



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Química

Deuteración regioselectiva dirigida a la síntesis de agentes derivatizantes y/o potenciales estándares internos para su aplicación en el análisis por espectrometría de masas

T E S I S

Que para la obtención del grado de

Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

Jorge Gabriel Ascencio Delgado

Director:

Codirector:

Miembro del
comité tutorial:

Dr. Kazimierz Wrobel | Dr. Oracio Serrano Torres | Dra. Katarzyna Wrobel

Guanajuato, Gto. Noviembre 2024

Declaratoria de originalidad

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del trabajo de tesis titulado “Deuteración regioselectiva dirigida a la síntesis de agentes derivatizantes y/o potenciales estándares internos para su aplicación en el análisis por espectrometría de masas”, realizado por el Q. Jorge Gabriel Ascencio Delgado en el Departamento de Química Sede Pueblito de Rocha de la División de Ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, bajo la codirección y asesoría de quienes firman a continuación:

Dr. Kazimierz Wrobel
Universidad de Guanajuato
Director

Dr. Oracio Serrano Torres
Universidad de Guanajuato
Codirector

Dra. Katarzyna Wrobel
Universidad de Guanajuato
Miembro del comité tutorial

Sinodales

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa
Depto. De Química, Universidad de Guanajuato
Presidente

Dr. Moisés Guerrero Esperanza
Centro Regional Universitario, Universidad Autónoma de Chapingo
Secretario

M. C. Israel Enciso Donis
Depto. de Química, Universidad de Guanajuato
Vocal

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar
Depto. de Química, Universidad de Guanajuato
Suplente

Agradecimientos

Este proyecto se desarrolló con financiamiento del programa de becas para posgrado del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) con el número de CVU 1231869, dentro de las instalaciones de los cuerpos académicos “Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de diferentes compuestos/elementos de interés medioambiental, clínico, farmacéutico e industrial” y “Electroquímica ambiental”.



Índice.....	I
Índice de esquemas.....	II
Índice de figuras.....	II
Índice de tablas.....	VI
Resumen.....	VIII
Capítulo I. Introducción.....	1
I.1. Uso de isótopos estables en análisis cuantitativo por espectrometría de masas....	2
I.2. Compuestos deuterados como estándares internos.....	10
I.3. Compuestos deuterados como agentes derivatizantes.....	16
I.3.1. Derivatización codificada por isótopos (ICD).....	17
I.3.2. Derivatización de inversión de carga.....	20
I.3.3. Fragmentación: una herramienta para cuantificación y elucidación estructural.....	22
I.3.4. Misceláneo.....	28
I.4. Ejemplos de reacciones de deuteración regioselectiva con potenciales aplicaciones en espectrometría de masas.....	34
I.4.1 Estrategias generales para marcaje con deuterio.....	34
I.4.2. Intercambio de isótopos de hidrógeno vía catálisis básica.....	34
I.4.3. Intercambio de isótopos de hidrógeno asistido con metales de transición.....	35
Capítulo II. Objetivos.....	39
Capítulo III. Parte experimental.....	41
Capítulo IV. Resultados y discusión.....	44
IV.1. Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 del agente derivatizante AEPy.....	45
IV.1.1 Deuteración de piridina vía intercambio H/D empleando el sistema KO ^t Bu/DMSO- d_6	45
IV.1.2 Síntesis y caracterización de los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 de AEPy.....	47
IV.2 Síntesis del reactivo de Mukaiyama.....	49
IV.3 Comparación del rendimiento del reactivo de Mukaiyama (CMPI) y la carbodiimida EDC como agentes de acoplamiento para la derivatización de ácidos grasos modelo.....	50
IV.4 Efecto de la composición de solventes en la derivatización de ácidos grasos empleando el reactivo de Mukaiyama y el agente derivatizante AEPy.....	51
IV.5 Condiciones instrumentales para análisis de ácidos derivatizados con los isotopólogos de AEPy.....	53
IV.5.1 Efecto del voltaje del capilar en la intensidad de señal y en relación S/N.....	53
IV.6 Evaluación de desempeño de sistemas de isotopólogos $d_0 d_3$ y $d_0 d_5$ de AEPy en la reacción de derivatización de ácidos grasos.....	56
IV.6.1 Uniformidad de reactividad de los 3 isotopólogos.....	56

IV.6.2 Comparación de los factores de respuesta de los sistemas de isotopólogos.....	58
IV.7 Derivatización de ácidos grasos en muestras reales utilizando los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 de AEPy.....	60
IV.7.2 Derivatización de ácidos grasos en muestras reales.....	60
IV.8 Análisis de ácidos grasos en muestras reales mediante derivatización codificada por isótopos con enfoques dirigido y no dirigido y comparación de desempeño de los sistemas AEPy- d_0 AEPy- d_3 y AEPy- d_0 AEPy- d_5	64
IV.8.1 Enfoque no dirigido.....	64
IV.8.2 Enfoque dirigido.....	68
IV.9 Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_3 , d_6 y d_9 del agente derivatizante AMPP.....	75
IV.9.1 Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_2 , d_3 y d_5 de la sal de Zincke.....	76
IV.9.2 Deuteración del 1-bromo-4-nitrobenceno catalizada por $\text{Ag}_2\text{CO}_3(\text{PPh}_3)_2$	77
IV.9.3 Cianuración de los isotopólogos d_0 y d_4 del 1-bromo-4-nitrobenceno...79	
IV.9.4 Reducción/Protección de los isotopólogos d_0 y d_4 del 1-nitro-4-benzonitrilo.....	81
IV.10. Síntesis de los isómeros β y γ del derivatizante AMMP.....	83
Capítulo V. Conclusiones.....	84
Anexos.....	88
Bibliografía.....	96

Índice de esquemas

- Esquema 1.** Esquema general de aplicación del derivatizante 1 y estructuras de los tres isotopólogos de AEPy.
- Esquema 2.** Estructuras químicas de los 4 isotopólogos del sistema AMPP 4-plex (arriba) y espectro de masas simulado in silico de los iones esperados para los 4 isotopólogos de AMPP ($^2\text{H}_0$, $^2\text{H}_3$, $^2\text{H}_6$ y $^2\text{H}_9$) suponiendo contenido del 100% de deuterio en cada caso.
- Esquema 3.** Principio de derivatización isobárica con AEPy-AMMP.

Índice de figuras

- Figura 1.** Espectro obtenido con el espectrógrafo de masas parabólico de J.J. Thomson en 1913, se pueden observar en el cuadrante inferior derecho las líneas correspondientes a los isótopos de neón ^{20}Ne y ^{22}Ne .
- Figura 2.** Línea del tiempo “Coevolución entre el uso cuantitativo de isótopos estables y el desarrollo instrumental en espectrometría de masas”.
- Figura 3.** Dimensiones analíticas: separación cromatográfica (tiempo de retención) y de espectrometría de masas y de masas en tándem (m/z en MS y en MS/MS), en las que se resuelven respectivamente los experimentos libres de etiqueta (verde), de etiquetado no isobárico (amarillo) y de etiquetado isobárico (café), adaptado de Tyanova et al., 2016.
- Figura 4.** Los estados 1 y 2 representan dos muestras o condiciones experimentales a comparar. Las líneas continuas indican la etapa en que se reúnen las muestras de ambos estados (marcadas con par de reactivos conteniendo isótopos ligero/pesado, con reactivos isóbaros o libres de marcaje) para tratarse por igual en las

etapas procedentes. Las líneas discontinuas indican los puntos de tratamiento individual de ambos estados. Adaptado de X. Chen et al., 2021.

Figura 5. Principio de la dilución isotópica para una especie con dos isótopos de masa m y o , del lado izquierdo arriba se muestra la distribución isotópica natural del analito a cuantificar, abajo a la izquierda el patrón isotópico del spike o estándar interno enriquecido del isótopo con masa $m + n = o$; del lado derecho se observa la combinación de los patrones isotópicos luego del mezclado de ambos en cantidades N y M , respectivamente. Adaptado de (Hoffmann Edmond de, 2007).

Figura 6. Primera síntesis total del ácido linoleico reportada por Raphael y Sondheimer (a) y primera síntesis total del ácido araquidónico reportada por Osbond (b).

Figura 7. Tres principales alternativas de enfoque experimental con derivatización codificada por isótopos pesados estables adaptado de Higashi & Ogawa, 2016.

Figura 8. Enfoques alternativos de cuantificación absoluta empleando derivatizantes codificados por isótopos pesados estables (caso particular con capacidad de multiplexado de 4 canales), (a) método SID + ICD y (b) método de IS "parcial".

Figura 9. Reacciones CMF de iones positivos (a), en los que usualmente se elimina como grupo saliente (y pérdida neutra) al residuo en el que inicialmente se ubicaba la carga, y de iones negativos (b), en los que usualmente se elimina un grupo saliente con la carga en un sitio que inicialmente se encontraba en una región neutra de la molécula, mientras que la pérdida neutra contiene al grupo inicialmente cargado.

Figura 10. Patrón de fragmentación en espectro MALDI-MS/MS obtenido con MALDI-CID-FTIRC del ion m/z 471.33 correspondiente al ácido araquidónico derivatizado con AMPP a partir de sección de tejido cerebral de rata (Kaya et al., 2023), además de los iones diagnóstico para la asignación de las posiciones de cada doble enlace originadas por mecanismos CRM, se observan dos iones producto de alta intensidad correspondientes a fragmentos del derivatizante, específicamente los iones de m/z 169.08 y 183.09.

Figura 11. Agentes derivatizantes de carga remota utilizados típicamente para la derivatización de lípidos y compuestos con un grupo ácido carboxílico en su estructura, y los hidrógenos fácilmente reemplazables por deuterio.

Figura 12. Patrones de fragmentación inducidos en el ácido araquidónico derivatizado con AMPP (A), y con AMMP (B). Las amplificaciones en líneas punteadas describen los iones en función de las diferencias de masas (o pérdidas neutras) a partir del ion precursor, ilustrando la equivalencia de los derivatizantes como herramienta de elucidación estructural. Extraídos de Wang. et. al 2013.

Figura 13. Típicos mecanismos de fragmentación de carga remota inducidos en FFAs derivatizados con AMPP ó AMMP. a) Reordenamiento de hidrógeno γ , escisión carbono-carbono $\alpha''-\beta'$. b) Eliminación 1,4 de hidrógeno. c) Fragmentación vía mecanismo alílico (tipo α) $\alpha''-\beta'$. d) Eliminación de hidrógeno a partir exclusivamente de dobles enlaces conjugados en cis.

Figura 14. Estructura general de ácidos grasos derivatizados con AETMA, DMED ó DEED, y sus potenciales mecanismos de fragmentación vía CMF con pérdida neutra constante. Aziridinación (rojo), remoción de hidrógeno β (azul) o formación de 2-oxazolina (morado).

Figura 15. Analogía del mecanismo de fragmentación por cierre de ciclo 5-exo-tet observado en sistemas que inducen CMF y cómo las formas resonantes de derivados de AMPP y AMMP podrían estabilizarse en forma de spiro-2-oxazolina facilitando la fragmentación de la cadena alquímica. Adaptado parcialmente de Dong Sun, 2018.

Figura 16. Homología estructural de los derivatizantes isobáricos en la región cercana al precursor del grupo reportero, R_n (n : 1, 2, 3 y 4) son distintas cadenas alquímicas y X un heteroátomo.

Figura 17. Derivatizantes con carga fija y codificados por deuterio con enlazador basado en aminas primarias o secundarias dirigido al grupo funcional ácido carboxílico.

Figura 18. Perfil de energía libre de Gibbs relativa (al anión de menor energía, D4) de los aniones soportados en α , β y γ , y las distribuciones experimentales del grado de deuteración. (la cantidad en azul y entre paréntesis corresponde a la diferencia de energía libre de Gibbs entre el sustrato y el isómero aniónico más estable). Tomado del material suplementario de Kopf y colaboradores (Kopf, Liu, et al., 2022a).

Figura 19. Perdeuteración de piridina en condiciones neutras a elevadas temperaturas con D₂O cómo fuente de deuterio, reproducido de la publicación de Westiuk y Ju.

Figura 20. Intercambio hidrógeno/deuterio en hetero-arenos nitrogenados (específicamente piridina) bajo condiciones suaves catalizado por rutenio con baja carga de catalizador (0.1 mol %), reproducido de Mai y colaboradores, 2019.

Figura 21. Esquema general para la obtención del isotópologo α -d₂ de piridina mediante intercambio de isótopos de hidrógeno catalizado por níquel (izquierda), y precatalizador de primera generación de hidruro de Ni(I) de α -diimina (derecha). Reproducido de Chirik y colaboradores, 2018.

Figura 22. Esquema general para la obtención del isotópologo α,γ -d₃ de piridina mediante intercambio de isótopos de hidrógeno catalizado por níquel (izquierda), y precatalizador de segunda generación de hidruro de Ni(I) de α -diimina (derecha). Reproducido de Chirik y colaboradores, 2019.

Figura 23. Caracterización por NMR de baja temperatura de ¹H y ³¹P{¹H}, NMR de ángulo mágico e IR in situ de las especies generadas por la mezcla Ag₂CO₃ y PPh₃. Específicamente se muestran de izquierda a derecha: {Ag(PPh₃)₂(μ - κ^2 , κ^2 -CO₃)}, {Ag(PPh₃)₂(κ^2 -HCO₃)₂} y {Ag(PPh₃)₂(μ - κ^2 , κ^1 -CO₃)}, de acuerdo con Patt, 2023 y Bowmaker, 2011.

Figura 24. Mecanismo de deuteración en orto y en para de compuesto nitroaromático. Reproducido de Tang, 2023.

Figura 23. Deuteración de piridina mediada por base.

Figura 24. Condiciones de intercambio D/H empleados para la obtención de la piridina- α -d₂.

Figura 25. Comparación de espectros de masas de alta resolución de la piridina con composición isotópica natural (a) y de los isotópologos sintéticos α -d₂ (b) y β,γ -d₃ (c), adquiridos por infusión directa en ESI-QTOF-MS.

Figura 26. Espectros de ¹H NMR de los tres isotópologos de piridina, d₀ o distribución isotópica natural (a), isotópologo β,γ -d₃ (b) e isotópologo α -d₂ (c).

Figura 27. Reacción general para la obtención del derivatizante codificado por isótopos AEPy (d₀, d₃ y d₅).

Figura 28. Espectros de masas de los tres isotópologos del derivatizante. AEPy-d₀ (azul), AEPy-d₃ (naranja) y AEPy-d₅ (rojo).

Figura 29. Espectros de ¹H NMR de los tres isotópologos del derivatizante AEPy. AEPy-d₀ (azul), AEPy-d₃ (naranja) y AEPy-d₅ (rojo).

Figura 30. Reacción para la obtención de la sal de Mukaiyama.

Figura 31. Espectro de ¹H NMR del producto de reacción entre la 2-cloropiridina y el yoduro de metilo, las cuatro señales mayoritarias (9.2, 8.6, 8.3 y 8.1) corresponden al producto 2-cloro-N-metilpiridinio mientras que las minoritarias (7.6, 7.3, 6.3 y 6.1) son atribuibles al producto 2-yodo-N-metilpiridinio, además se observan las señales de los metilos en campo alto.

Figura 32. Espectros adquiridos en ESI(+)-QqTOF-MS por infusión directa de los productos obtenidos de la reacción entre la 2-cloropiridina y el ICH₃. Se observan los productos 2-cloro-N-metilpiridinio, 2-yodo-N-

metilpiridinio y además algunos dímeros del tipo $[2M\cdot X]^+$ formados en fase gas. Las Δm corresponden a la diferencia de masa entre el yodo y el cloro.

Figura 33. Comparación de la eficacia relativa de derivatización entre dos agentes de acoplamiento a dos temperaturas distintas, los resultados para cada ácido se muestran normalizados respecto a su isotópologo trideuterado adicionado por igual a los cuatro tratamientos. ($n=3$)

Figura 34. Formación del éster activo y del producto de sustitución entre un ácido carboxílico y un nucleófilo (AEPy o solvente nucleófilo) utilizando la carbodiimida EDC (a) o el reactivo de Mukaiyama CMPI (b) cómo agentes de acoplamiento.

Figura 35. Espectros de masas tras las reacciones utilizando las distintas composiciones de solventes, el ion de m/z 123.19 corresponde al derivatizante sin reaccionar, mientras que el ion de m/z 179.11 corresponde ácido propiónico derivatizado (el agente de acoplamiento fue CMPI).

Figura 36. Variación de la intensidad de la señal en el modo TIC (total ion current por sus siglas en inglés) adquirida para las mezclas de los ácidos grasos en hígado de bacalao derivatizados con cada isotópologo de AEPy (d_0 en azul, d_3 en naranja y d_5 en rojo) respecto al cambio de voltaje en el capilar con decrementos de voltaje de 500 Volts, desde 4500 hasta 1500 durante intervalos de tiempo de 0.5 minutos.

Figura 37. Efecto del cambio del voltaje en el capilar sobre la intensidad de la señal y la relación señal/ruido de algunos de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el material de referencia de aceite de hígado de bacalao, perfiles normalizados entre isotópologos respecto a la S/N en 3100 Volts y a la intensidad en 3500 Volts del canal d_0 .

Figura 38. Espectros de masas de los ácidos grasos presentes en el aceite de hígado de bacalao derivatizados en soluciones individuales con los isotópologos de AEPy (d_0 en azul, d_3 en naranja y d_5 en rojo) adquiridos por infusión directa en un sistema ESI-QqTOF blancos de reacción en anexo 2.

Figura 39. Intensidades de los iones de ácidos grasos en aceite de hígado de bacalao derivatizados con tres isotópologos de AEPy ($-d_n$, donde $n= 0, 3$ ó 5) relativas a la intensidad del ion $C_{16}:0-d_n$, adquiridos independientemente para cada serie de isotópologos por infusión directa en un sistema ESI-QqTOF.

Figura 40. Comparación de factores de respuesta entre pares de isotópologos d_0/d_3 y d_0/d_5 de los ácidos grasos en hígado de bacalao derivatizados con AEPy, específicamente se muestran los espectros de los pares de señales con concentración decreciente (de acuerdo con grado de dilución), así como sus correspondientes curvas de respuesta y parámetros de regresión lineal y ecuación de la función.

Figura 41. Espectros de masas obtenidos de ácidos grasos totales extraídos de diferentes aceites vegetales y derivatizados con AEPy- d_0 . Las soluciones fueron introducidas por infusión directa en un sistema ESI(+)-QqTOF-MS.

Figura 42. Sección de espectros de masas donde aparecen señales de los ácidos grasos de dieciocho carbonos con entre 0 y 3 insaturaciones derivatizados por separado con el sistema de isotópologos AEPy- d_0 y AEPy- d_5 para los ácidos extraídos de los siguientes 5 aceites vegetales: chía a), linaza b), aguacate c), uva d) y ajonjolí e), analizados por infusión directa en ESI-QqTOF.

Figura 43. Cromatograma de ácidos grasos en aceite de menhaden derivatizados con pares de isotópologos AEPy- d_0/d_3 visualizado como mapa de calor.

Figura 44. Cromatograma de ácidos grasos en aceite de menhaden derivatizados con pares de isotópologos AEPy- d_0/d_5 visualizado cómo mapa de calor.

Figura 45. Amplificaciones de las señales correspondientes a ambos sistemas de pares de isotópologos (d_0/d_3 y d_0/d_5) de PUFAs de la serie ω -3 (18:4, 20:5 y 22:6, de acuerdo con lo indicado por el proveedor) y otros potenciales ω -3 encontrados en aceite de menhaden tras ICD con AEPy.

Figura 46. Amplificaciones de las señales correspondientes a ambos sistemas de pares de isotopólogos (d_0/d_3 y d_0/d_5) del VLC-HUFA (very long chain highly unsaturated fatty acid) encontrado en el aceite de menhaden tras ICD con AEPy, y su estructura optimizada en su versión extendida.

Figura 47. Ejemplo de siete niveles de concentración donde se observan cambios relativos de intensidad entre isotopólogos, conteniendo en el canal ligero los estándares de EPA y DHA de concentración decreciente, mientras que en el canal pesado se contienen los “spikes” de estándares internos, ambos generados a partir del CRM con el par de isotopólogos AEPy d_0/d_5 .

Figura 48. Contenidos de EPA y DHA en muestras derivadas de pescado y en alga *P. yezoensis*, determinadas por la relación de los iones con m/z 407.20 y 433.25 respecto a sus estándares internos, correspondientes a los iones con m/z 412.22 y 438.27.

