8

t_R Ácido fítico: $\approx 4,22$ min; t_R IP5: $\approx 4,23$ min; t_R IP4: t_R IP5: $\approx 4,23$ min; t_R IP3: $\approx 4,25$ min; t_R m/z 779: $\approx 4,21$ min

Ácido fítico

Phytic acid

Phytic Acid A 100 µM T=15min 04NOV11 PELLET RAT SCAN Sm (Mn, 2x2)



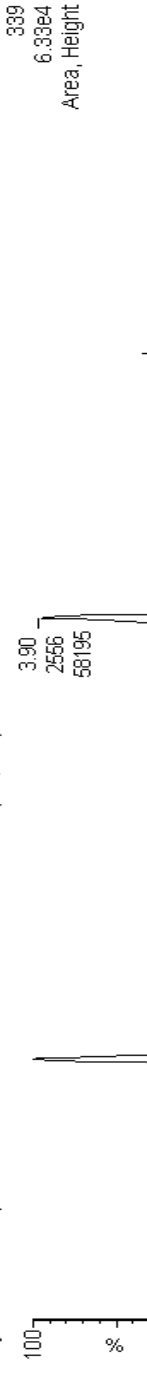
Ácido fítico

Phytic Acid A 100 µM T=0 04NOV11 PELLET RAT SCAN Sm (Mn, 2x2)



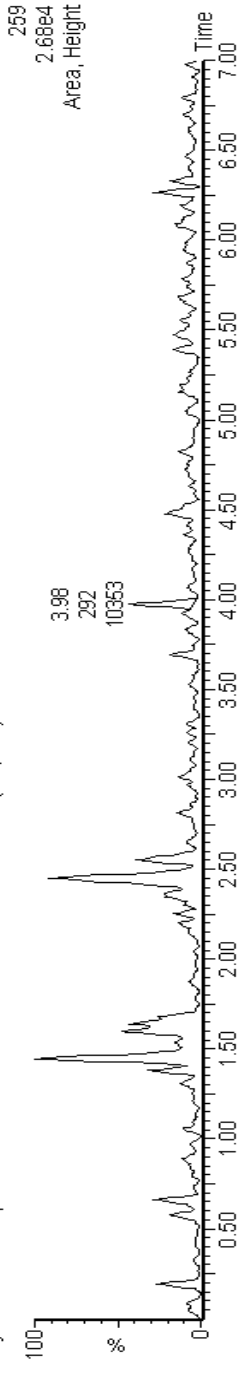
Ácido fítico

Phytic Acid C 100 µM T=60min 04NOV11 PELLET RAT SCAN Sm (Mn, 2x2)



Ácido fítico

Phytic Acid C 100 µM T=240min 04NOV11 PELLET RAT SCAN Sm (Mn, 2x2)