Figura 49. Análisis retrosintético de las rutas para la obtención de los 4 isotopólogos de AMPP. Adaptando y fusionando protocolos reportados para los isotopólogos ligeros en las distintas etapas: 1) (Chukanov et al., 2019). 2) (Tang et al., 2023). 3) (Ushkov & Grushin, 2011). 4) (Khurana & Kukreja, 2002).

Figura 50. Reacción para la formación de la sal de Zincke- d_0 .

Figura 51. Espectros HRMS de los isotopólogos d_0 (a), d_2 (b), d_3 (c) y d_5 (d) de la sal de Zincke (izquierda), y sus respectivos espectros de ^1H NMR (derecha) adquiridos en DMSO con capilar DMSO- d_6 .

Figura 52. Reacción de deuteración del 1-bromo-4-nitrobenzoceno. Se emplearon 202 mg de sustrato, 1 eq de K_2CO_3 , 1 mL de D_2O , 200 μL de MTBE y el catalizador se generó in situ a partir de 20 % mol de Ag_2CO_3 y 60 % mol de PPh_3 .

Figura 53. Espectros de ^1H NMR del sustrato (1-bromo-4-nitrobenzoceno) antes de la deuteración (verde), luego de los primeros dos intentos (naranja y azul) y después de realizar la reacción en la oscuridad (rojo), se observa la disminución significativa de la señal, así como el cambio de doblete a singulete por pérdida del acoplamiento H-H a tres enlaces.

Figura 54. Espectros de resonancia magnético nuclear de deuterio ^2H -NMR del 1-bromo-4-nitrobenzoceno- d_4 (azul), se observan señales con desplazamiento 8.14 y 7.73 ppm, consistente con los desplazamientos de las señales de hidrógeno en ^1H -NMR del sustrato con abundancia isotópica natural (rojo), ajustando la señal residual de hidrógeno del solvente con la señal de su respectivo deuterio, ambos obtenidos en CDCl_3 .

Figura 55. Reacción de cianuración del 1-bromo-4-nitrobenzoceno catalizada por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.

Figura 56. Comparación de espectros de resonancia magnético nuclear ^1H NMR del sustrato 1-bromo-4-nitrobenzoceno (azul) y del producto de cianuración 4-nitrobenzonitrilo (rojo), obtenidos en CHCl_3 con capilar DMSO- d_6 .

Figura 57. Ecuación de reacción esperada de reducción/protección y producto esperado 4-(N-Boc)aminobencilamina.

Figura 58. Espectro del producto dicarbamato obtenido por reducción del 1-nitro-4-brenzonitrilo.

Figura 59. Etapas en la reducción de nitrilos vía hidruros, arriba se representa la formación de un subproducto dimérico por eliminación de amoniaco, en la parte de abajo se puede apreciar cómo la presencia del grupo protector Boc_2O “secuestra” la amina a medida que se forma evitando su reacción con la imina intermediaria lo que derivaría en el subproducto indeseado.

Figura 60. Obtención de los 4 isotopólogos de AMPP vía mecanismo ANRORC.

Figura 61. Esquema general para la síntesis de las picolil-aminas.

Figura 62. γ -picolilamina (Azul), β -picolilamina (Rojo).

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de isotopólogos deuterados de algunos compuestos de interés analítico disponibles comercialmente en Sigma Aldrich®, con utilidad como estándares internos en el análisis por espectrometría de masas.

Tabla 2. Derivatizantes con distintos enlazadores dirigidos al grupo carbonilo que poseen alta afinidad protónica o carga permanente y codificados por isotopos pesados estables (en algunos casos, ver figura 17).

Tabla 3. Parámetros obtenidos de la comparación de factores de respuesta para ambos pares de isotopólogos ($d_0|d_3$ y $d_0|d_5$) de AEPy de cuatro ácidos grasos poliinsaturados presentes en la mezcla de reacción, denotando principalmente los errores relativos de las pendientes entre isotopólogos de cada par, utilizando entre 3 y 5 puntos de dilución y con coeficientes de regresión lineal altos (0.9647-0.9999).

Tabla 4. Composición de lípidos de los aceites empleados para las pruebas de derivatización de acuerdo con las etiquetas de los proveedores, notablemente los proveedores de aceite de chía y de linaza especificaron los porcentajes de omega 3 y 6 dentro de la composición de los lípidos poliinsaturados de dichos aceites.

Tabla 5. Composición porcentual en masa de ácidos grasos contenida en el material de referencia certificado (Cod Liver Oil SA LRAC8228), en el caso de isómeros se muestran agrupados por el nivel de alcance del método utilizado en este trabajo. En los siguientes columnas se representan los valores m/z utilizados para cada uno de los ácidos y su isotopólogo, nivel mínimo (C_m) y máximo (C_M) de concentración, ecuación de calibración y R^2 correspondientes.

Tabla 6. Resultados de determinación de 12 ácidos grasos (SFAs, MUFAs y PUFAs) en muestras reales, incluyendo 7 aceites vegetales, aceite de menhaden, 3 suplementos dietéticos basados en aceites de pescado (CLO: aceite de hígado de bacalao; Pez 1: aceite de pescado sin especificación y Pez 2: aceite de salmón) y alga *P. yezoensis*.

Tabla 7. Cantidad de EPA y DHA en mg por cada 100 mg de aceites de suplementos dietéticos de pescado y en alga comestible *P. yezoensis* mediante el enfoque dirigido empleando derivatización codificada por los isotopólogos AEPy $d_0|d_5$.

Tabla 8. Composición proporcional (%) de los ácidos grasos encontrados en las muestras analizadas y algunos índices nutricionales del potencial efecto en la salud cardiovascular de los aceites (se asume contenido total de omega 3 y omega 6 en los ácidos señalados con uno y dos asteriscos, respectivamente, así como el total de 18:1 en configuración *cis*).

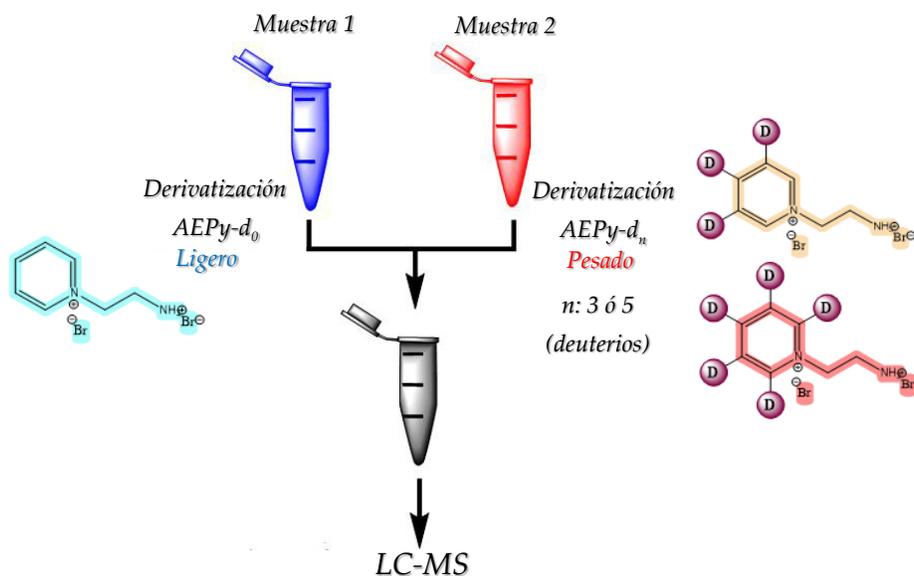
Resumen

La derivatización de inversión de carga codificada por isótopos (CS-ICD, por sus siglas en inglés: Charge-Switch-Isotope-Coded-Derivatization) es una estrategia utilizada en espectrometría de masas para asegurar abundante población de iones en la fase gaseosa en la fuente de ionización y al mismo tiempo permitir la detección simultánea de los iones que fueron derivatizados con dos isotopólogos diferentes del mismo agente derivatizante. El objetivo de este trabajo ha sido sintetizar agentes derivatizantes etiquetados con átomos de deuterio y examinar su utilidad en el análisis exploratorio y cuantitativo de ácidos grasos (FA) en aceites vegetales y en suplementos dietéticos.

En particular, con base en el estado del arte de los agentes derivatizantes aplicados al análisis de FA así como de las estrategias para etiquetado con deuterio, se diseñaron tres derivatizantes CS-ICD.

Derivatizante 1: AEPy

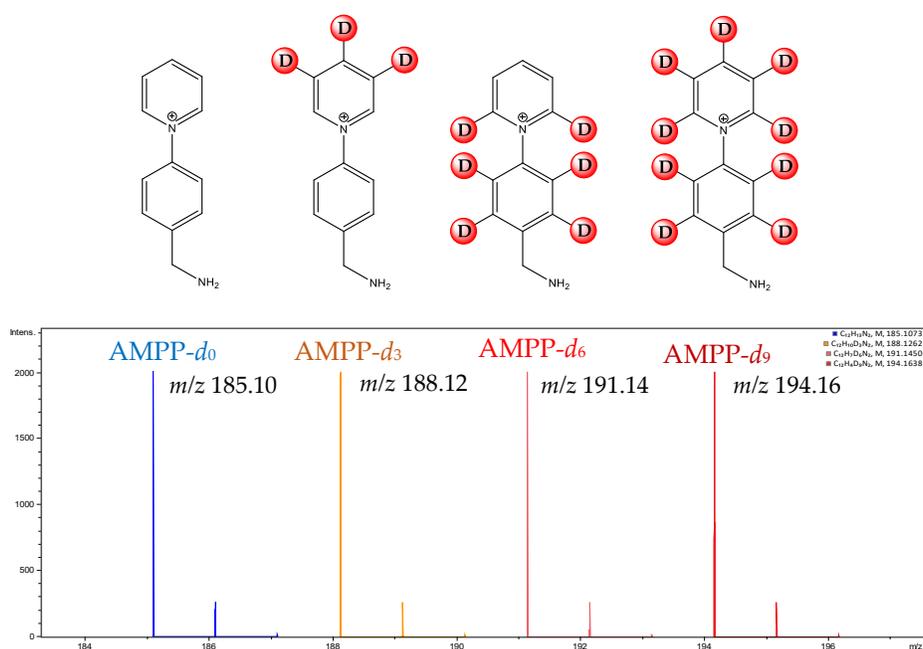
La síntesis de tres isotopólogos se realizó a partir de piridina con abundancia isotópica natural, piridina- d_3 etiquetada en el laboratorio y piridina- d_5 obtenida comercialmente, respectivamente. Las mezclas conformadas por los dos pares de isotopólogos AEPy $d_0|d_3$ y AEPy $d_0|d_5$ fueron evaluadas comparando la reactividad de cada uno de los isotopólogos en la derivatización de los FA y el desempeño de los derivados en el análisis por cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas (LC-MS) con enfoque dirigido y no dirigido (*Esquema 1*).



Esquema 1. Esquema general de aplicación del derivatizante 1 y estructuras de los tres isotopólogos de AEPy.

Derivatizante 2: AMPP

Se seleccionó el compuesto AMPP reportado anteriormente como un derivatizante de los FA, explorando la posibilidad de obtener sus cuatro isotopólogos, cuyas estructuras se presentan abajo. De esta manera, se esperaba poder aumentar el número de canales en la estrategia de multiplexado. En la síntesis, se utilizaron cuatro sintones deuterados en el laboratorio; tres basados en piridina obtenidos mediante intercambio de isótopos de hidrógeno con catálisis básica y uno basado en el 1-bromo-4-nitrobenzene etiquetado con un catalizador de Ag(I). Siguiendo esta propuesta, las diferencias de masa entre cada isotopólogo del derivatizante serían de 3 Da (*Esquema 2*), para su uso simultáneo y potencial análisis comparativo de varias muestras a la vez o análisis fluxional de cambios en el tiempo de la síntesis de metabolitos mediante LC-MS/SM.

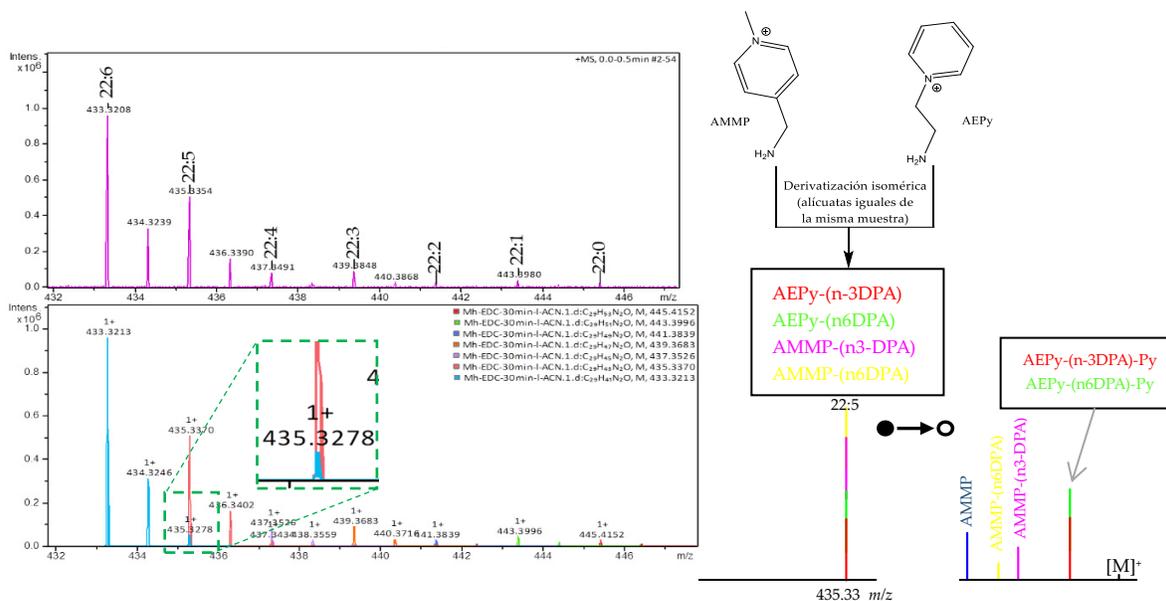


Esquema 2. Estructuras químicas de los 4 isotopólogos del sistema AMPP 4-plex (arriba) y espectro de masas simulado in silico de los iones esperados para los 4 isotopólogos de AMPP (²H₀, ²H₃, ²H₆ y ²H₉) suponiendo contenido del 100% de deuterio en cada caso.

Derivatizante 3: combinación de AEPy y AMMP

El tercer esquema de derivatización se basa en la combinación de AEPy y AMMP, pues estos derivatizantes son isómeros. Aunque típicamente la derivatización isobárica se logra con isotopómeros y/o isotopólogos, en este caso se propone la derivatización por separado de la misma muestra con AEPy y con AMMP para análisis *shotgun*, ambos poseen la misma masa, pero inducen distintos mecanismos de fragmentación. Mientras AMMP genera iones diagnóstico para resolver la posición de dobles enlaces en mezclas de isómeros de ácidos grasos, AEPy genera un solo ion a partir de todos los isómeros de un ácido de la mezcla, el cual se puede usar para normalizar las intensidades de los iones diagnóstico y cuantificar

isómeros en sus mezclas de MUFAS y PUFAs en el nivel MS² (Esquema 3). Generalmente los enfoques *shotgun* que emplean únicamente AMMP (o AMPP, el cual también induce formación de iones diagnóstico durante fragmentación) suelen normalizar los iones diagnóstico respecto a un ion de baja masa generado por el mismo derivatizante (representado en azul en el esquema 3), sin embargo, las interferencias espectrales causadas por ácidos con una insaturación más contribuyen en la producción de este ion y generan errores de cuantificación.



Esquema 3. Amplificación de espectro experimental obtenido por infusión directa (izquierda, morado) de ácidos en muestra real (aceite de menhaden) derivatizados con AEPy y su respectivo espectro teórico descompuesto en colores de acuerdo con las contribuciones de los patrones isotópicos de cada ácido presente en la muestra (izquierda, abajo), la amplificación del ion de m/z 435.33 muestra las contribuciones del ácido 22:6 en el pico monoisotópico del ion 22:5 (DPA), lo que en la fragmentación contribuiría en el ion azul etiquetado como AMMP (espectro hipotético de MS/MS, figura derecha, pico azul) si se hubiese empleado tal derivatizante en lugar de AEPy. Del lado derecho se esquematiza el enfoque propuesto, basado en la derivatización isobárica con los isómeros AMMP y AEPy indistinguibles en MS¹. Por su parte, cada uno de ellos induce fragmentaciones bien definidas, de migración de carga en AEPy y de carga remota en AMMP, de modo que los iones diagnóstico en mezclas $w-3$ y $w-6$ procedentes del ion correspondiente al ácido 22:5 se generan por AMMP (rosa y amarillo), mientras que AEPy genera un solo ion común por pérdida neutra de piridina conteniendo ambos analitos de la mezcla. Si la derivatización se realiza en paralelo y a partir de la misma cantidad de analito, la cuantificación debería ser más confiable que usar un ion procedente del derivatizante AMMP, el cual tiene contribuciones de interferencias espectrales de MS¹ (específicamente de 22:6).

La tesis contiene cinco capítulos. En el capítulo uno se da una introducción de varios temas de relevancia para el proyecto, de inicio se abordan los desarrollos tecnológicos en la espectrometría de masas gracias a los cuales los isótopos estables han cobrado terreno en el desarrollo metodológico para el análisis cuantitativo. A continuación, se introduce el concepto y principio de estándar interno y de la dilución isotópica molecular, y se muestran ejemplos particulares de estándares internos marcados con deuterio. Se explora el estado del arte de dos enfoques de derivatización que muchas veces co-existen en el análisis de

ácidos grasos: la derivatización codificada por isótopos y la derivatización de inversión de carga. Se abordan también los mecanismos de fragmentación típicos de los FA derivatizados y se discute cómo estos mecanismos se han aprovechado para fines de elucidación estructural y de cuantificación. Finalmente se describen estrategias para el marcaje con deuterio con potencial aplicación dentro del proyecto de tesis, empleando catálisis básica y metales de transición, específicamente sales de Ag(I).

En el capítulo dos se definen los objetivos particulares y generales del presente trabajo de tesis.

En el capítulo tres se enlistan los reactivos utilizados, materiales y suplementos, se describen los equipos analíticos empleados para llevar a cabo los análisis, así como los softwares mediante los cuales se controlaron los equipos y se procesaron los datos.

En el capítulo cuatro se presentan y discuten los resultados obtenidos para cada uno de los derivatizantes diseñados. La mayor parte de los resultados corresponden al uso del derivatizante 1, AEPy. Se sintetizaron y caracterizaron sus tres isotopólogos y se llevó a cabo la selección de parámetros de reacción para la derivatización de ácidos grasos de cadena corta, media y larga, además se seleccionaron los parámetros instrumentales para la detección de los FA derivatizados con AEPy. Se comparó el desempeño de los tres canales demostrando la viabilidad de los isotopólogos pesados para utilizarse como estándares internos. Finalmente se aplicaron los dos sistemas de derivatizante, cada uno de ellos compuesto por dos isotopólogos, al perfilado no dirigido de FA en aceite de menhaden mediante análisis LC-MS. El sistema AEPy d_0/d_5 fue utilizado para la cuantificación de FA en varias muestras de aceites vegetales y de suplementos dietéticos basados en aceite de pescado. En el caso de los derivatizantes 2 y 3 (AMPP 4-plex y AMMP-AEPy) solamente se avanzó en la síntesis parcial sin concretarla con éxito, sin embargo, para el caso de AMPP se prepararon varios sintones etiquetados regioselectivamente con deuterio.

Los resultados obtenidos durante el proyecto de tesis permitieron elaborar una serie de conclusiones que se enlistan en el capítulo cinco. Al final del texto se pueden encontrar figuras anexas referidas a lo largo de la discusión de los resultados de manera complementaria.

I. INTRODUCCIÓN

Capítulo I. Introducción

I.1. Uso de isótopos estables en análisis cuantitativo por espectrometría de masas

Históricamente el uso de isótopos estables (IE) en investigación y el desarrollo instrumental y metodológico de la espectrometría de masas (MS) han evolucionado sinérgicamente. Entre las primeras aportaciones en el área de espectrometría de masas se encuentra el entendimiento de la naturaleza isotópica de los elementos, inicialmente con el hallazgo del ^{22}Ne por J.J. Thomson, quién luego de aislar el $[\text{CO}_2]^+$ y descartar que la fracción de m/z 22 observada en su espectrógrafo de masas parabólico se tratara de $[\text{CO}_2]^{2+}$ (figura 1), pudo afirmar que lo observado era “una pequeña fracción de neón” con intensidades relativas alrededor de 9:1 (Münzenberg, 2013a).

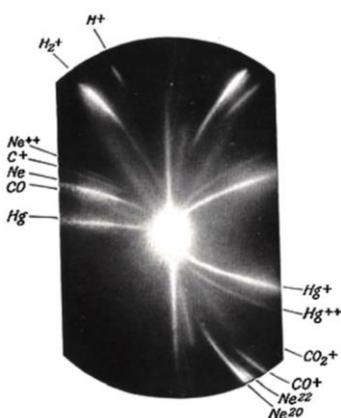
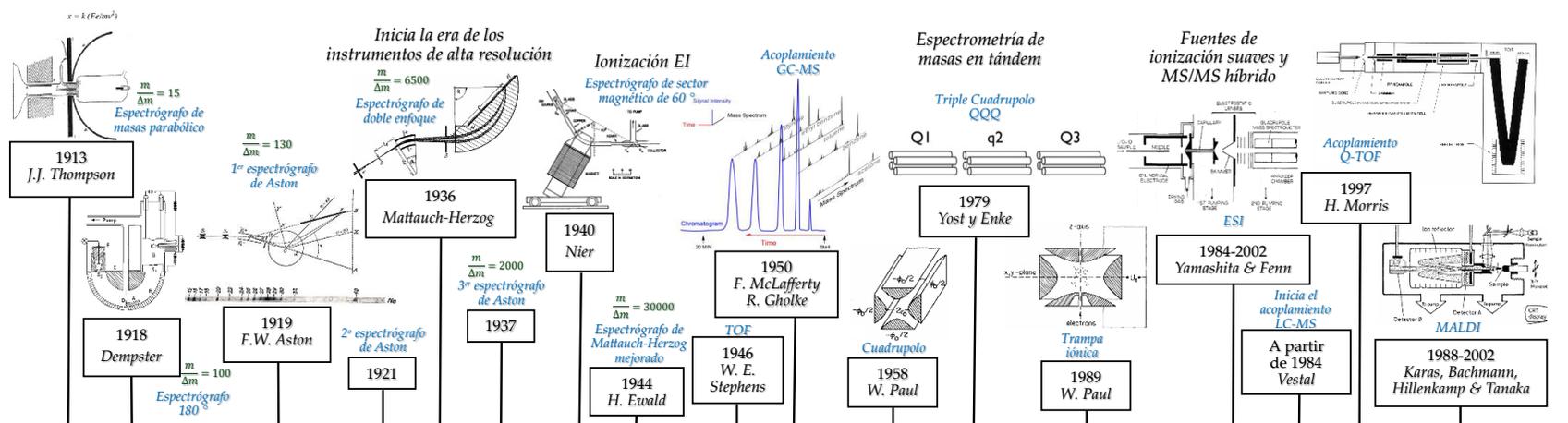


Figura 1. Espectro obtenido con el espectrógrafo de masas parabólico de J.J. Thomson en 1913, se pueden observar en el cuadrante inferior derecho las líneas correspondientes a los isótopos de neón ^{20}Ne y ^{22}Ne .

Unos años más tarde, su discípulo F.W. Aston encontró un tercer isótopo de Ne aún menos abundante (~0.3%) de masa 21 u. Debido a sus importantes contribuciones, Thomson es considerado el “padre de la espectrometría de masas” y Aston el “padre de los isótopos”.

La espectrometría de masas actual ofrece alta sensibilidad y cobertura de un gran número de metabolitos por su capacidad de detección y de acoplamiento con técnicas separativas (cómo LC y GC). Además, hoy en día en MS los isótopos estables poseen un terreno de aplicaciones amplio y consolidado, por ejemplo, el trazado metabólico, el análisis cuantitativo, la elucidación de mecanismos de fragmentación de iones en fase gas (Thomas, 1971), entre muchos otros. El etiquetado isotópico sirve como herramienta para investigación por espectrometría de masas, pero a su vez la espectrometría de masas resulta una excelente herramienta para monitorear y cuantificar procesos de marcaje/enriquecimiento isotópico (Gross, 2004). En ese sentido, existen dos principales convenciones para denotar las abundancias isotópicas: la primera es igualando la suma de las intensidades de las contribuciones isotópicas al 100%, y la segunda es normalizando la intensidad del isótopo más abundante al 100%.



Coevolución entre el uso cuantitativo de isótopos estables y el desarrollo instrumental en espectrometría de masas

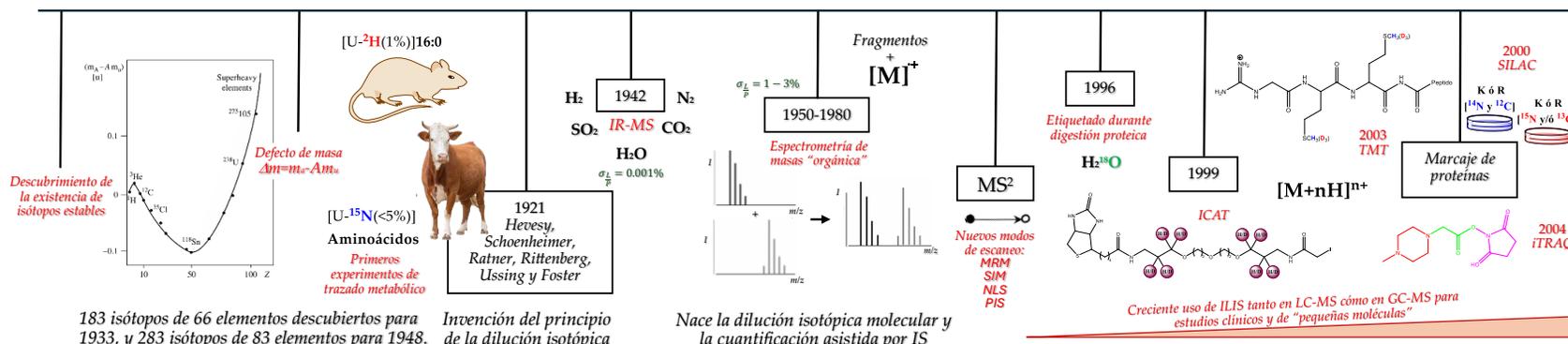


Figura 2. Línea del tiempo "Coevolución entre el uso cuantitativo de isótopos estables y el desarrollo instrumental en espectrometría de masas", plasma algunos aspectos importantes recopilados independientemente por Becker, 2007; Lehmann, 2017 y Münzenberg, 2013, sobre el desarrollo tanto de la instrumentación en espectrometría de masas como en el uso cuantitativo de isótopos estables aplicado al estudio de ciencias de la vida.

La línea del tiempo mostrada en la *figura 2* busca plasmar algunos eventos clave estrechamente correlacionados en el tiempo tanto del desarrollo instrumental de la espectrometría de masas, así como del surgimiento de aplicaciones cuantitativas basadas en isótopos estables (IE) para estudios en ciencias de la vida. Partiendo de la invención del principio de la dilución isotópica (atribuida a Hevesy y otros autores) en la que se requerían muy bajos niveles de enriquecimiento (Rittenberg & Foster, 1940; Schoenheimer & Rittenberg, 1938; Ussing, 1939), con el uso de la técnica MS de relación isotópica (IR-MS), la cual implica la conversión química de los analitos en pequeñas moléculas (Nier et al., 1940), ofreciendo una precisión relativa de los datos de relación isotópica del 0.001% de abundancia relativa de señales entre isotopólogos, de tal modo que la adición de un trazador marcado con un exceso del 5% de átomos de ^{15}N resultaba suficiente con alcance a factores de dilución de hasta 10^3 y 10^4 (Lehmann, 2017). Pasando luego por el acoplamiento GC-MS y su aplicación a compuestos orgánicos, esto incrementó los experimentos metabólicos y la cuantificación asistida por estándares internos etiquetados con IE (principalmente en pequeñas moléculas), con precisión relativa en la medición de abundancias isotópicas entre isotopólogos del 1-3%, para mezclas con relación entre 1:10 y 10:1 (Eneroth et al., 1966; Horning et al., 1974), por tratarse de fragmentos moleculares a diferencia de IR-MS. Posteriormente, la introducción de las técnicas de ionización suaves (ESI y MALDI) despertó el interés por experimentos de etiquetado in vivo con células y organismos completos (Ong et al., 2002). La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) que incluye fragmentación de iones precursores en celdas de disociación por colisión (CID) o sistemas tales como triple cuadrupolo (QQQ) o cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) permitió nuevos modos de escaneo y adquisición. El acoplamiento con cromatografía de líquidos LC-MS/MS fue definitivamente más desafiante, pero expandió la cobertura hacia analitos poco volátiles y directo en solución (ESI) o co-cristalizados con una matriz química (MALDI). Aunque al inicio la proteómica cuantitativa no implicó IE, la necesidad de datos cuantitativos precisos para estudios biológicos por proteómica basada en MS desencadenó el surgimiento de nuevas estrategias de etiquetado con IE aplicadas a péptidos, proteínas, células y organismos completos (Chahrour et al., 2015; Flory et al., 2002). Además, la cuantificación a partir de espectros MS^2 no sólo permitió incrementar la relación señal/ruido, sino que también inspiró el diseño de diversos enfoques cuantitativos entre los que se incluyen (pero no se limitan a) las famosas etiquetas químicas isobáricas (TMT y iTRAQ) para análisis simultáneo de varias muestras sin complicar los espectros MS (Ross et al., 2004a; Thompson et al., 2003). Antes de presentar algunos de los enfoques más populares que han surgido para mejorar la confiabilidad de los datos cuantitativos sirviéndose de isótopos estables, es importante esquematizar las dimensiones analíticas en las que se puede resolver el marcaje isotópico. La alta similitud de propiedades fisicoquímicas entre los análogos isotópicos implica que éstos se comporten igual durante ciertas etapas de los flujos de trabajo, cómo la

extracción/preparación de la muestra, la separación cromatográfica (con excepciones) y la ionización, manteniendo a los isotopólogos y/o isotopómeros en la mezcla equivalentes e indistinguibles. Por otra parte, el contenido específico de neutrones en sus núcleos permite la detección individual de isotopólogos del mismo elemento/compuesto en las dimensiones de masas y de masas en tándem (MS^1 y MS^n), dependiendo de su estructura. Por ejemplo, en el nivel de MS^1 no podemos distinguir isotopómeros de un mismo isotopólogo (pues son isóbaros), pero sí en MS^2 siempre que su mecanismo de fragmentación resuelva los sitios etiquetados. Esta estrategia ha sido explotada extensamente en el diseño de experimentos, de tal modo que existen (además del análisis libre de etiquetas) dos principales enfoques: (i) etiquetado tradicional o no-isobárico y (ii) etiquetado isobárico (figura 3).

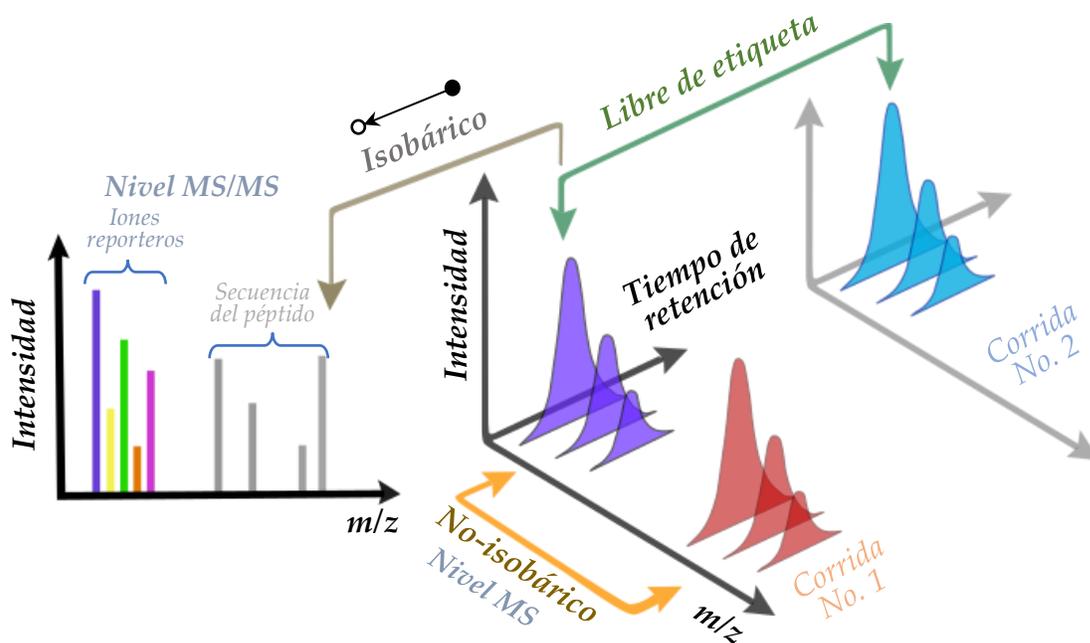


Figura 3. Dimensiones analíticas: separación cromatográfica (tiempo de retención) y de espectrometría de masas y de masas en tándem (m/z en MS y en MS/MS), en las que se resuelven respectivamente los experimentos libres de etiqueta (verde), de etiquetado no isobárico (amarillo) y de etiquetado isobárico (café), adaptado de Tyanova et al., 2016.

Los experimentos de etiquetado no-isobárico consisten en la derivatización paralela de distintas muestras con dos o más isotopólogos del mismo derivatizante (o enriquecimiento durante el cultivo o la digestión proteica, como son los casos de SILAC o marcaje proteolítico con $H_2^{18}O$, respectivamente), es el enfoque clásico para etiquetado químico (no isobárico) y proteómica cuantitativa. Después de la derivatización, las muestras se mezclan en conocida proporción de tal manera que cada especie derivatizada presente en ambas muestras genera un doblete (o multiplete en función de los canales). Como resultado del análisis LC- MS^1 de la mezcla es fácil detectar los iones derivatizados y comparar sus abundancias relativas entre dos muestras en un solo cromatograma. Algunos ejemplos de

este tipo de enfoque son las etiquetas de dimetilo (J. L. Hsu et al., 2003) e ICPL (isotope-coded protein labeling) (Schmidt et al., 2005), los cuales poseen el grupo amino como diana de derivatización. En cambio, para el etiquetado isobárico, la derivatización de distintas muestras/tratamientos puede llevarse a cabo utilizando variantes isotópicas de un compuesto que tienen la misma masa nominal, conferida por isotopómeros; tal es el caso de TMT (tandem mass tag) (Dayon et al., 2008; Thompson et al., 2003) e ICAT (isotope-coded affinity tags) (Gygi et al., 1999). Otra opción es el método iTRAQ (isotope coded tags for relative and absolute quantification) (Choe et al., 2007; Ross et al., 2004b), donde se emplea una mezcla de isotopólogos e isotopómeros los cuales distribuyen las etiquetas a través de un “balanceador de masa” y la región precursora de “iones reporteros” con variada cantidad de isotopos estables de distintos elementos, de manera que al mezclarse e introducirse al espectrómetro de masas coalescen en una sola señal en el espectro MS^1 , pero tras la fragmentación de dicho ion (MS^2) se observa un conjunto de señales resueltas en la región de baja m/z generadas por los “iones reporteros”, lo que permite la cuantificación a partir de la comparación de intensidades relativas. Cabe señalar que TMT y iTRAQ aprovechan unión al grupo amino, mientras que ICAT tiene como diana los grupos cisteína.

Una importante ventaja de TMT y iTRAQ es su alta capacidad de multiplexado de muestras (Werner et al., 2012, 2014). Sin embargo, los métodos de etiquetado no-isobárico también tienen cierta habilidad de multiplexado, por ejemplo, el etiquetado 3-plex con dimetilo (Boersema et al., 2009) y el derivatizante 96-plex dirigido a metabolitos con funcionalidad de ácido carboxílico reportado recientemente (Armbruster et al., 2023).

Por otro lado, en el caso de análisis proteómico, se pueden obtener péptidos enriquecidos principalmente insertando aminoácidos pre-etiquetados durante la síntesis peptídica, mimetizando la secuencia de la proteína o fragmento de interés y permitiendo así la cuantificación absoluta de péptidos (AQUA, por Absolut QUAntitation) (Gerber et al., 2003). PASTA (Phosphorus-based absolutely quantified standard peptides) es otra estrategia cuantitativa específicamente para fosfopéptidos basada en la medición de ^{31}P mediante ICP-MS tras desfosforilación (Zinn et al., 2009). El análisis de aminoácidos (AAA-MS) ofrece la posibilidad de cuantificar estándares de péptidos etiquetados usando aminoácidos ligeros como estándares internos, de modo que aminoácidos etiquetados y no etiquetados (método inverso) pueden ser usados como estándares adaptados a la composición isotópica de los péptidos de interés (Mirgorodskaya et al., 2012). Los estándares de proteínas para cuantificación absoluta (PSAQ, por sus siglas en inglés) se obtienen mediante células transfectadas recombinantemente, purificadas, y luego cuantificadas por AAA (Picard et al., 2012). El estándar RISQ (cuyas siglas corresponden con: recombinant isotope-labeled and selenium-quantified) consiste en proteínas recombinantes (con expresión libre de células) que contienen aminoácidos etiquetados con isotopos estables además de SeMe, se

cuantifican por infusión directa por ICP-MS después de purificación por electroforesis en gel (Zinn et al., 2010).

Las reacciones de sustitución, condensación e hidrólisis (por ejemplo, sobre grupos de éster, amidas, ácidos carboxílicos, epóxidos, etc.) se pueden trazar usando ^{18}O , principio también llamado etiquetado por intercambio de oxígeno. Dicho marcaje se puede llevar a cabo de manera sintética o mediado por reacciones enzimáticas catalizadas por tripsina y transaminasas (Sprinson & Rittenberg, 1951). Se han descrito protocolos de digestión modificando pH, temperaturas y diferenciando las etapas de digestión/etiquetado (Qian et al., 2011; Staes et al., 2004), habilitando la cuantificación precisa con uso de estándares internos basados en ^{18}O . Además, se ha demostrado que el desempeño cuantitativo del marcaje con ^{18}O es comparable con el etiquetado SILAC (Gevaert et al., 2008). Así, la digestión de proteínas en H_2^{18}O genera péptidos etiquetados con uno o dos ^{18}O en el carbono terminal, con la característica de que los fragmentos de péptidos en MS^2 conservan la etiqueta solamente en series de fragmentos *y*, mientras que las series de ion *b* permanece sin etiqueta (Schnölzer et al., 1996). El principio anterior se ha expandido a numerosos metabolitos de ácido araquidónico, usando estándares etiquetados con ^{18}O para la cuantificación de HETE's (acrónimo en inglés de ácidos hidroxieicosatetraenoicos) (Lehmann et al., 1992; Strife & Murphy, 1984; Westcott et al., 1985).

Como se vio en la línea del tiempo de la *figura 2*, el marcaje con isótopos estables vía aminoácidos en cultivos celulares (SILAC, por sus siglas en inglés) se introdujo en 2002. Es una estrategia adecuada para el análisis de la expresión proteica a través de la aplicación de lisina y arginina etiquetadas con ^{13}C ó ^{13}C y ^{15}N creciendo organismos o cultivos celulares en paralelo y por separado en dos medios, uno con aminoácidos ligeros y otro con los pesados (Mann, 2014; Ong et al., 2002), el marcaje se resuelve en el primer nivel MS. En plantas y microorganismos, el uso de etiquetado con aminoácidos pesados individuales se ha visto limitado por la naturaleza autótrofa de estos organismos, pues son capaces de sintetizar aminoácidos de *novo*. Una práctica alternativa ampliamente extendida consiste en suministrar los medios de cultivo celulares (Martin et al., 2012; Mastrobuoni et al., 2012) o los medios de enraizamiento con $^{15}\text{NO}_3^-$ o $^{15}\text{NH}_4^+$ (Nelson et al., 2014).

Además de explorar la dimensión analítica en la que se resuelve el marcaje isotópico, es importante tener en cuenta en qué etapa del flujo analítico se introduce dicha etiqueta. La *figura 4* compara las etapas en las que cada una de las estrategias antes descritas introduce las respectivas etiquetas de isótopos estables (o no, en el caso libre de etiqueta): (i) *in vivo* (SILAC y etiquetado con ^{15}N a partir de sales inorgánicas), (ii) *in vitro*, (a) etiquetado químico tanto no-isobárico (ICAT, Dimetil, ICPL, etc.) como isobárico (TMT e iTRAQ), y (b) de intercambio de oxígeno ^{18}O asistido por catálisis enzimática y (iii) análisis libre de etiqueta.