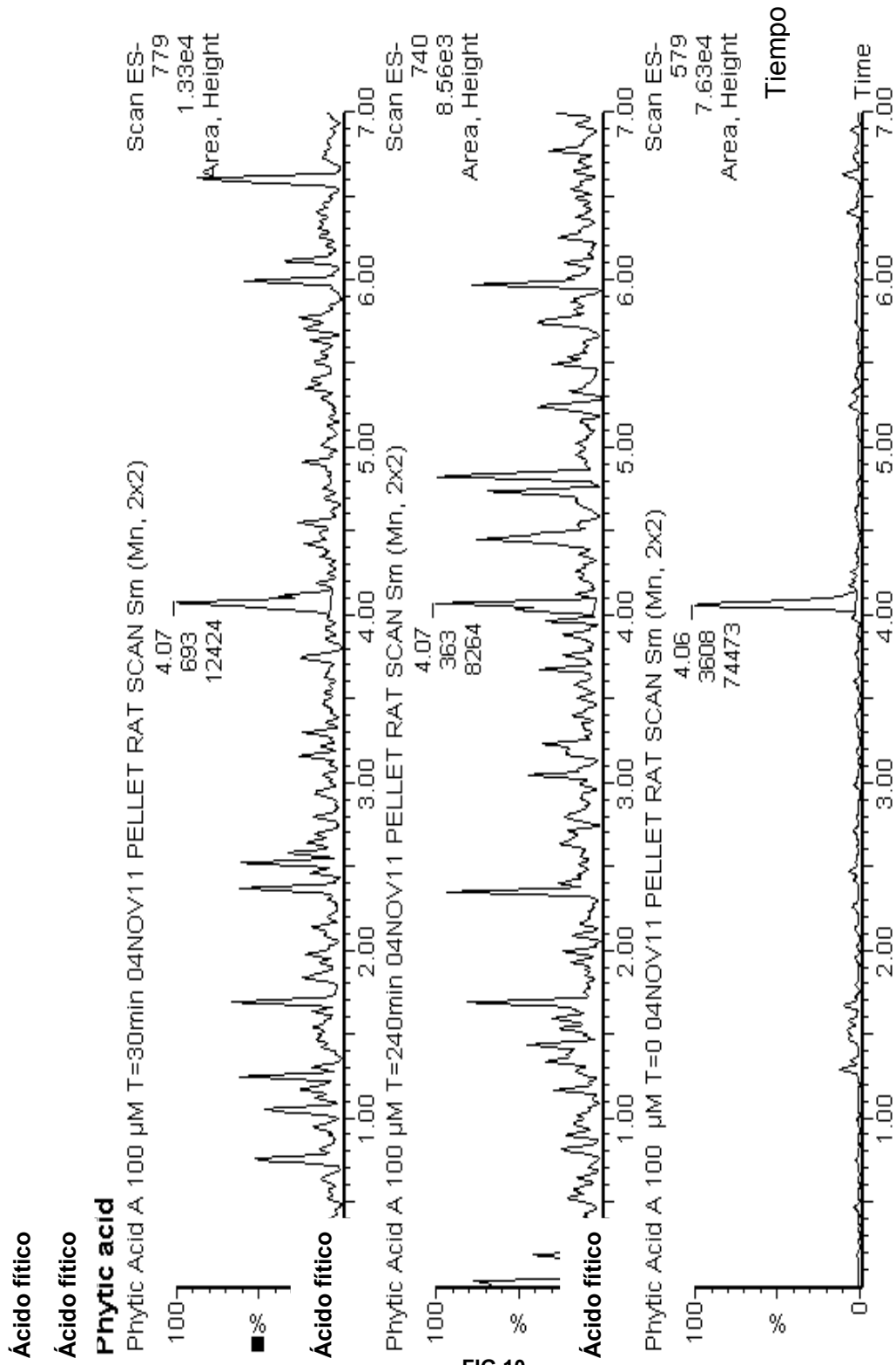


FIG.10

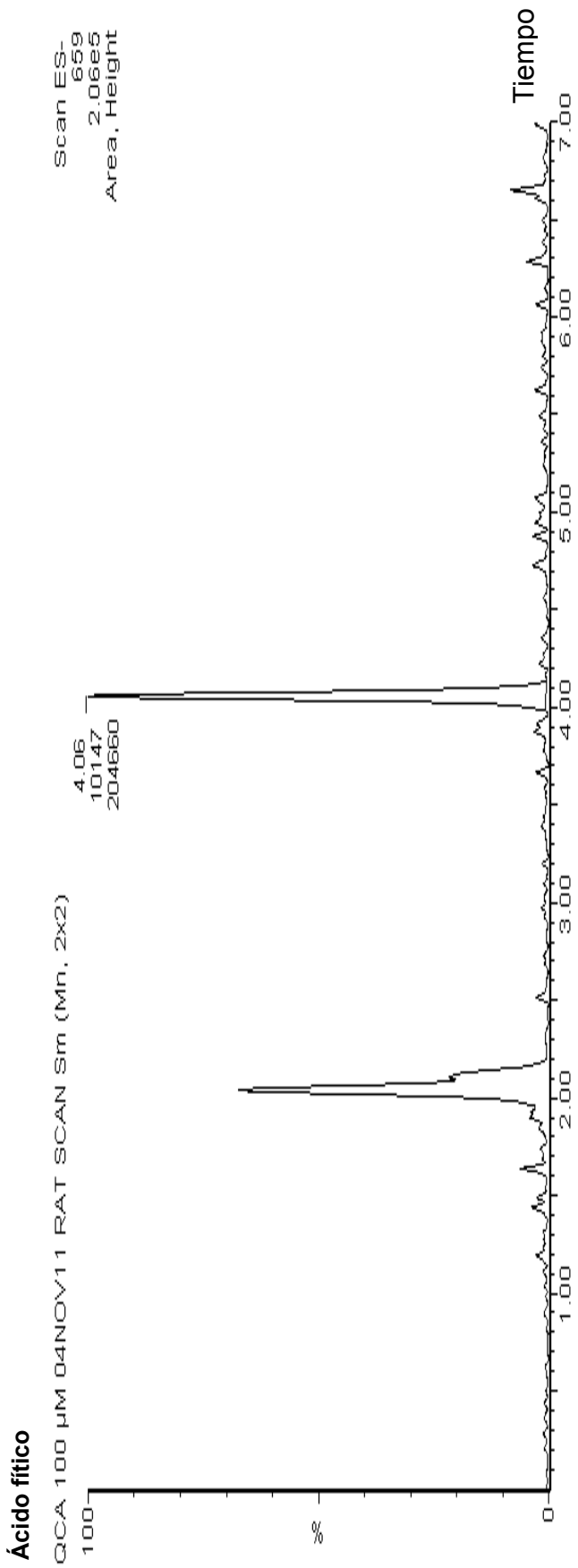


FIG. 11

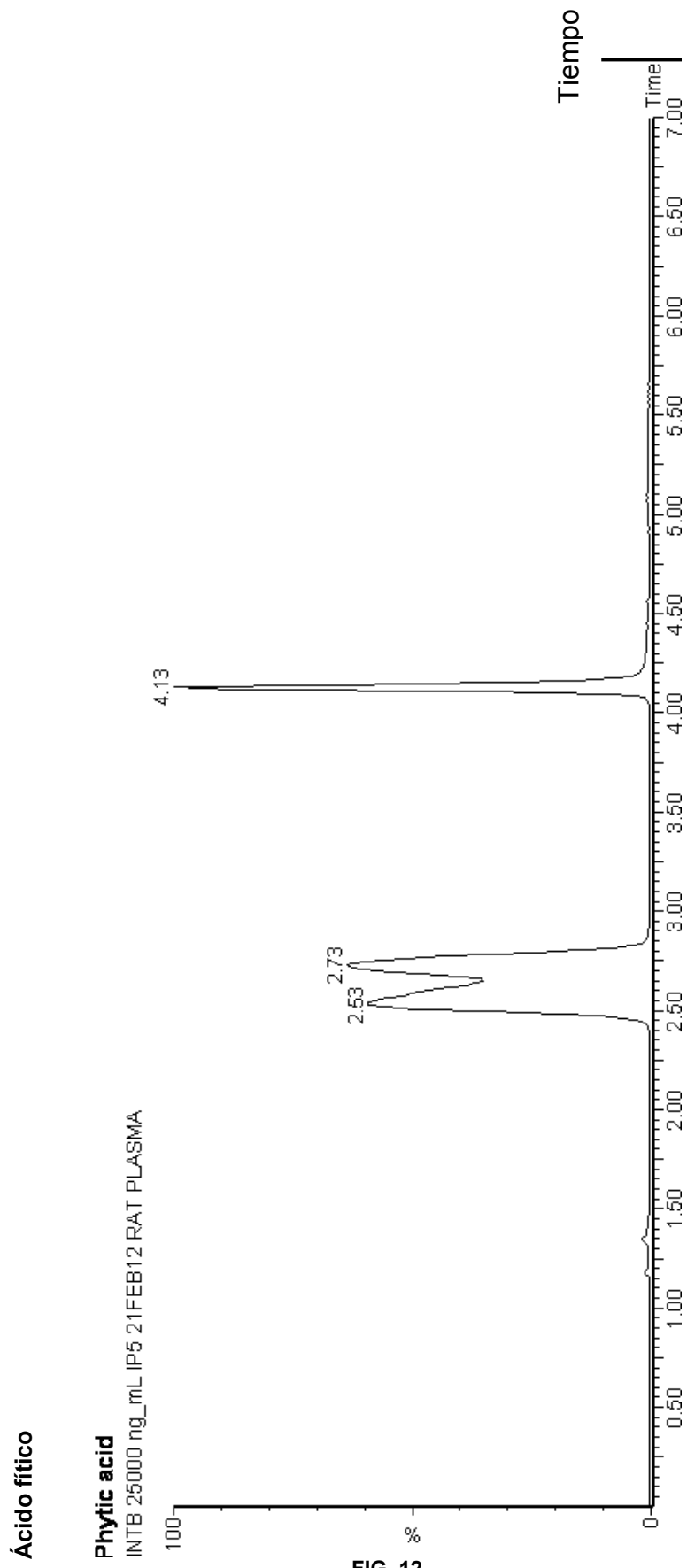