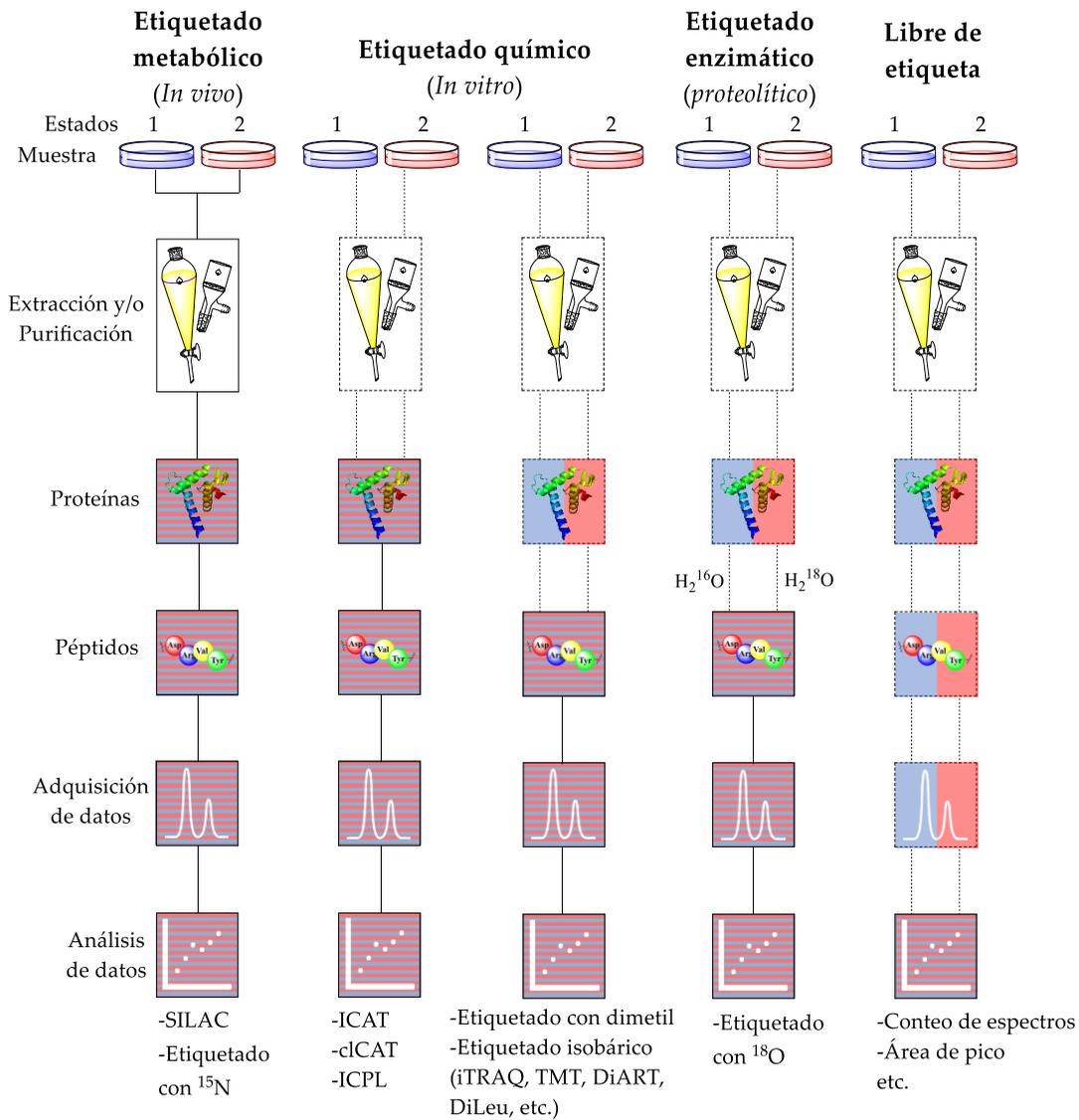


Figura 4. Los estados 1 y 2 representan dos muestras o condiciones experimentales a comparar. Las líneas continuas indican la etapa en que se reúnen las muestras de ambos estados (marcadas con par de reactivos conteniendo isótopos ligero/pesado, con reactivos isóbaros o libres de marcaje) para tratarse por igual en las etapas precedentes. Las líneas discontinuas indican los puntos de tratamiento individual de ambos estados. Adaptado de X. Chen et al., 2021.

Pese a las virtudes y ventajas de algunos de estos enfoques, la introducción de etiquetas en etapas tardías implica más pasos de procesamiento de muestras por separado antes de reunir los tratamientos, lo que puede acarrear errores de cuantificación y variaciones experimentales (X. Chen et al., 2021). Si bien el marcaje *in vivo* permite reunir y procesar las muestras juntas desde etapas tempranas, la incorporación de isótopos pesados en las condiciones de crecimiento de los organismos puede implicar efectos isotópicos, y desencadenar perturbaciones (en menor o mayor medida) del desarrollo de cada estado a

comparar. Las magnitudes de estos efectos son proporcionales a la diferencia relativa de masa entre las especies isotópicas (Wieser & Brand, 1999), por lo que el tritio seguido por el deuterio presenta más fuertes efectos isotópicos respecto al hidrógeno (J. Yang, 2016), entre los distintos bioelementos.

Los procesos de variaciones de relación isotópica son otra área importante de análisis cuantitativo por MS, se dividen en tres categorías generales: (1) Reacciones de intercambio isotópico, de tal manera que los isótopos de un elemento se redistribuyen en diferentes moléculas o en diferentes fases dentro de un equilibrio termodinámico; (2) procesos unidireccionales donde las velocidades de reacciones de las especies isotópicas difieren; y (3) decaimiento radiogénico (éste último no se abordará).

Los efectos isotópicos de equilibrio implican la redistribución de los isótopos (sea pX el pesado y lX el ligero) de un elemento (X) a lo largo de diferentes fases o compuestos (A y B). La descripción matemática de las relaciones de abundancia isotópica de diferentes especies en la reacción se expresa como el factor de fraccionamiento “ α ”.

$$\alpha_{A-B} = \frac{({}^pX/{}^lX)_A}{({}^pX/{}^lX)_B}$$

Los efectos isotópicos cinéticos son observados en procesos unidireccionales (cómo la difusión, evaporación, reacciones químicas) donde la velocidad de reacción depende de las masas de las moléculas reaccionantes, afectando las frecuencias vibracionales (y por ende las energías de punto cero) y la energía de activación para alcanzar el estado de transición en la superficie de energía potencial durante la ruptura/formación/transposición de enlace(s) (Ingemann et al., 1989; Maccoll, 1974; Veith, 1979). Dada la misma cantidad de energía cinética, las moléculas de baja masa m_1 reaccionarán a velocidad $\sqrt{(m_2/m_1)}$ más rápido que las moléculas pesadas de masa m_2 .

HRMS posee la capacidad para distinguir entre dos especies isotópicas, y como ya se ha mencionado el etiquetado isotópico es utilizado para aplicaciones tanto mecánicas como analíticas (Robinson & Holbrook, 1972). La espectrometría de masas mide abundancia de iones contra su relación m/z , y es una práctica común que se use la relación $I_H/I_D = k_H/k_D$ como una medición directa del efecto isotópico. El procedimiento típico para determinar efectos isotópicos a partir de las relaciones de intensidades es resolviendo una serie de ecuaciones simultáneas (Benoit & Harrison, 1976; Bertrand et al., 1973; Howe & Mclafferty, 1971; Lau et al., 1974), sin embargo, esta aproximación sólo es válida cuándo las especies estudiadas poseen una distribución pequeña de energía interna (Gross, 2004; Ingemann et al., 1991), la cual se puede determinar mediante espectrometría de masas por análisis de rendimiento de supervivencia (survival yield analysis) (Kertesz et al., 2009).

Finalmente, con el fin de garantizar la consistencia inter e intra-laboratorio, los menores cambios en las relaciones isotópicas son expresados por convención usando la notación delta (δ) declarando la desviación de la relación de abundancia isotópica de un elemento en una muestra respecto a un estándar definido en partes por mil (‰), que refleja las abundancias nominales terrestres de dicho elemento. Es una de las aplicaciones vigentes de IR-MS.

$$\delta^{pX} = \left[\frac{(\frac{pX}{lX})_{muestra} - (\frac{pX}{lX})_{referencia}}{(\frac{pX}{lX})_{referencia}} \right] \times 1000$$

Valores δ positivos indican que la muestra es relativamente enriquecida en el isótopo pesado (pX) del elemento (X) con respecto a la referencia, mientras que los valores negativos de δ representan muestras que están relativamente agotadas en el isótopo pesado comparado con el materia de referencia (Wieser & Brand, 1999).

I.2. Compuestos deuterados como estándares internos

El análisis cuantitativo por espectrometría de masas (al igual que otras técnicas) busca una función que describa la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito. Los principales factores que influyen en el desempeño cuantitativo de MS están relacionados con el instrumento (parámetros de la fuente de iones, eficacia de transmisión de iones, eficacia de detección y contaminación de las partes del espectrómetro) y con la composición de la muestra (eficacias de ionización, concentración, estabilidad/degradación, preparación de la muestra y distintos tipos de interferencias). Estos factores en su conjunto producen una importante variación de resultados entre distintos analitos y entre distintas corridas analíticas (Urban, 2016). El método de calibración externa implica la construcción de curvas de calibración con estándares auténticos, asumiendo que el factor de respuesta instrumental permanecerá inmutable en muestras reales, sin embargo, en la práctica real la variada composición de las muestras problema causan a menudo el “efecto de matriz”. Dicho efecto provoca cambios en los factores de respuesta instrumental para los analitos de interés (Villanueva et al., 2014). En ese sentido el método de estándar interno y el análisis por dilución isotópica son ampliamente utilizados para corregir estos problemas.

El método de estándar interno se basa en la comparación de la señal analítica de la especie a cuantificar con la de un compuesto de referencia llamado “estándar interno” (IS). Idealmente la molécula a usar como estándar interno debe ser lo más similar posible al analito en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas de importancia en el procedimiento realizado, con el fin de que sufran los mismos efectos durante las distintas etapas del flujo de trabajo. La normalización de la señal del analito por el de IS permite corregir diferentes tipos de errores tanto procedurales como debidos a la adquisición de la señal. En el método de IS, el IS se agrega a todas las soluciones de calibración y a las muestras manteniendo la

concentración del IS constante y definiendo la señal analítica como M_x/M_{is} . La función de calibración se obtiene por el método de regresión lineal a partir de la relación de intensidades de señales (I_x/I_{is}) correspondientes al compuesto de interés (X) y al estándar interno (IS), y con dicha ecuación se puede hacer un despeje simple para calcular la cantidad de compuesto presente en la muestra (M_x). Los estándares internos se pueden clasificar en tres categorías: isotopólogos del analito también conocidos como ILIS (Isotope-Labeled Internal Standard), análogos estructurales AIS (Analog Internal Standard) y compuestos de estructura no relacionada (aunque muchas veces pertenecen a la misma familia química que el analito) también llamados URIS (Structurally Unrelated Internal Standard) (Bodnar-Broniarczyk et al., 2019). Los de tipo ILIS son los mejores para corregir las pérdidas en las extracciones y los efectos de matriz durante la introducción de muestra.

El método de dilución isotópica (también conocido como método de dilución de isótopo estable, SID por sus siglas en inglés) suele considerarse un caso especial del método de estándar interno (específicamente de tipo ILIS) (Meija & Mester, 2008), siendo necesario contar con isotopólogos de cada analito como estándares internos. Con este método se cuenta con una referencia absoluta, que son los coeficientes de respuesta entre ambos isotopólogos, incluso se suele emplear este método para establecer concentraciones de estándares. El procedimiento consiste en la adición de una cantidad conocida de estándar interno a una muestra con concentración desconocida, de modo que la relación de intensidades de ambos isotopólogos es utilizada para medir sus proporciones relativas (Hoffmann Edmond de, 2007). Suponiendo que hay N átomos o moléculas en la mezcla que rinden un pico cuya característica es la masa m , y que hay M átomos o moléculas del compuesto etiquetado en la sustancia que rinde un pico característico con masa $m + n = o$, donde n corresponde al desplazamiento de masa causado por la introducción de isótopos en el IS. La relación R_{mo} de las intensidades de los iones sobre las masas m y o viene dado por:

$$R_{mo} = \frac{NP_m + MQ_m}{NP_o + MQ_o}$$

Dónde P_m , P_o , Q_m , Q_o son las abundancias isotópicas relativas que contribuyen en los picos m y o , tanto del compuesto natural (P) así como del producto etiquetado (Q). Debido a que P_m , P_o , Q_m , Q_o y M son conocidos, y R_{mo} puede ser deducido a partir del espectro de la mezcla de isotopólogos, luego, el valor de N puede ser precisamente calculado (figura 5).

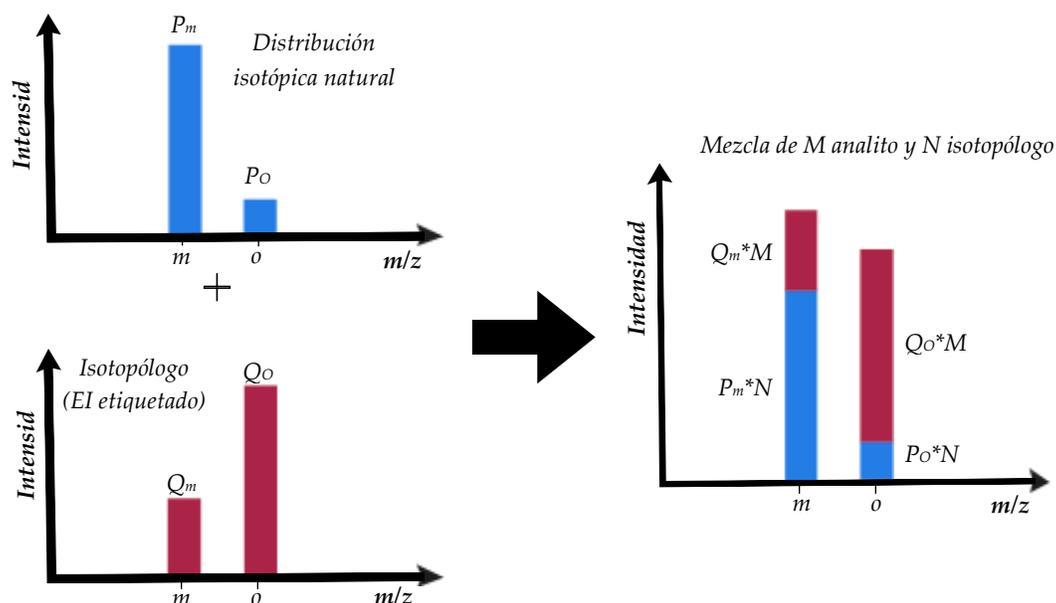


Figura 5. Principio de la dilución isotópica para una especie con dos isótopos de masa m y o , del lado izquierdo arriba se muestra la distribución isotópica natural del analito a cuantificar, abajo a la izquierda el patrón isotópico del spike o estándar interno enriquecido del isótopo con masa $m + n = o$; del lado derecho se observa la combinación de los patrones isotópicos luego del mezclado de ambos en cantidades N y M , respectivamente. Adaptado de (Hoffmann Edmond de, 2007).

Si A representa el número de Avogadro, x e y representan la cantidad de producto natural y de producto etiquetado añadido a la muestra, respectivamente, mientras que E y F representan las masas moleculares del producto natural y del producto etiquetado, respectivamente, entonces la ecuación es:

$$R_{mo} = \frac{(Ax/E)P_m + (Ay/F)Q_m}{(Ax/E)P_o + (Ay/F)Q_o}$$

O, simplemente:

$$R_{mo} = \frac{(x/y \times P_m/E) + Q_m/F}{(x/y \times P_o/E) + Q_o/F}$$

Esta ecuación corresponde a la ecuación de la curva (la cual no es una línea recta en todos los casos, más bien depende de las abundancias isotópicas relativas normalizadas, de la naturaleza y porcentaje de enriquecimiento de los isótopos introducidos).

Si P_o y Q_m son cero (esto implica que los isotopólogos no producen interferencia espectral o solapamiento de patrones isotópicos que interfieran en la medición de cada uno de ellos, al ser mezclados), entonces la ecuación se convierte en:

$$R_{mo} = \frac{x}{y} \times \frac{P_m}{Q_o} \times \frac{F}{E}$$

Esta ecuación corresponde a una línea recta que pasa por el origen.

Existen muchos estándares internos etiquetados con isótopos pesados que pueden ser adquiridos comercialmente cubriendo un amplio intervalo de compuestos de interés analítico, sin embargo, son compuestos de costo elevado y no cubren toda la gama de posibles analitos. En la *tabla 1* se presentan algunos ejemplos.

Compuesto	Precio ¹	Cantidad	CAS No.
Ácido palmítico-2,2- <i>d</i> ₂	\$8,453.00	1 g	62689-96-7
Ácido esteárico-2,2- <i>d</i> ₂	\$11,507.00	1 g	19905-58-9
Ácido indol-3-acético-2,2- <i>d</i> ₂	\$10,753.00	100 mg	24420-86-8
Colestanol- <i>d</i> ₅	\$10,482.00	1 mg	2260669-14-3
Campesterol- <i>d</i> ₆	\$20,254.00	1 mg	2260669-13-2
Colesterol-2,2,3,4,4,6- <i>d</i> ₆	\$27,409.00	100 mg	92543-08-3
Mezcla de aminoácidos deuterados ²	\$6,184.00	10 mL	SMB00917 ³

¹ Precio en peso mexicano (MXN).

² Los aminoácidos contienen diferente cantidad de deuterios (entre 2 y 10 átomos de deuterio).

³ Corresponde a un número de catálogo.

Tabla 1. Ejemplos de isotopólogos deuterados de algunos compuestos de interés analítico disponibles comercialmente en Sigma Aldrich®, con utilidad como estándares internos en el análisis por espectrometría de masas.

Típicamente los IS disponibles comercialmente contienen entre 2-5 deuterios, con alta pureza isotópica, pero es importante considerar que a menor número de hidrógenos sustituidos por deuterios en el IS (o en general baja diferencia de masa entre el analito y su isotopólogo) incrementa la probabilidad de solapamiento espectral y esto compromete el rango dinámico, por lo tanto, es deseable que el IS contenga al menos 3 deuterios y sea de adecuada pureza isotópica (Murphy, 2014). Además del incremento de masa al menos de 3-5 u, resulta ventajoso que la contribución isotópica de remanente natural en el compuesto enriquecido (Q_m) sea menor al 0.5%, para conseguir adecuados rangos de ratio entre ambos isotopólogos y lograr la corrección por estándar interno en un amplio rango de concentraciones de analito (Triebel & Wenk, 2018).

Algunas casas comerciales que ofrecen en sus catálogos diversas moléculas enriquecidas con isótopos pesados (principalmente ²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O ó ¹⁸O) son *Laboratorio de Isótopos pesados*

de Cambridge, Isotec de Sigma Aldrich, Alsachim de Shimadzu, Medical Isotopes Inc., Trace Science International, Omicron Biochemicals Inc. entre otros.

Teniendo en cuenta el alto precio y la limitada accesibilidad de los IS comerciales, una alternativa extensamente utilizada es sintetizar por cuenta propia los IS en el laboratorio, pero la complejidad estructural, la naturaleza multietapa de las síntesis y la necesidad de contar con precursores enriquecidos isotópicamente lo convierte en una tarea altamente desafiante. Como ejemplo en la *figura 6 (a y b)* se muestran alternativas de síntesis total de ácido linoleico y de ácido araquidónico (Osbond et al., 1961; Raphael & Sondheimer, 1950; Stoffel, 1965; Zografos, 2016).