FIG. 12

Ácido fítico

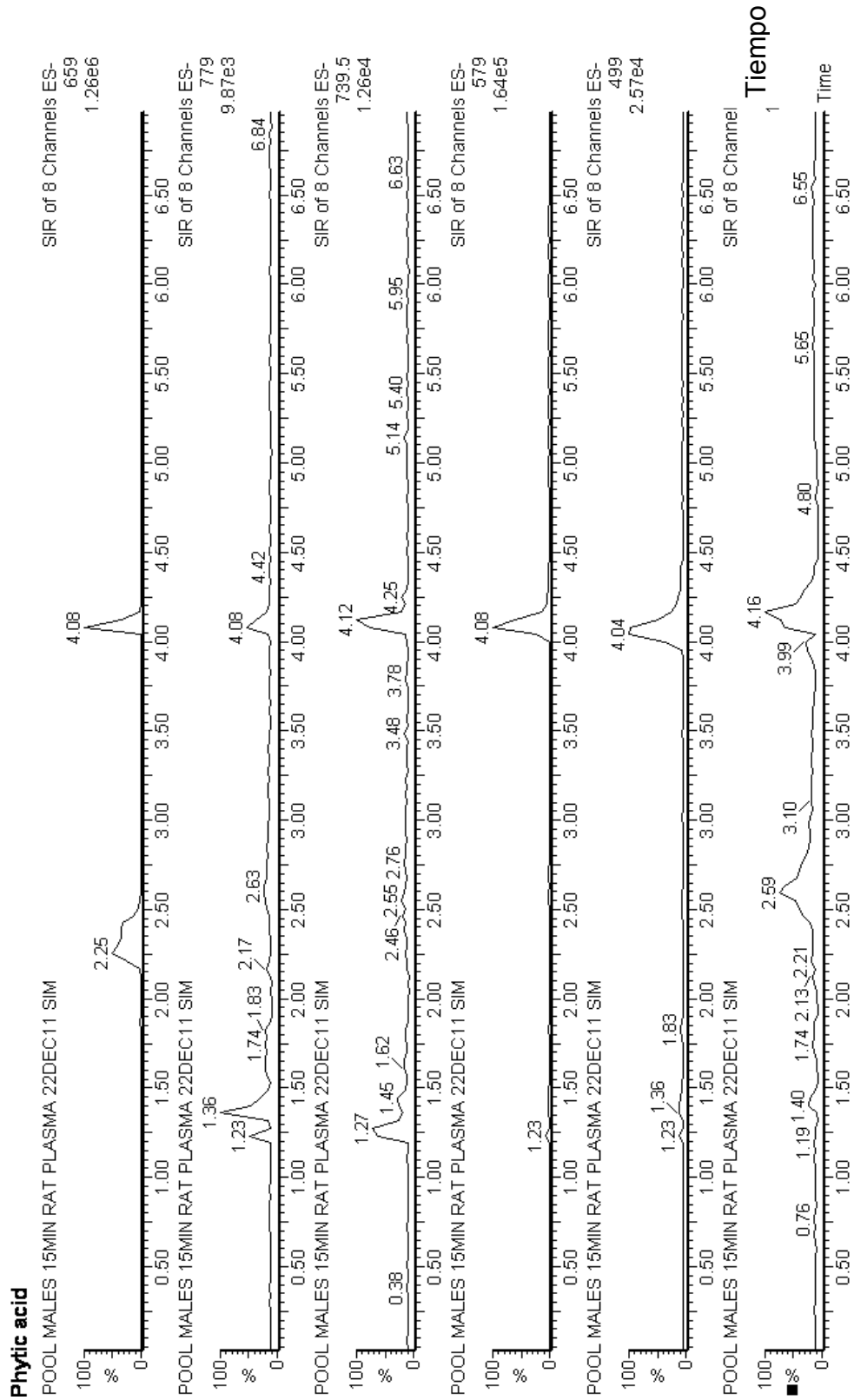


FIG. 13

t_R Ácido fítico: $\approx 4,06$ min; t_R m/z 779: $\approx 4,08$ min; t_R IP7: $\approx 4,12$ min; t_R IP5: $\approx 4,08$ min; t_R IP4: $\approx 4,04$ min; t_R IP2: $\approx 4,16$ min