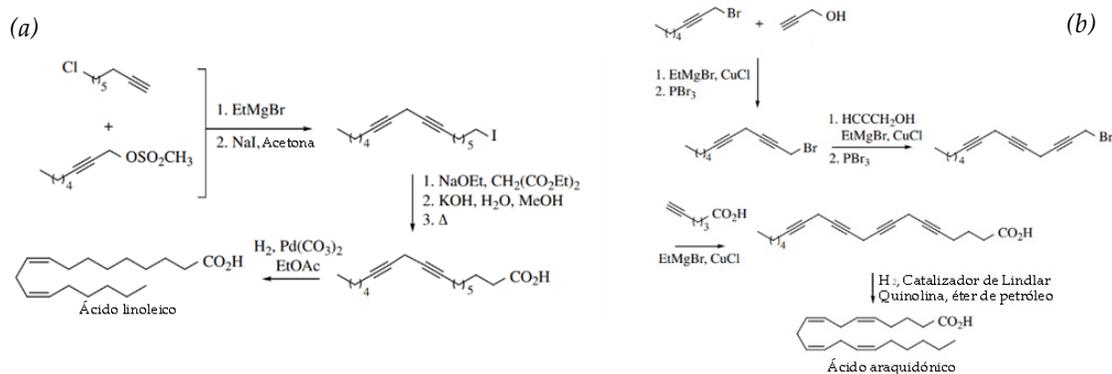


Figura 6. Primera síntesis total del ácido linoleico reportada por Raphael y Sondheimer (a) y primera síntesis total del ácido araquidónico reportada por Osbond (b).

Considerando que una potencial estrategia para la introducción de deuterio es a partir de D_2 por vías reductivas, resulta evidente que las últimas etapas en las *figuras 6 a)* y *b)* tienen el potencial de generar compuestos con dos deuterios (tres en el caso de alquinos terminales) por cada insaturación generada a partir de alquinos.

Lógicamente, existe una relación directa entre el grado de enriquecimiento o pureza isotópica, el elemento en cuestión y los costos de las moléculas enriquecidas, influyendo además el tamaño de la molécula y su complejidad estructural (cómo se puede inferir en la *tabla 1*). Resulta atractivo utilizar compuestos relativamente fáciles de enriquecer con algún isótopo como sintones de moléculas más complejas que son requeridos para un tipo de análisis dado.

Además de la compra y la síntesis, los compuestos de interés pueden ser generados y etiquetados *in vivo*, mediante la actividad metabólica de algún tipo de organismo; el isótopo a enriquecer debe ser introducido al medio de los nutrientes del dicho organismo. (Acién Fernández et al., 2005). Cuando el etiquetado se realiza *in vivo*, es necesaria la extracción y purificación de los compuestos de interés a partir de biomasa; típicamente se obtienen de esta manera aminoácidos u otros metabolitos celulares con las etiquetas incorporadas

(Molina Grima et al., 2003) . Antes de utilizar los compuestos etiquetados es necesaria su caracterización estructural, la distribución de isótopos del elemento empleado y la cuantificación (Looso et al., 2010). Se han etiquetado con isótopos estables una cantidad importante de organismos tanto para fines de estudios cuantitativos en proteómica como para la obtención de *spikes*, tales como *E.coli* (Ping et al., 2013), diferentes cepas de levadura (Austin et al., 2011; Carpy et al., 2015; Dilworth et al., 2010; Washburn et al., 2002), *Trypanosoma brucei* (Gunasekera et al., 2012), *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Krijgsveld et al., 2003; Sury et al., 2010), ratón (Frank et al., 2009; Geiger et al., 2011), pez cebra (Nolte et al., 2014), tritón (Looso et al., 2010, 2012), entre otros.

Mientras que los isótopos de ^{13}C y ^{15}N son incorporados sin dificultad por organismos durante su crecimiento (Hermann et al., 2018), el deuterio es la excepción. La toxicidad del agua pesada en sistemas vivos se ha estudiado extensamente (Katz & Crespi, 1966; Kselíková et al., 2019; Thomson, 1960; Yaglova et al., 2023), encontrando que el contenido letal de D_2O en el agua del cuerpo de organismos complejos ronda del 20-40% (Bachner et al., 1964; Lewis, 1933, 1934; Xie & Zubarev, 2014). Sin embargo, las bacterias son mucho menos sensibles, pues pese a que algunas cepas frenan su crecimiento y mueren al alcanzar el 100% de D_2O , otras cepas pueden adaptarse a altas concentraciones bajo condiciones de crecimiento modificadas o con suplementos. Se han producido lípidos parcialmente deuterados vía microalga cultivadas en D_2O (Saha et al., 2013), y más recientemente se ha incrementado el grado de deuteración de varios metabolitos cosechados de microalgas cultivadas en altas concentraciones de D_2O , modificando las condiciones de crecimiento, particularmente la intensidad de luz incidente (Kselíková et al., 2022).

Por último, los efectos isotópicos durante el flujo de trabajo analítico tienen alcances más allá de la reactividad de las moléculas deuteradas y de su potencial efecto en el desarrollo/crecimiento de organismos vivos, tal es el caso de los desfases en los tiempos de retención entre isotopólogos durante la separación cromatográfica, en algunos casos los compuestos etiquetados con ^2H eluyen antes que sus contrapartes con ^1H (Iyer et al., 2004; Ong et al., 2003; Biemann, 1962; R. Zhang et al., 2002a), este efecto es más pronunciado en fase inversa que en fase normal (Incluso se observa este fenómeno, aunque en menor extensión, para compuestos etiquetados con ^{13}C , ^{15}N , y ^{18}O). Además, el número de átomos de ^2H tiene correlación directa con el desfase del tiempo de retención (Berg & Strand, 2011; R. Zhang et al., 2002a). Pequeños a moderados desfases del tiempo de retención cromatográficos generalmente no imposibilitan la cuantificación precisa por dilución isotópica, sin embargo, deben mantenerse lo más pequeño posible para garantizar resultados cuantitativos con óptima confidencialidad. Una alternativa para la mitigación del desfase es la incorporación de los deuterios en las moléculas cerca de regiones con grupos

polares, de tal modo que se vea favorecida la interacción de la molécula con el solvente más que con las fases estacionarias (para el caso de fase reversa) (R. Zhang et al., 2001, 2002b).

I.3. Compuestos deuterados como agentes derivatizantes

La derivatización química es un enfoque metodológico implementado con el fin de remover limitaciones inherentes a los métodos analíticos, puede mejorar la detección, identificación, elucidación estructural, cuantificación, perfilado o imagen MS de analitos provenientes de matrices complejas. Los métodos de ionización suave son especialmente adecuados para especies polares, y sus procesos de ionización en modo positivo están estrechamente relacionados con la afinidad protónica de los analitos, por lo que la ionización ineficaz de algunos compuestos no polares o de polaridad baja reduce significativamente la sensibilidad o incluso imposibilita la detección, limitando los alcances de los métodos. Otra limitante ocurre con el acoplamiento LC-ESI-MS, pues como se mencionó antes, este acarrea consigo efectos de matriz que provocan supresión de ionización (Zaikin & Borisov, 2021).

De acuerdo con el trabajo de revisión de Zaikin y colaboradores, para garantizar el desarrollo exitoso de un procedimiento analítico es deseable cumplir con los siguientes requisitos al llevar a cabo la derivatización sobre los analitos objetivo:

- a) Se deben de establecer los grupos funcionales diana para el diseño adecuado de las estrategias de derivatización.
- b) La reacción elegida debe de ser selectiva, rápida, preferentemente de una sola etapa, cuantitativa, evitando generación de productos laterales. Deben proceder bajo condiciones de reacción suaves y ser aplicables a un amplio rango de concentraciones de analito.
- c) La reacción empleada debe ser selectiva para grupos funcionales diana. En casos específicos, el grupo reactivo que no es el objetivo puede ser pre-bloqueado.
- d) La reacción seleccionada debe modificar por igual a todos los compuestos que tienen el mismo grupo funcional diana.
- e) El analito derivatizado debe ser suficientemente estable para ser almacenado durante la preparación de la muestra.
- f) El producto derivatizado debe ser soluble en agua o solventes miscibles con agua.
- g) La reacción debe tener buena reproducibilidad entre lote y lote para dar una cuantificación precisa.
- h) El derivatizante debe estar disponible comercialmente y no ser caro o ser fácilmente sintetizado.

Adicionalmente, Vladimir G. Zaikin y colaboradores recopilan en su interesante y exhaustivo trabajo de revisión los 10 principales objetivos de utilizar derivatización para

ESI-MS y MALDI-MS, se rescatan los siguientes tres por su relevancia en este proyecto de tesis:

- i. Proveer análisis cuantitativo mejorado en términos de precisión y exactitud en niveles de concentración deseables de compuestos objetivo mediante el uso de derivatizantes etiquetados con isótopos estables como estándares internos.
- ii. Mejorar la eficiencia (o proveer la capacidad) de ionización incrementando la sensibilidad de los métodos y disminuyendo el límite de detección.
- iii. Obtener información estructural induciendo la fragmentación controlada a través de los mecanismos de fragmentación de carga remota o de carga proximal en espectrometría de masas en tándem.

A continuación, se desglosan con mayor profundidad (y bajo acepciones convencionales) los puntos anteriores.

I.3.1 Derivatización codificada por isótopos (ICD)

De manera análoga al ICPL y en general a los enfoques de etiquetado químico o *in vitro* que están en boga para proteómica (Dayon & Affolter, 2020), en los campos de metabolómica se ha reportado dicho enfoque bajo distintas acepciones: (a) derivatización codificada por isótopos o ICD (El-Maghrabey et al., 2020; Higashi & Ogawa, 2016a; Leng et al., 2013), (b) derivatización codificada por isótopos y mejoradora de ionización por electronebulización o ICEED (Higashi & Ogawa, 2016b), (c) etiquetado químico con isótopos o CIL (Gao et al., 2023), (d) LC-ESI-MS/MS (o sólo MS) asistida por etiquetado con isótopos estables (Hao et al., 2015; Yu et al., 2015), (e) multiplexado de muestras basado en derivatización (Ogawa et al., 2016), entre otras. Para fines prácticos dentro de este trabajo se utilizará ICD. El objetivo de ICD es hacer frente a las dificultades antes enlistadas para disponer de estándares internos ILIS para cada analito de interés en un análisis, proporcionando una (o varias) fracción(es) molecular(es) isotópicamente enriquecida(s), con un enlazador capaz de unirse covalentemente a un grupo funcional específico presente en uno o varios grupos de analitos de interés. Esta estrategia permite abordar al menos tres enfoques analíticos (*figura 7*): 1) Análisis diferencial, en el que cada canal permite la detección de analitos derivatizados con uno de los isotopólogos del agente derivatizante en muestras o tratamientos distintos, respectivamente; 2) detección y/o confirmación de analitos de interés en función de su reactividad con el agente derivatizante; en este caso la misma muestra es separada en 2 alícuotas, derivatizada con dos diferentes isotopólogos del derivatizante y luego mezclada para buscar pares de señales de m/z con diferencia de masa conocida para discernir entre analitos verdaderos y señales artefacto, y 3) Cuantificación absoluta (Higashi & Ogawa, 2016a), la cual a su vez se puede llevar a cabo al menos bajo dos esquemas discutidos más adelante.

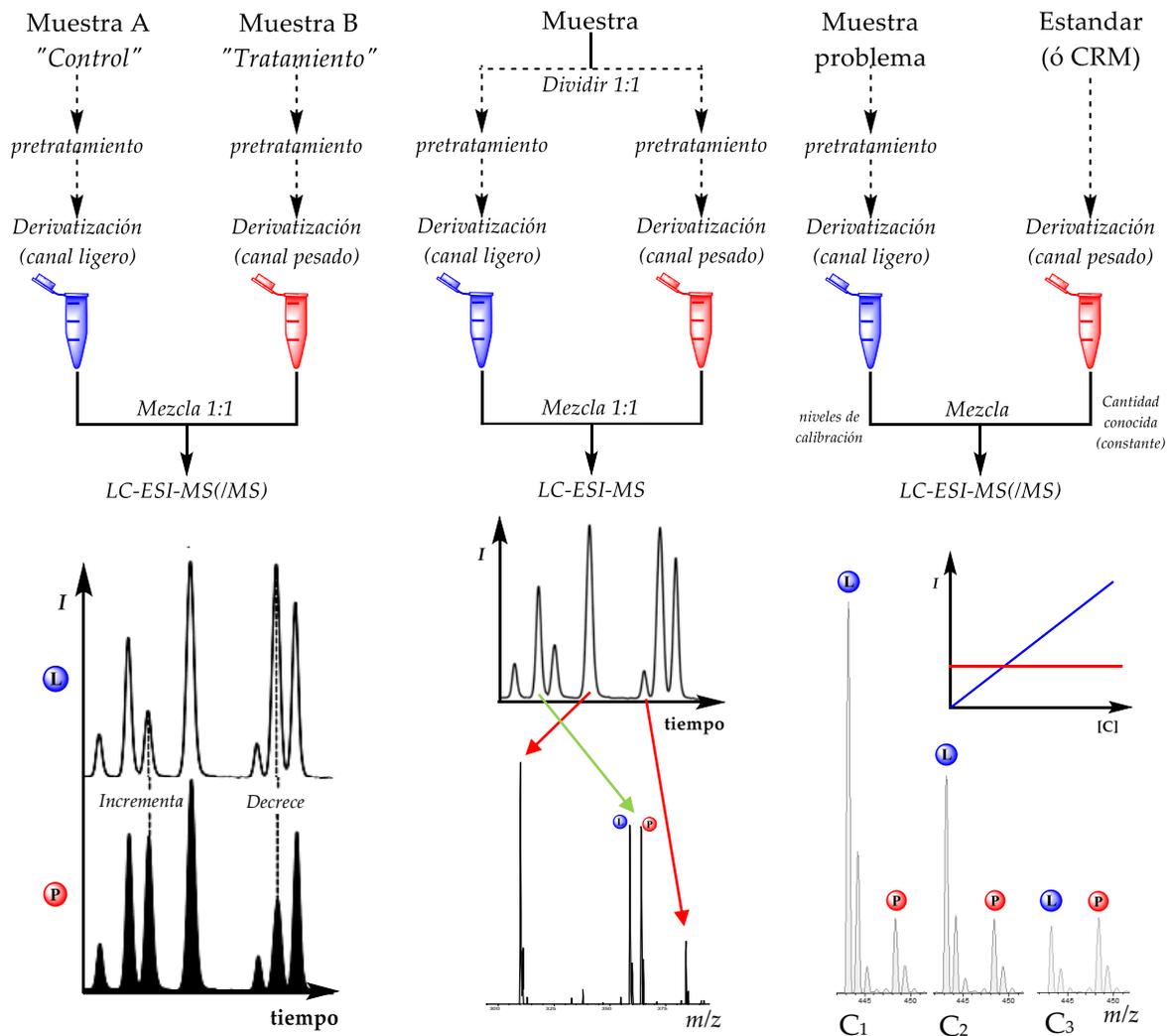


Figura 7. Tres principales alternativas de enfoque experimental con derivatización codificada por isotopos pesados estables adaptado de Higashi & Ogawa, 2016.

La cuantificación absoluta se puede lograr por dos vías: la primera es combinando el método de dilución de isótopo estable (SID) con el método ICD, consiste en la adición de estándares internos (tipo ILIS) de cada analito al inicio del flujo de trabajo a cada muestra, seguido del pretratamiento por separado, para después llevar a cabo la derivatización usando los diferentes isotopólogos del derivatizante ICD. Este enfoque permite la cuantificación absoluta exacta de compuestos objetivo en múltiples muestras y en una sola corrida analítica (figura 8), pues considera los porcentajes de recuperación o potenciales pérdidas durante el pretratamiento. El método SID es reconocido como el más confiable para análisis cuantitativo por LC-MS(/MS), sin embargo, ya se ha mencionado la limitada disponibilidad de IS etiquetados con isótopos estables. Por lo tanto, la segunda vía para cuantificación absoluta permite superar esta limitación, se le conoce como método de estándar interno

“parcial” (figura 8) y consiste en utilizar uno de los canales del agente ICD para derivatizar una mezcla de estándares (o un material de referencia certificado) con composición y concentración de analitos conocida, para después utilizar los derivados codificados por isótopos resultantes como estándares internos tipo ILIS, mientras que las muestras a determinar se derivatizan bajo condiciones iguales con los canales restantes del derivatizante. Se le conoce como “parcial” por el inconveniente de que se adiciona el estándar después del pretratamiento de muestra (y porque no emplea ILIS tal cuál, más bien los generados con el reactivo ICD y el material de referencia), impidiendo conocer con precisión los porcentajes de recuperación, al usar este enfoque es recomendable emplear protocolos de pretratamiento simples, bien establecidos y con altos porcentajes de recuperación, o en todo caso, apoyar el análisis con adición de estándar tipo AIS o URIS.

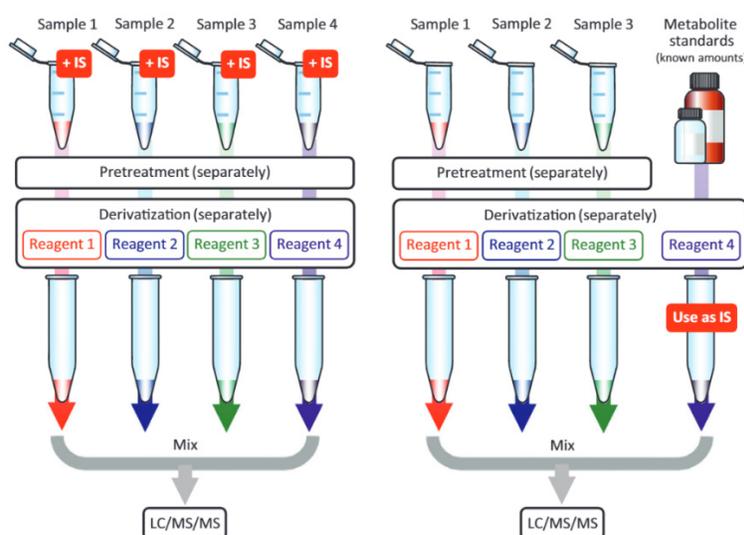


Figura 8. Enfoques alternativos de cuantificación absoluta empleando derivatizantes codificados por isótopos pesados estables (caso particular con capacidad de multiplexado de 4 canales), (a) método SID + ICD y (b) método de IS “parcial”.

Algunas de las limitaciones de la cuantificación con ICD se originan al combinar múltiples matrices de las muestras (extractos de muestras) para su medición simultánea lo que puede implicar incremento en los efectos de matriz y supresión de ionización. Además, el reactivo derivatizante también puede suprimir la ionización, aunque esto puede solucionarse con un quencher que reaccione con el exceso de reactivo. Otra potencial limitante es que al formar múltiples derivados con diferentes masas a partir de un compuesto diana, se emplean múltiples canales de detección simultánea (o transiciones SRM si se cuantifica en MS²) en paralelo dentro de un corto tiempo para cuantificar los respectivos derivados, comprometiendo los tiempos de permanencia e implicando un decremento de la intensidad de los iones (sensibilidad) de los derivados. Además, si los tiempos de permanencia son reducidos, esto reducirá la reproducibilidad del ensayo (Higashi & Ogawa, 2020).

I.3.2 Derivatización de inversión de carga

Con el fin de asegurar una alta población de iones de analitos en la fuente de ionización y así mejorar la sensibilidad, se han desarrollado diversas estrategias para la modificación selectiva de los grupos funcionales objetivo enlazando *etiquetas cargadas* o introduciendo *grupos con alta afinidad protónica*. Dentro de dichas modificaciones, en la bibliografía se han propuesto subdivisiones: (a) derivatización de generación de carga, (b) derivatización de inversión de carga (o interruptor de carga, en inglés charge-switch), y (c) derivatización vía reacción de intercambio selectiva con reactivo precargado.

La derivatización por *generación de carga* involucra moléculas neutras de un analito y de uno o varios reactivos para dar una sal orgánica. Estos procesos pueden consistir en dos o en una etapa: la de dos etapas implica la reacción preliminar del analito con un reactivo bifuncional, cuya reactividad en una de las funcionalidades está dirigida al grupo diana en el analito, mientras que la otra funcionalidad es posteriormente convertida en residuo con carga fija, usualmente se trata de etapas separadas en el tiempo. Un ejemplo es la aplicación de anhídrido yodoacético o cloruro de yodoacetilo (reactivo bifuncional) a aminas primarias (las cuales reaccionan preferentemente sobre los derivados de ácido carboxílico) y posteriormente adicionando un compuesto nitrogenado básico capaz de cuaternizar (generando el residuo de carga fija) con el haluro terminal del reactivo bifuncional (Stults et al., 1993; Zaia & Biemann, 1995). Lo anterior ha sido aplicado al secuenciado parcial de péptidos y a la determinación a nivel de ultratrazas de péptidos por ESI-MS (Bačhor et al., 2014; Setner et al., 2014). La acilación y cuaternización secuenciales, también se han aplicado en el análisis de varios alcoholes y fenoles (Ilyushenkova et al., 2017). Otro ejemplo de generación de carga en dos etapas consiste en la determinación de ácidos grasos de cadena larga por LC-ESI-MS/MS, en este caso se partió de la conversión de ácidos en cloruros de acilo seguida por la reacción secuencial con dimetilaminoetanol y yoduro de metilo $[RCOCl + HO(CH_2)_2N(CH_3)_2 + 3 CH_3I \rightarrow RCOO(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I^-]$. Este enfoque se ha usado en el análisis de ácidos grasos hidroxilados saturados e insaturados en varias matrices biológicas (X. Li & Franke, 2011). En cambio, durante la derivatización por generación de carga en una etapa no está implicado un reactivo bifuncional, solo se genera directamente la carga por reacción de las especies neutras (incluido el analito). Un ejemplo perfecto es la trimetilación en vacío de grupos amino primarios alfa y épsilon en péptidos en fase sólida en presencia de yoduro de metilo y/o yoduro de trideuterometilo (técnica IVICAT) [péptido-NH₂ + 3 CX₃I (X = H ó D) → péptido-N⁺(CX₃)₃I⁻] (Blagojevic et al., 2010). Otro ejemplo interesante es la cuaternización del grupo amino usando diazometano etéreo $[R-NH_2 + 3 {}^nC_2H_2N_2 \rightarrow R-N^+({}^nC_2H_3)_3Hal^-]$ (ⁿC=¹²C, ¹³C) (Betancourt et al., 2017; Wasslen et al., 2014), el diazometano reacciona con los grupos amino de los péptidos en una resina de intercambio catiónico fuerte, los derivados proveen alta sensibilidad cuando la muestra es multiplexada

utilizando diazometano etiquetado con ^{13}C (técnica TrEnDi). La reacción de transformación de alcoholes alifáticos o alcoholes alílicos en sales cuaternarias bajo la acción de piridina y anhídrido trifluorometanosulfónico (Qi et al., 2020) también pertenece a esta categoría, y al igual que la anterior, tiene el potencial de combinarse con ICD, pero en este caso mediante el empleo de piridina-*d*₅.

La *derivatización de inversión de carga (charge-switch)* involucra la conversión de un grupo funcional que típicamente se observa en modo de ionización negativo (principalmente grupo ácido carboxílico como carboxilato [M-H]⁻), en uno cargado positivamente por una reacción con un reactivo que posee la carga fija o con un grupo con alta afinidad protónica. Este enfoque generalmente provee alta población de iones en fase gaseosa y por ello, alta sensibilidad (Somasundaram et al., 2016; Zaikin & Borisov, 2021) debido a que los iones con carga positiva permanente sólo son liberados de la fase líquida a la gaseosa y transferidos al espectrómetro de masas durante el proceso de electronebulización.

La *derivatización vía reacción de intercambio selectiva con un reactivo precargado* cumple el mismo objetivo expandido a otros grupos funcionales no polares o difíciles de ionizar, pero que no necesariamente se observan de manera original en modo de ionización negativo, este principio se ha aplicado con aminas, carbonilos (aldehídos y cetonas), tioles, así como con alcoholes y fenoles.

Los derivatizantes se desarrollan con base en los grupos funcionales diana presentes en los compuestos de interés (Bruheim et al., 2013): pese a que la derivatización es el proceso de derivatización más conveniente no sólo para aminas pero incluso también para alcoholes y fenoles, otros enlazadores típicamente empleados consisten en ésteres activos (de 2-halo-N-metilpiridinio, de N-hidroxisuccinimida y de pentafluorofenilo), tioésteres de pentafluorofenilo, haluros de acilo, isotiocianatos (para aminas) y epóxidos (para alcoholes). Los fenoles y tioles comparten derivatizantes basados en haluros primarios y tosilato de 2-fluoro-N-metilpiridinio. Los enlazadores usados exclusivamente para tioles consisten en fragmentos conteniendo haluros primarios, acrilamidopropilo y maleimida. Los carbonilos (aldehídos y cetonas) se suelen derivatizar con enlazadores basados en hidrazinas, hidrazonas, hidroxilaminas e incluso con aminas. Los ácidos carboxílicos por lo general se derivatizan a través de reacciones de amidación y menos frecuentemente de esterificación, empleando agentes de acoplamiento como las carbodiimidias, pero también sales de haluro de 2-halo-N-alquilpiridinio o incluso se puede realizar la conversión previa a haluros de acilo, típicamente por tratamiento con cloruro de tionilo o tribromuro de fósforo.

I.3.3 Fragmentación: una herramienta para cuantificación y elucidación estructural

La fragmentación depende de la estructura del ion precursor, del modo de activación y de la energía requerida para el rompimiento de enlaces en fase gaseosa. Las fragmentaciones de los iones tipo $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ se clasifican en dos grandes grupos de reacciones: (1) fragmentaciones de retención de carga y (2) fragmentaciones de migración de carga (CRF y CMF por sus respectivas siglas en inglés). El primer tipo genera fragmentos que preservan la carga en la localización original, se caracteriza por proceder a través de mecanismos concertados a bajas energías y se clasifica en nueve principales mecanismos: i) reordenamiento de hidrógeno remoto, ii) retro-Diels-Alder (RDA), iii) retro-eno, iv) retro-heteroeno, v) fragmentación de carga remota, vi) eliminación aromática, vii) otros procesos pericíclicos, viii) eliminación de CO a partir de compuestos carbonilos cíclicos y ix) eliminaciones radicalarias. El segundo tipo (CMF) implica el desplazamiento de la carga respecto de su posición inicial dentro del ion precursor, difiere significativamente entre iones positivos y negativos (figura 9). En modo positivo se encuentran algunos subgrupos de CMF: i) rupturas inductivas simples, ii) rupturas inductivas asistidas por heteroátomos adyacentes, iii) reacciones de desplazamiento, iv) rupturas inductivas asistidas por remoción de hidrógeno β , y v) fragmentación de Grob-Wharton (Demarque et al., 2016).

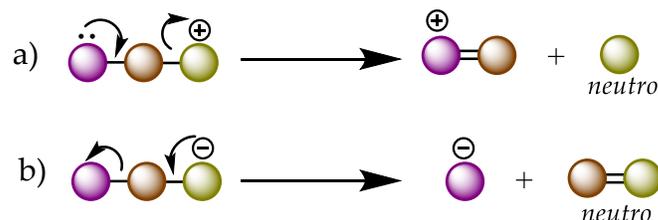


Figura 9. Reacciones CMF de iones positivos (a), en los que usualmente se elimina como grupo saliente (y pérdida neutra) al residuo en el que inicialmente se ubicaba la carga, y de iones negativos (b), en los que usualmente se elimina un grupo saliente con la carga en un sitio que inicialmente se encontraba en una región neutra de la molécula, mientras que la pérdida neutra contiene al grupo inicialmente cargado.

A lo largo del estudio de ácidos grasos por espectrometría de masas se han reportado ambos casos de fragmentación, por ejemplo, CRM fue observada desde 1990 por E. Davoli y M. Gross en aductos de ácidos grasos con Ba^{2+} y Li^+ del tipo $[M-H+Ba]^+$ y $[M-H+2Li]^+$, reconociendo la capacidad de MS para la exploración estructural en este grupo de analitos (Davoli & Gross, 1990). Veinte años más tarde Bollinger y colaboradores desarrollaron un nuevo reactivo *charge-switch*, el N-(4-aminometilfenil)piridinio (AMPP), el cual fue diseñado con base en cálculos de orbital molecular (Bollinger et al., 2010), buscando el incremento de la barrera energética de la ruptura del enlace C-N en la amida de ácidos grasos derivatizados con AMPP con el fin de favorecer la fragmentación de carga remota y la subsecuente obtención de fragmentos con información estructural. Adicionalmente, el AMPP ha demostrado proveer mejor relación señal/ruido (S/N) e incrementos drásticos de la

sensibilidad ($>10^2$) al utilizar sistemas ESI y MALDI (F.-F. Hsu, 2021; Wang et al., 2013). A diferencia de la CRF inducida por aductos metálicos, la cationización covalente con AMPP ha permitido de manera complementaria el desarrollo de enfoques ICD empleando su isotópologo AMPP-*d*₅, esto ha sido extensamente usado en el estudio de eicosanoides, oxilipinas entre otros analitos (Frankfater et al., 2018; Meckelmann et al., 2017). Recientemente el grupo de Ibrahim Kaya y colaboradores han expandido con éxito las aplicaciones de AMPP a la creación de imágenes por espectrometría de masas con MALDI y a la derivatización de aldehídos vía formación de bases de Schiff para el mapeo de ambos sub-metabolomas (metabolitos con funcionalidad aldehídica o de ácido carboxílico) en secciones de tejido cerebral de ratones y primates no humanos como modelos de la enfermedad del Parkinson (Kaya et al., 2023). Como ejemplo, se muestra el patrón de fragmentación del ácido araquidónico derivatizado con AMPP (20:4-n-6-AMPP) en la *figura 10*.

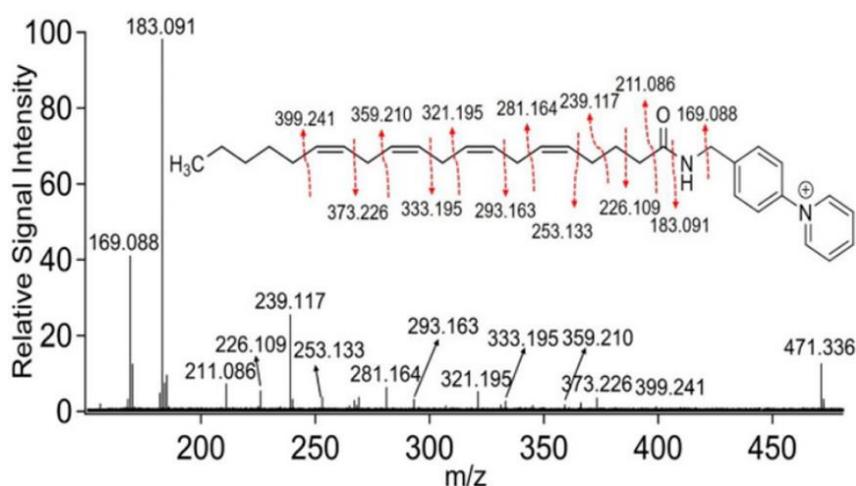


Figura 10. Patrón de fragmentación en espectro MALDI-MS/MS obtenido con MALDI-CID-FTIRC del ion m/z 471.33 correspondiente al ácido araquidónico derivatizado con AMPP a partir de sección de tejido cerebral de rata (Kaya et al., 2023), además de los iones diagnóstico para la asignación de las posiciones de cada doble enlace originadas por mecanismos CRM, se observan dos iones producto de alta intensidad correspondientes a fragmentos del derivatizante, específicamente los iones de m/z 169.08 y 183.09.

Wang M. y colaboradores realizaron experimentos para comprender mejor la capacidad de AMPP para inducir CRF, compararon una serie de 4 derivatizantes (incluido AMPP), entre los cuales el derivatizante 4-aminometil-1-metilpiridinio (AMMP, *figura 11*) genera un patrón de fragmentación idéntico al de los derivatizados con AMPP (Wang et al., 2013), Wang enfatiza en su trabajo la importancia de la distancia entre la carga y el enlace amida dentro de los ácidos grasos derivatizados, resultando crucial un sistema conjugado como espaciador entre la carga y la amida para garantizar la fragmentación de carga remota. Los

isotopólogos de cada derivatizante son fácilmente accesibles a partir de sintones pre-etiquetados comercialmente disponibles, piridina- d_5 para AMPP y ICD_3 para AMMP.

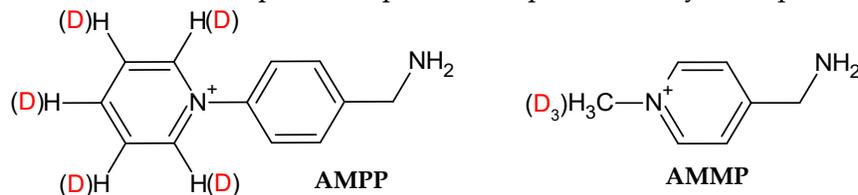


Figura 11. Agentes derivatizantes de carga remota utilizados típicamente para la derivatización de lípidos y compuestos con un grupo ácido carboxílico en su estructura, y los hidrógenos fácilmente reemplazables por deuterio.

En la *figura 12* se muestran los patrones de fragmentaciones del ácido araquidónico derivatizado con AMPP (*figura 12 A*) y con AMMP (*figura 12 B*) reportados por Wang. Además de observar que AMPP y AMMP comparten la capacidad de generar iones diagnóstico estructuralmente valiosos, es claro que los espectros de MS^2 del ácido araquidónico derivatizado con AMPP tanto reportados por Kaya (*figura 10*) como por Wang (*figura 12*), son consistentes.

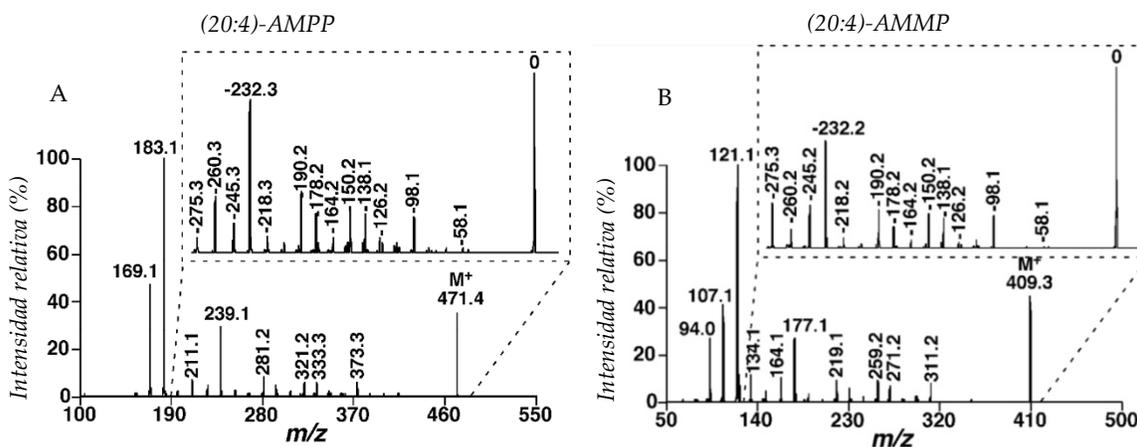


Figura 12. Patrones de fragmentación inducidos en el ácido araquidónico derivatizado con AMPP (A), y con AMMP (B). Las amplificaciones en líneas punteadas describen los iones en función de las diferencias de masas (o pérdidas neutras) a partir del ion precursor, ilustrando la equivalencia de los derivatizantes como herramienta de elucidación estructural. Extraídos de Wang, et. al 2013.

Un estudio reciente realizado por el grupo de Reuben Young reveló el primer caso de mecanismo de fragmentación de PUFAs derivatizados con AMPP o con AMMP mediante pérdida neutra de H_2 a partir de dobles enlaces exclusivamente *cis* (*figura 13d*), comprobado mediante experimentos de disociación inducida por ozono OzID de los fragmentos obtenidos por este mecanismo, esta información es muy importante debido a que da mayor rigor y soporte al mecanismo de fragmentación, además denotan alta preferencia de los isómeros *-cis* respecto a los *-trans* para transcurrir por esta vía de fragmentación, logrando el máximo nivel de exploración estructural en PUFAs mediante espectrometría de masas

(Young et al., 2022). Las fragmentaciones de carga remota en ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados derivatizados con AMPP y AMMP generan iones diagnóstico mediante mecanismos de fragmentación bien definidos (figura 13).

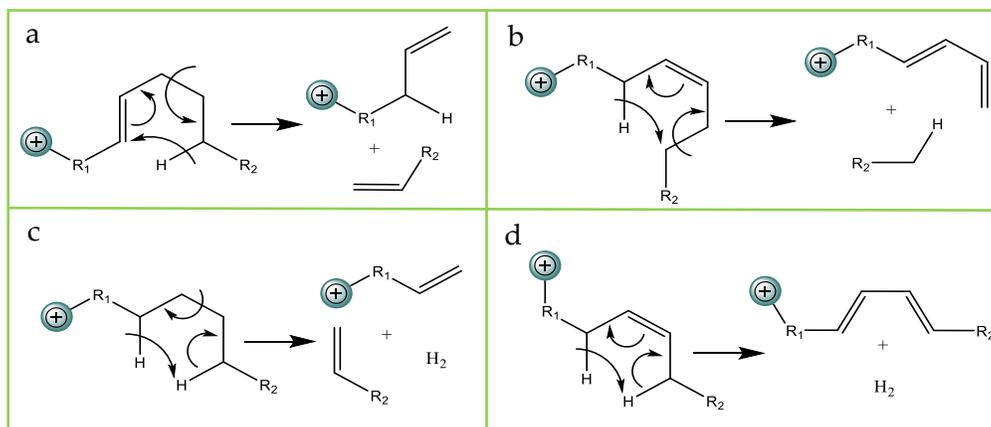


Figura 13. Típicos mecanismos de fragmentación de carga remota inducidos en FFAs derivatizados con AMPP ó AMMP. a) Reordenamiento de hidrógeno γ , escisión carbono-carbono α' - β' . b) Eliminación 1,4 de hidrógeno. c) Fragmentación vía mecanismo alílico (tipo α) α' - β' . d) Eliminación de hidrógeno a partir exclusivamente de dobles enlaces conjugados en cis.

La fragmentación por migración de carga también se ha reportado para ácidos grasos derivatizados, particularmente con los derivatizantes AETMA (o colamina), DMED ó DEEP (figura 14). La fragmentación con estos agentes derivatizantes sólo genera iones diagnóstico para FA hidroxilados o que poseen grupo(s) epóxido(s) a lo largo de la cadena alquílica (Gao et al., 2023), para otros ácidos grasos convencionales (SFA, MUFA y PUFAS) la fragmentación ocurre siempre por pérdida neutra constante vía CMF (Somasundaram et al., 2016; Zaikin & Borisov, 2021). Pese a que estos derivatizantes no en todos los casos permiten inferir demasiada información de la estructura fina, sí mejoran la sensibilidad por introducir una carga permanente y ofrecen la capacidad de codificación isotópica (Figura 14).

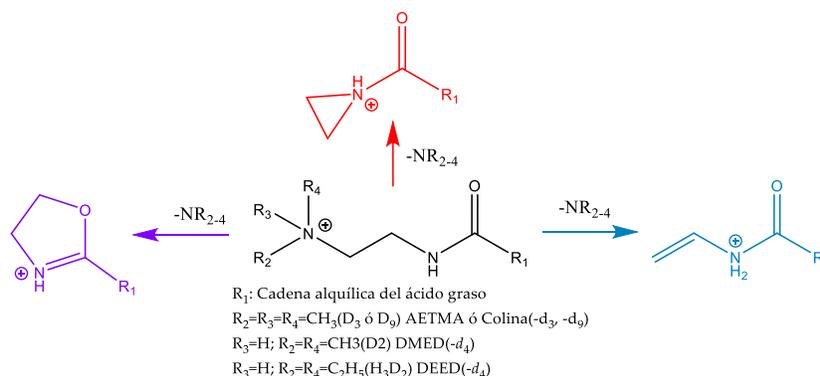


Figura 14. Estructura general de ácidos grasos derivatizados con AETMA, DMED ó DEED, y sus potenciales mecanismos de fragmentación vía CMF con pérdida neutra constante. Aziridinación (rojo), remoción de hidrógeno β (azul) o formación de 2-oxazolina (morado).