Ácido fítico

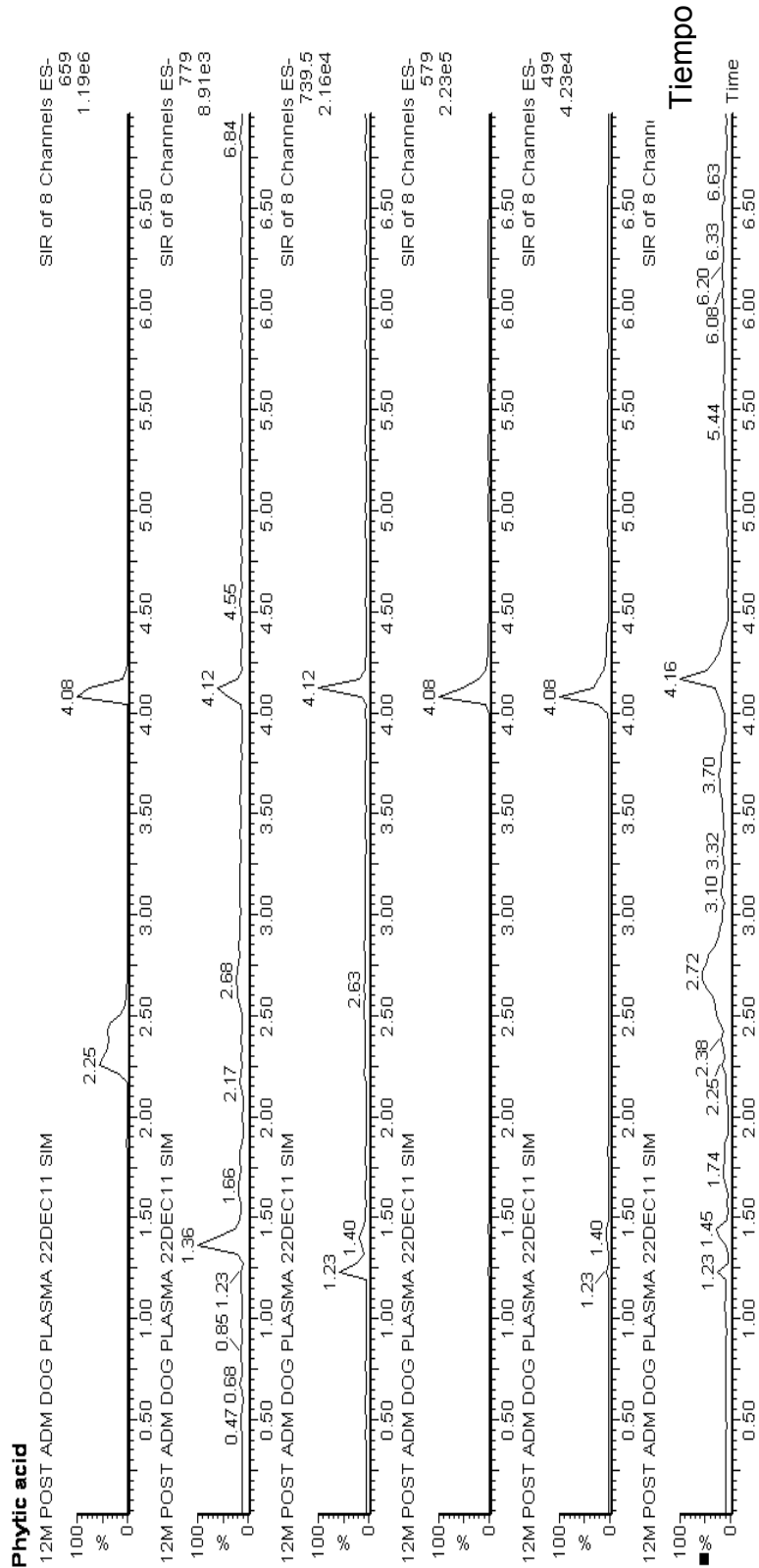


FIG. 14

tr Ácido fítico: ≈ 4,08 min; tr m/z 779: ≈ 4,12 min; tr IP7: ≈ 4,12 min; tr IP5: ≈ 4,08 min; tr IP4: ≈ 4,08 min; tr IP2: ≈ 4,16 min