Las pérdidas neutras son claras y constantes entre analitos derivatizados con cada uno de los tres derivatizantes (45, 73 y 59 Da para los respectivos isotopólogos ligeros de DMED, DEED y AETMA), sin embargo, no hay un consenso acerca del mecanismo de fragmentación de los ácidos carboxílicos derivatizados con AETMA, DMED y DEEA. Algunos reportes sugieren la formación de aziridina (Gao et al., 2023; M. Liu et al., 2018; J. Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2016) correspondiente a un mecanismo de reacción de desplazamiento o cierre de ciclo *3-exo-tet* (flecha y producto en rojo, *figura 14*), otros sugieren la vía de ruptura inductiva por remoción de hidrógeno β (W. J. Cai et al., 2019; Han et al., 2023), también conocida como eliminación de Hoffman (flecha y producto azul, *figura 14*) y apenas hace poco Dong Sun y colaboradores consideraron la potencial vía de cierre de ciclo *5-exo-tet* (flecha y producto morado, *figura 14*) para formar la 2-oxazolina (Sun et al., 2018). Cabe mencionar que ésta vía es altamente favorable de acuerdo con las reglas de Baldwin (Gilmore et al., 2016). Una de las ventajas de contar con una transición única y altamente específica es el rendimiento en la generación de ion producto para enfoques cuantitativos por MRM o NLS. Una aplicación particular importante de mencionar es la desarrollada dentro del grupo de Shuling Xu, quienes implementaron una estrategia de doble derivatización combinado AETMA y Paternò-Büchi (PB). En este trabajo se consideró que la derivatización PB junto con las derivatizaciones de aziridinación catalizadas por Rh_2esp_2 (Feng et al., 2022) son de las más populares dirigidas a los dobles enlaces para conseguir información estructural de MUFAs y PUFAs, pero que su desventaja consiste en la generación de pares de iones diagnóstico en modo negativo (a partir de los respectivos carboxilatos) y transcurre con baja efectividad generando señales débiles. Es por ello que Xu y colaboradores combinaron la derivatización sobre los dobles enlaces con una derivatización de inversión de carga sobre el grupo carbonilo empleando AETMA a través de etapas separadas en el tiempo, mejorando la intensidad de los iones diagnóstico y logrando la elucidación de la localización de dobles enlaces en ácidos grasos con hasta 6 insaturaciones, expandiendo los alcances comparado con enfoques que emplean únicamente la reacción PB, cuyos alcances se limitan a PUFAs con 3 insaturaciones (S. L. Xu et al., 2020). Algunas limitaciones que acompañan este enfoque consisten en que los iones precursores ideales para obtener información estructural son aquellos que reaccionan con un sólo equivalente de acetona en la reacción de PB (o productos con una única etiqueta, dispersa en los distintos dobles enlaces), sin embargo, es bien conocido que a medida que aumenta el grado de insaturación de los ácidos se obtienen productos con múltiples etiquetas y el analito de interés se distribuye en múltiples iones (Esch & Heiles, 2018), en otras palabras, la reacción PB es divergente, aunado además a la baja abundancia de estos analitos en muestras biológicas y a la baja eficacia de reacción PB (~30%). Xu asegura en un comentario que su metodología ofrece abundancias de iones diagnóstico comparables o superiores respecto a AMPP, argumenta además que el empleo de AMPP requiere

“habilidades sofisticadas de interpretación espectral”, pero algo importante a considerar para hacer una comparación objetiva es la naturaleza multietapa de la doble derivatización de Xu, la divergencia de productos en PUFAS de la etapa PB (para MUFAS no hay inconveniente), y las condiciones especiales requeridas para lograr la doble derivatización (atmósfera inerte y 1 hora de irradiación UV). En contraste, utilizando AMPP, la reacción ocurre con alto rendimiento bajo condiciones suaves y se obtiene un solo producto para cada ácido (reacción convergente) y a partir de dicho ion único se obtienen los fragmentos de interés.

La vía de fragmentación de cierre de ciclo *5-exo-tet* propuesta por Dong Sun y colaboradores para la fragmentación CMF de AETMA, DMED y DEED (en conjunto con la vía de aziridinación, y aunado a la ausencia de hidrógenos β en ácidos grasos derivatizados con AMPP y AMMP), podría contribuir a explicar cómo las estructuras de AMPP y AMMP inducen la fragmentación CRM mientras deslocalizan electrones (*figura 15*).

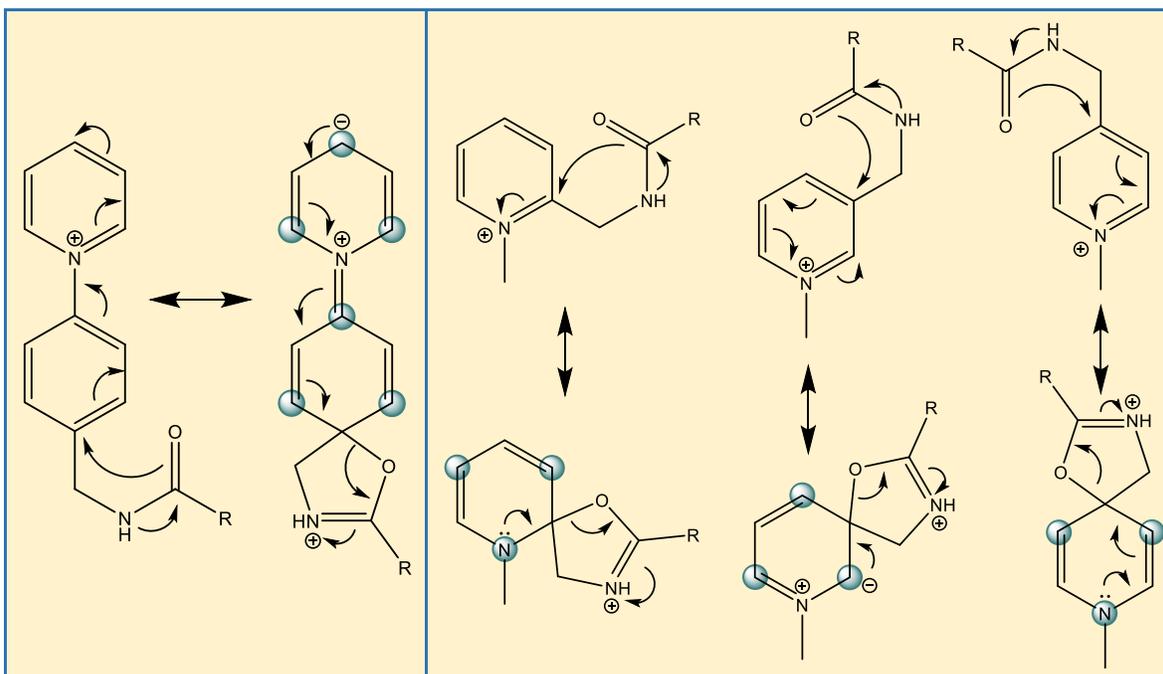


Figura 15. Analogía del mecanismo de fragmentación por cierre de ciclo *5-exo-tet* observado en sistemas que inducen CMF y cómo las formas resonantes de derivados de AMPP y AMMP podrían estabilizarse en forma de spiro-2-oxazolina facilitando la fragmentación de la cadena alquílica. Adaptado parcialmente de Dong Sun, 2018.

AMPP y AMMP han sido utilizados satisfactoriamente en enfoques Shotgun, sin embargo, Dong Sun discute en su trabajo el inconveniente de que en el nivel de MS² la cuantificación relativa de mezclas de isómeros se realiza normalizando los iones diagnóstico de mezclas de isómeros respecto a los iones procedentes del derivatizante (de m/z 169 ó 183), pero estos iones pueden proceder de contaminaciones isobaras o interferencias espectrales entre analitos y producir errores de cuantificación (Sun et al., 2018). Es importante encontrar un

balance o de ser posible una sinergia en las metodologías que permitan aprovechar ambos mecanismos de fragmentación CMF y CRM.

En otro tema, varios de los derivatizantes isobáricos utilizados en proteómica comparten una región estructural en común (figura 16) que garantiza la liberación efectiva del grupo reportero (Chahrour et al., 2015; X. Chen et al., 2021; Higashi & Ogawa, 2016b, 2020).

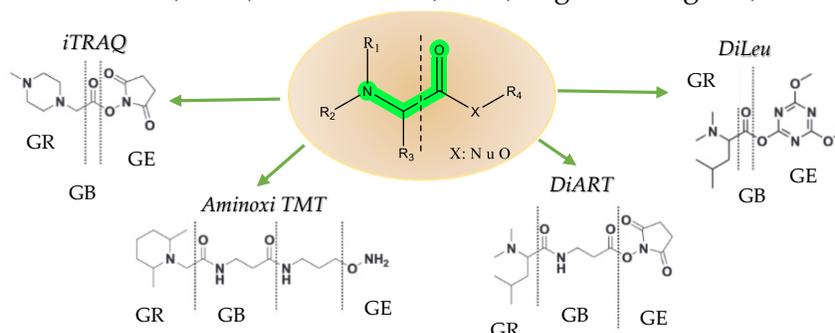


Figura 16. Homología estructural de los derivatizantes isobáricos en la región cercana al precursor del grupo reportero, R_n ($n: 1, 2, 3$ y 4) son distintas cadenas alquílicas y X un heteroátomo.

I.3.4 Misceláneo

En la figura 17 y la tabla 2 se recopilan derivatizantes dirigidos a ácidos carboxílicos que confieren una o varias de las interesantes propiedades descritas en los apartados anteriores: ICD, switch-charge y/o fragmentación CRM ó CMF.

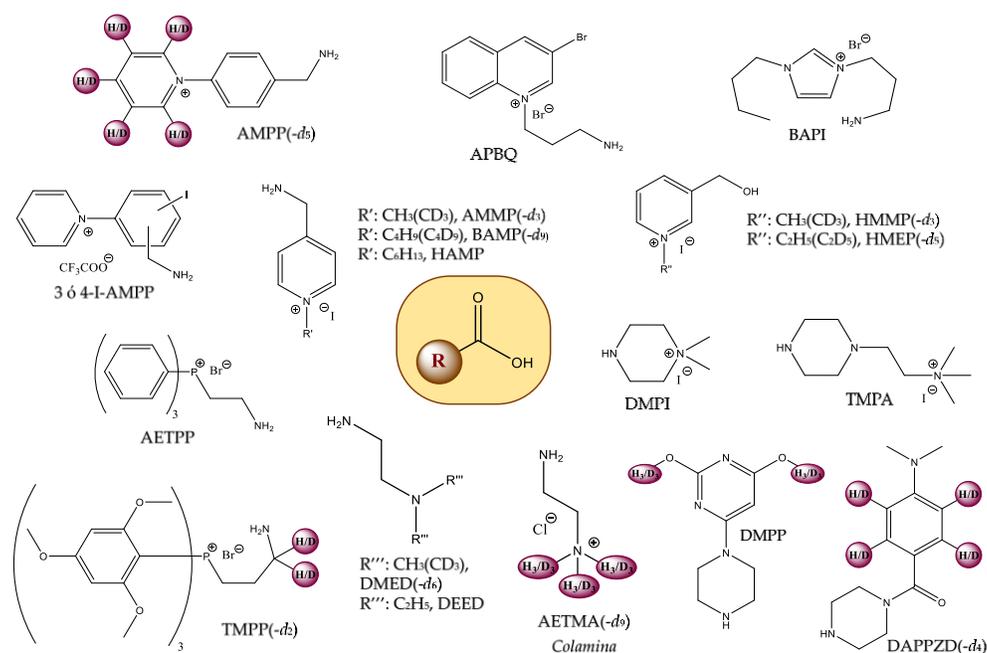


Figura 17. Derivatizantes con carga fija y codificados por deuterio con enlazador basado en aminas primarias o secundarias dirigido al grupo funcional ácido carboxílico.

Tabla 2. Derivatizantes con distintos enlazadores dirigidos al grupo carbonilo que poseen alta afinidad protónica o carga permanente y codificados por isotopos pesados estables (en algunos casos, ver figura 17).

Derivatizante	Técnica analítica	Condiciones de derivatización	Límite de detección y/o cuantificación	Incremento de la sensibilidad	Analitos determinados y/o cuantificados
AMPP	LC-IM-QTOF-MS/MS LC-QqQ-MS	EDC, OHBt en ACN/DMF (5:1; v/v). 40 °C, 40 min.	0.2- 10.0 nM (1.0- 50 pg en columna) (LOD)	---	Oxilipinas en cultivos celulares, suero y plasma humano
	UPLC-TQ-MS/MS	EDCHCl, OHAt en ACN/DMF (4:1; v/v). 60 °C, 30 min.	50-10 fg (LOQ)	60000 veces	UFAs (C20) en suero de ratón
	nanoESI-TSQ-MS	Mismo protocolo de Bollinger seguido de extracción con butanol/agua para infusión directa.	---	100 veces en modo PIS	PUFAs en suero humano
	nanoESI-TSQ y Q-Exactive MS	EDCHCl, OHBt en ACN/DMF (4:1; v/v). 70 °C, 90 min.	1.0 fmol/μL (LOQ)	---	Ácidos grasos en plasma humano
(Hellhake et al., 2020; Bollinger et al., 2013; K. Yang et al., 2013; Wang et al., 2013).					
3 ó 4-I-AMPP	HPLC-ESI-LTQ-MS	EDC, HOBt en ACN:DMF (4:1, v/v) 65 °C, 1 h	72 fmol en columna	---	Ácidos grasos ramificados en piel de humanos recién nacidos
(Narreddula et al., 2019)					

AMMP	nanoESI-TSQ y Q-Exactive MS	EDC HCl, OHBt en ACN/DMF (4:1; v/v). 70 °C, 90 min.	---	---	Ácidos grasos en plasma humano
(M. Wang et al., 2013)					
BAPI	MALDI-TOF-MS	EDC, HOAt, t.a. 10s	---	> 42 veces	Péptido sintético
(Qiao et al., 2013)					
APBQ	HPLC-ESI-TSQ-MS	DCC, piridina, 60 °C, 60 min	0.19-0.51 fmol (LOD)	63 veces	FA y ácidos biliares
(Mochizuki et al., 2013)					
AETMA	UHPL-ESI-QTOF- MS	TEA, HOBt + HATU, t.a. 1 min	0.01-5 pg (LOD), 10-5000 fg (LOQ)	> 2000 veces	PUFAs en humanos asmáticos
	HPLC-ESI-QTOF- MS	TEA, HOBt + HBTU, t.a. toda la noche	15-30 fmol (LOD)	1.5-3 veces	Ác. Mirístico, oleico y araquidónico
	HPLC-ESI-LTQ- Orbitrap-MS	TEA, HOBt + HBTU, t.a. toda la noche	---	1.5-3 veces	FFAs en huevos de gallina
(Bian et al., 2017; Lamos et al., 2007; Torde et al., 2013)					

DMED	LC-TSQ-MS/MS y LC-QTOF-MS/MS	TEA, CMPI, 40 °C, 60 min.	200 fg - 5.8 pg	9-323 veces	UFAs (C2-C22)
	UHPLC-ESI-LTQ- Orbitrap-MS	TEA, CMPI, 40 °C, 60 min.	---	---	Ácidos orgánicos
	HPLC-ESI(+)- QQQ-MS/MS (MRM)	TEA, CMPI, 40 °C, 1 h	8.4-130 pg/mL (LOQ)	14-398 veces	5 ácidos retinoicos endógenos en suero humano
	UPLC-ESI(+)-QQQ -MS/MS (MRM)	TEA, CMPI, 40 °C, 1h	0.02-10 ng/mL (LOD), 0.05-25 ng/mL (LOQ)	5-138 veces	HETEs, EETs y DHETs en diferentes muestras biológicas
(An et al., 2020; Gong et al., 2022; Zhu et al., 2015, 2016)					
DEED	ESI(+)-LIT-MS (shotgun-NLS)	TEA, CMPI, 40 °C, 10 min	0.03-0.4 nmol/L (LOD), 0.1-1.5 nmol/L (LOQ)	375-6667 veces	SFAs, MUFAs y PUFAs en Hígado de ratón con hígado graso no- alcohólico
	ESI(+)-LIT-MS (shotgun-NLS)	TEA, CMPI, 40 °C, 5 min baño de ultrasonido	0.1-0.3 nmol/L (LOD), 0.3-1.0 nmol/L (LOQ)	2200-6670 veces	SFAs (C14-C20) UFAs (C18) aceite comestible
	UPLC-ESI(+)-LIT- MS (MRM)	TEA, CMPI, 50 °C, 40 min	0.5-3 nM (LOD), 1.5-6 (LOQ)	---	SCFAs en muestras fecales de humanos con carcinoma hepatocelular

(M. Liu et al., 2018; S. L. Xu et al., 2020; J. Zhang et al., 2021)					
TMPP	HPL-ESI-QTOF-MS/MS	CMPI/TEA (1.5:3) en ACN. t.a. baño de ultrasonido 30 min.	---	---	<p>Ác. levulínico</p> <p>Ác. glucorónico</p> <p>Ác. benzoico</p> <p>Ác. fenilacético</p> <p>Ác. Undecanoico</p> <p>Ác. Mirístico</p> <p>Ác. Palmítico</p> <p>Ác. Esteárico</p>
(Leavens et al., 2002)					
DMPP	HPLC-ESI-QTOF-MS SIM y SRM con LC-ESI-TQ-MS	EDC, HOAt en MeOH. Secado y reconstitución en ACN.	5-15 pM (FAs) 10-200 pM (á. orgánicos)	20-25 veces (péptidos) >2500 veces (FAs) 375-1000 veces (ácidos orgánicos)	Péptidos de: Lisozima, β-caseína, albumina de suero bovino. 18 ácidos grasos libres y 6 ácidos orgánicos.
(Leng et al., 2013)					
DAPPZ	LC-ESI-TQ-MS/MS (SRM)	DMT-MM en EtOH, t.a. 5 min. Secado y reconstitución en ACN	100-120 fg	300 y 100 veces (respectivamente)	<p>Ác. Araquidónico</p> <p>Ác. Eicosapentaenoico</p>
(Ogawa et al., 2016)					
TMPA	MALDI-MSI	HATU, HOBt, 60 °C, 1 h	---	Más de 3 órdenes de magnitud	Ácidos grasos de cadena corta en microbiota intestinal

(Han et al., 2023)					
DMPI	MALDI-MSI	Activación con HATU sobre tejido seco, 10 min	---	2-4 órdenes de magnitud	FA en secciones de tejido de cáncer de tiroides
(S. S. Wang et al., 2019)					
HMMP	UPLC-ESI-MS (MRM)	TEA, CMPI, 50 °C, 30 min	---	> 2000 veces	Ácidos grasos furanos
(L. Xu et al., 2020)					

AMPP: *N*-(4-aminometilfenil)piridinio

DMED: *N,N*-dimetiletetilendiamina

DEEA: *N*-dietiletetilendiamina

DMPP: 2,4-dimetoxi-6-piperazin-1-ilpirimidina

DAPPZ: 1-[(4-dimetilaminofenil)carbonil] piperazina

TMPP: propilamina tris(trimetoxifenil)fosfonio

TEA: trietilamina

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

HOBt: Hidroxibenxotriazol

HOAt: Hidroxiazabenzotriazol

CMPI: yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio

DMT-MM: 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio

HETEs: ácidos hidroxieicosatetraenoicos

EETs: ácidos epoxieicosatreinoicos

DHETs: ácidos dihidroxieicosatrienoicos

I.4. Ejemplos de reacciones de deuteración regioselectiva con potenciales aplicaciones en espectrometría de masas

I.4.1 Estrategias generales para marcaje con deuterio

La incorporación de deuterio en centros de carbono es un proceso desafiante y altamente demandado en varias áreas, incluyendo ciencias de la vida, se le puede considerar cómo el proceso más fundamental de funcionalización del enlace C-H. Existen dos principales vías sintéticas para conseguir la incorporación: 1) síntesis multietapa convencional, en la que se suelen usar sustratos pre-etiquetados y/o incorporar los isótopos mediante las transformaciones inherentes a las reacciones, por ejemplo la reducción con reactivos deuterados (NaBD_4 y LiAlD_4) o la deuteración catalítica de compuestos insaturados con D_2 , entre otros y, 2) intercambio H/D directo sobre la molécula objetivo, ya sea mediante catálisis ácido/base, o con el uso de diversos catalizadores (tanto homogéneos como heterogéneos) inorgánicos y organometálicos, generalmente la catálisis heterogénea produce moléculas enriquecidas sin regioselectividad, mientras que la catálisis homogénea plantea el panorama de la deuteración regio e incluso enantioselectiva de diversos sustratos (Chatterjee & Chidambaram, 2018; Y. Li et al., 2022a; C. Liu et al., 2018; Salamanca & Albéniz, 2020; X. Yang et al., 2021), éste enfoque se caracteriza por preservar la identidad de la molécula al final del marcaje. Es frecuente que se combinen ambas vías de incorporación, intercambio H/D con síntesis multietapa, dependiendo de las moléculas objetivo, pues no siempre existe la alternativa de enriquecer directamente las especies objetivo.

A continuación, se describen ejemplos de intercambio H/D ampliamente usados, basados en catálisis básica y con el uso de metales de transición.