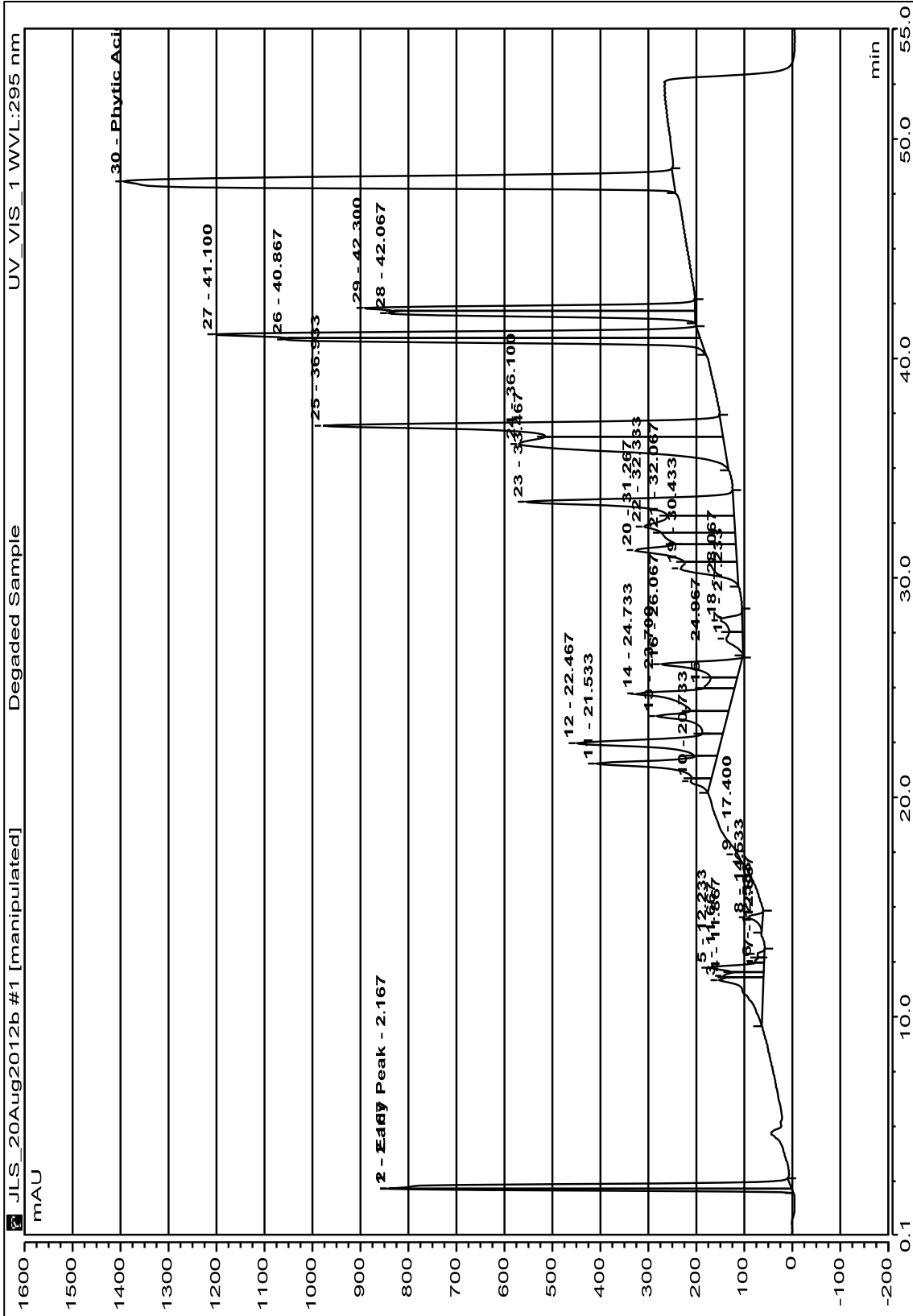


FIG. 15