I.4.2 Intercambio de isótopos de hidrógeno vía catálisis básica

Las reacciones de deuteración vía catálisis ácido/base se encuentran entre las más antiguas metodologías empleadas para mediar procesos de etiquetado isotópico, en la actualidad continúan cobrando importante atención, algunos ejemplos interesantes de catálisis básica son la deuteración de fenoles empleando NaOH y D_2O a $180\text{ }^\circ\text{C}$ en baño de microondas (Atzrodt et al., 2018). El sistema $\text{KO}^t\text{Bu}/\text{DMSO-}d_6$ se ha empleado extensamente, Zhan, Yan y colaboradores demostraron su utilidad en la deuteración de bencilaminas (en presencia de NaH) (Y. Hu et al., 2015), este sistema también demostró alta eficacia de deuteración sobre sustratos difluorometilarenos (Huang et al., 2021). Recientemente, dos grupos reportaron independientemente la deuteración β y γ de piridina y derivados (Kopf, Liu, et al., 2022a; Y. Li et al., 2022b), las condiciones consisten en tratamiento térmico en presencia del anión tert-butóxido como base, el cual es capaz de extraer un deuterón del $\text{DMSO-}d_6$ (fuente de deuterio) generando su base conjugada denominada *dimsil*, facilitando además la deprotonación de la piridina y permitiendo con ello el intercambio H/D entre $\text{Py}/\text{DMSO-}$

*d*₆. Los autores exploraron los posibles mecanismos llegando a la conclusión de que la reacción transcurre por vía aniónica, de hecho, el contraión del ⁻O⁻Bu juega un rol crucial en la estabilización del anión piridinio. Se demostró que al secuestrar el catión con éter corona la reacción no transcurre, además el K⁺ ofrece la mejor estabilización respecto a Na⁺ y Li⁺ (según los respectivos porcentajes de deuteración); además, los cálculos computacionales mostraron que la regioselectividad del proceso de deuteración está conferida por el orden relativo de estabilidad de los isómeros del anión piridinio (figura 18).

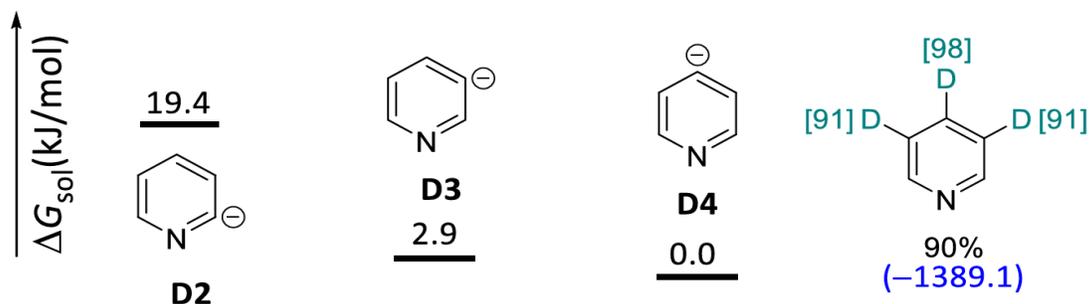


Figura 18. Perfil de energía libre de Gibbs relativa (al anión de menor energía, D4) de los aniones soportados en α , β y γ , y las distribuciones experimentales del grado de deuteración. (la cantidad en azul y entre paréntesis corresponde a la diferencia de energía libre de Gibbs entre el sustrato y el isómero aniónico más estable). Tomado del material suplementario de Kopf y colaboradores (Kopf, Liu, et al., 2022a).

La piridina es un sustrato interesante para la síntesis de agentes derivatizantes codificados con deuterio y efectivamente, existen derivatizantes reportados en la bibliografía que contienen piridina en su estructura, tales son los casos del reactivo P de Girard y el AMPP. Cabe también mencionar que la piridina es un compuesto relativamente económico, su isotópulo *d*₅ se usa como solvente para experimentos de NMR. Una vía para acceder a la piridina pentadeuterada es la reportada por Werstiuk y Ju en 1988 (Henry Werstiuk & U, 1989), la síntesis no emplea catalizadores, pero requiere condiciones extremas de temperatura y tiempo de reacción prolongado (figura 19).

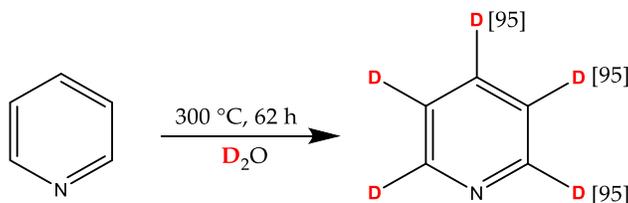


Figura 19. Perdeuteración de piridina en condiciones neutras a elevadas temperaturas con D₂O como fuente de deuterio, reproducido de la publicación de Westiuk y Ju.

I.4.3 Intercambio de isótopos de hidrógeno asistida por metales de transición

Los catalizadores basados en varios metales de transición, tales como Ir, Pd, Ru, Rh, Pt, Fe, Ni y Co se han adoptado para el intercambio de isótopos de hidrógeno directo sobre

moléculas de interés, tanto a compuestos con actividad biológica como sintones moleculares (para post-transformación) con amplias aplicaciones (Atzrodt et al., 2018; Grocholska & Bachor, 2021; Kopf, Bourriquen, et al., 2022). Además de los ejemplos enlistados antes para acceder a los isotopólogos β,γ - d_3 y d_5 de piridina (vía catálisis básica y condiciones neutras con alta temperatura, respectivamente), existen ejemplos basados en metales de transición para acceder al isotopólogo d_5 (aunque con ligeramente menor grado de enriquecimiento) empleando el tri-hidruro de rutenio soportado por un carbeno estable Cp(NHC)RuH₃ (figura 20) con benceno- d_6 como fuente de deuterio (Mai et al., 2019).

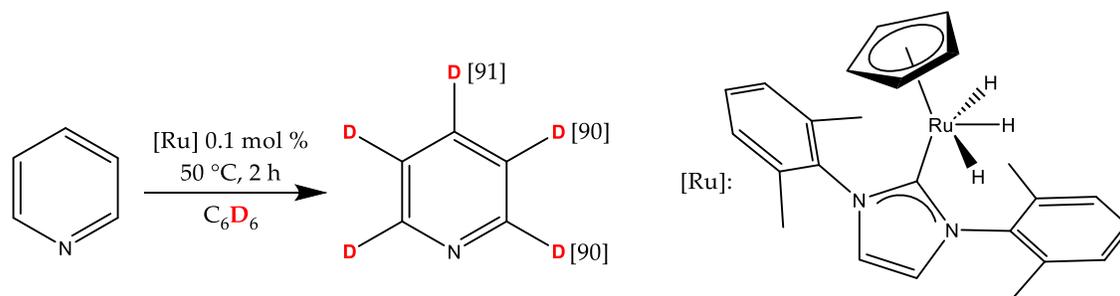


Figura 20. Intercambio hidrógeno/deuterio en hetero-arenos nitrogenados (específicamente piridina) bajo condiciones suaves catalizado por rutenio con baja carga de catalizador (0.1 mol %), reproducido de Mai y colaboradores, 2019.

Otros ejemplos de deuteración de hetero-arenos nitrogenados deficientes de electrones como la piridina, son los reportados por Chirik y colaboradores (H. Yang et al., 2018) empleando catalizadores de hidruro de níquel con ligantes diimina electrodonadores altamente voluminosos, a través de la cual accedieron al isotopólogo α - d_2 de la piridina con D₂ como fuente de deuterio (figura 21).

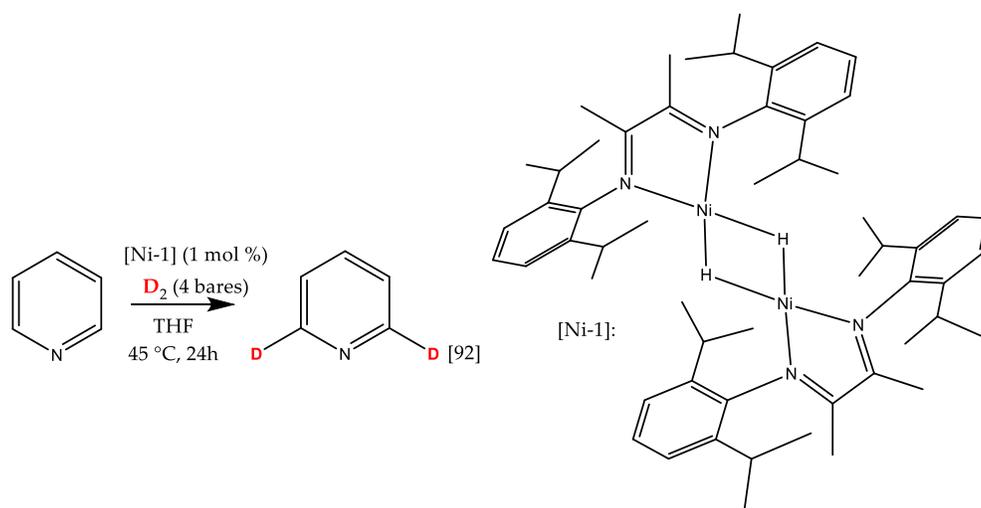


Figura 21. Esquema general para la obtención del isotopólogo α - d_2 de piridina mediante intercambio de isótopos de hidrógeno catalizado por níquel (izquierda), y precatalizador de primera generación de hidruro de Ni(I) de α -diimina (derecha). Reproducido de Chirik y colaboradores, 2018.

El precatalizador de primera generación del grupo de Chirik con sustituyentes diisopropilo es altamente estable en su forma dimerica, sin embargo, la forma activa del catalizador consiste en el hidruro de su monómero. A partir del criterio anterior Chirik y colaboradores desarrollaron una segunda generación del catalizador utilizando un ligante voluminoso no electro-atractor con el fin de desestabilizar el dímero hidruro (precatalizador) e incrementar la actividad del catalizador (Zarate et al., 2019), lo que permitió no sólo mejorar la actividad catalítica, sino que además consiguieron extender los sitios de marcaje en varios sustratos (incluida la piridina), accediendo al isotópomero $\alpha,\gamma\text{-}d_3$ del isotópologo trideuterado de piridina (figura 22), aunque con deuteración parcial en la posición gamma.

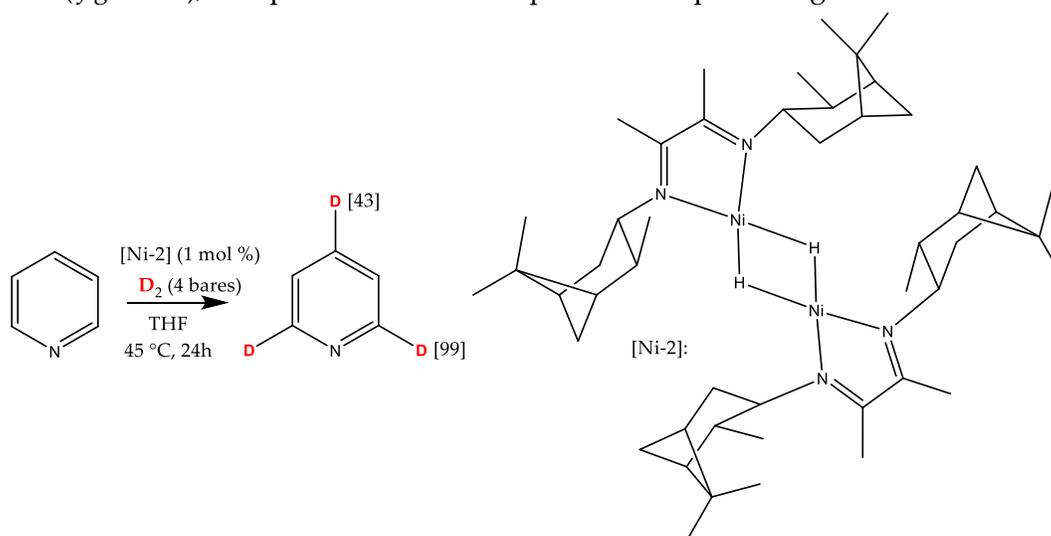


Figura 22. Esquema general para la obtención del isotópologo $\alpha,\gamma\text{-}d_3$ de piridina mediante intercambio de isótopos de hidrógeno catalizado por níquel (izquierda), y precatalizador de segunda generación de hidruro de Ni(I) de α -diimina (derecha). Reproducido de Chirik y colaboradores, 2019.

Las sales de plata son frecuentemente adicionadas como base en ciertas reacciones de acoplamiento cruzado, en las que el Pd juega un rol protagónico en la activación del enlace C-H. Aunado a ello, recientemente se ha reconocido la capacidad independiente de especies de Ag(I) en la activación de enlaces C-H y en el acoplamiento cruzado (Platt et al., 2023), de hecho, se ha reportado la deuteración como caso de funcionalización del enlace C-H mediante sistemas conformados por carbonato de plata con fosfinas voluminosas sobre varios sustratos como hetero-arenos de cinco miembros y fármacos (E. C. Li et al., 2019; Sheng et al., 2022; Tlahuext-Aca & Hartwig, 2021) con alta selectividad del sitio marcado, así como multideuteración en sustratos arenos y hetero-arenos bromados (G. Q. Hu et al., 2021) y multideuteración de compuestos aromáticos nitrados (Tang et al., 2023). Estos últimos fueron obtenidos utilizando $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{PPh}_3$ (1:3), cabe mencionar que este sistema catalítico es muy dinámico debido a la labilidad del enlace Ag-PPh₃, por lo que genera múltiples especies en solución, de las cuales se han caracterizado tres principales (Bowmaker et al., 2011; Platt et al., 2023), incluyendo $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\mu\text{-}\kappa^2, \kappa^2\text{-CO}_3)\}$, $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\kappa^2\text{-HCO}_3)_2\}$ y $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2(\mu\text{-}\kappa^2, \kappa^1\text{-CO}_3)\}$ (figura 23).

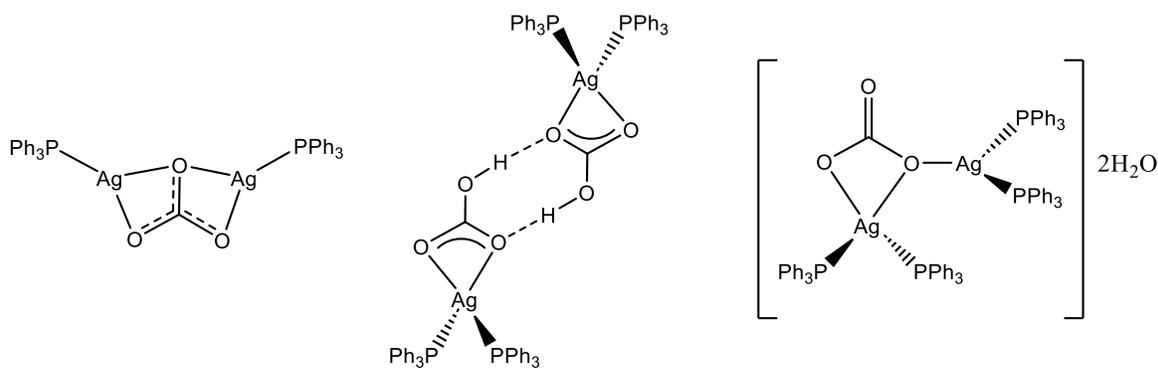


Figura 23. Especies generadas en solución por la mezcla Ag_2CO_3 y PPh_3 (caracterizadas por NMR de baja temperatura de ^1H y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, NMR de ángulo mágico e IR *in situ*). Específicamente se muestran de izquierda a derecha: $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2\}_2(\mu\text{-}\kappa^2, \kappa^2\text{-CO}_3)$, $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2\}_2(\kappa^2\text{-HCO}_3)_2$ y $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2\}_2(\mu\text{-}\kappa^2, \kappa^1\text{-CO}_3)$, de acuerdo con Patt, 2023 y Bowmaker, 2011.

Dentro de los reportes actuales de deuteración mediada por sales de $\text{Ag}(\text{I})$ con fosfinas voluminosas hay un consenso del mecanismo propuesto, como ejemplo se muestra el mecanismo para la multideuteración (en orto y en meta) del 1-bromo-4-nitrobenzoceno reportado por Tang, partiendo del complejo $\{\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2\}_2(\mu\text{-}\kappa^2, \kappa^2\text{-CO}_3)$ (figura 24).

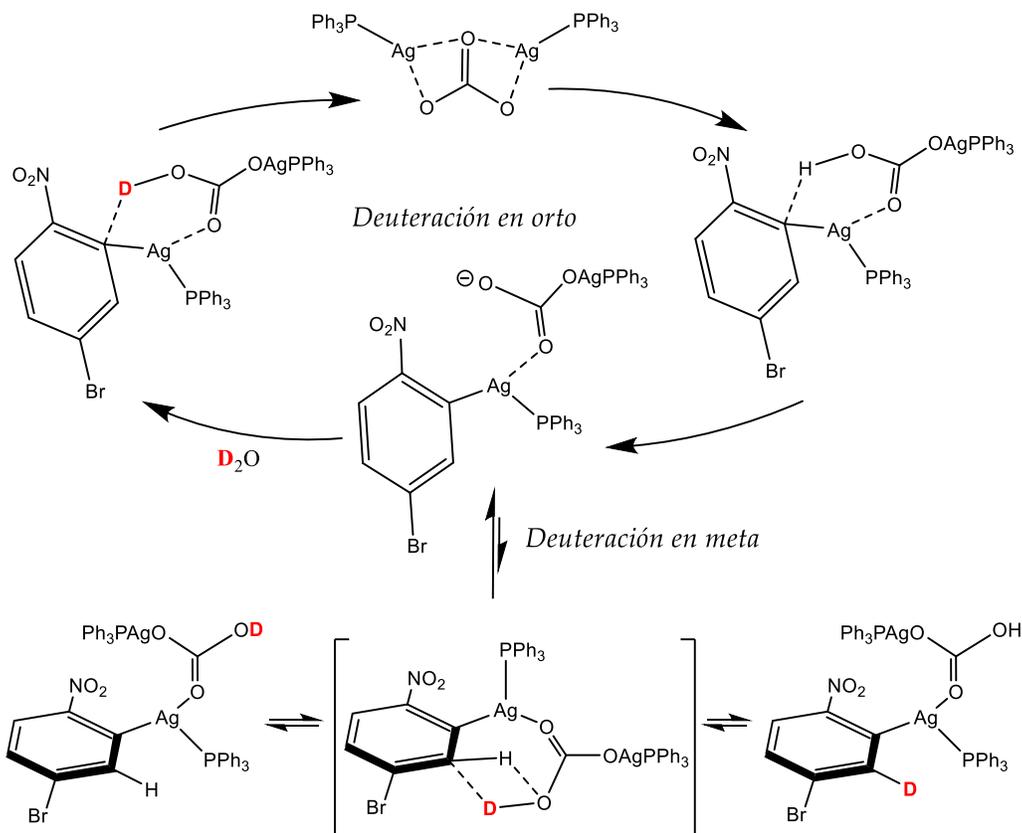


Figura 24. Mecanismo de deuteración en orto y en para de compuesto nitroaromático. Reproducido de Tang, 2023.

II. OBJETIVOS

➤ Objetivos generales

Sintetizar al menos dos compuestos etiquetados con deuterio para su aplicación como agentes derivatizantes o estándares internos en la determinación de algunos compuestos por espectrometría de masas, considerando como analitos de interés los ácidos grasos.

➤ Objetivos particulares

- a. Diseño, síntesis y caracterización de agentes derivatizantes ligeros y etiquetados con deuterio.
- b. Evaluación de: i) reactividad de los agentes sintetizados frente a analitos modelo, ii) estabilidad de isótopos incorporados durante análisis y, iii) condiciones de reacción de derivatización. Aplicación de los derivatizantes obtenidos en el análisis de muestras reales.
- c. Diseño, síntesis y caracterización de potenciales estándares internos deuterados para su aplicación en el análisis cuantitativo de aminoácidos, ácidos grasos u otro tipo de compuestos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo III. Parte experimental

Reactivos: Los reactivos utilizados para la síntesis de los isotopólogos de los derivatizantes AEPy, AMPP y AMMP así como en las reacciones de derivatización (entre paréntesis el respectivo número CAS) fueron los siguientes: piridina (110-86-1), piridina-*d*₅ (7291-22-7), bromhidrato de 2-bromoetilamina (2576-47-8), DMSO-*d*₆ (2206-27-1), KOtBu (865-47-4), 1-bromo-4-nitrobenzoceno (586-78-7), AgNO₃ (7761-88-8), Na₂CO₃ (497-19-8), PPh₃ (603-35-0), K₂CO₃ (584-08-7), terc-butilmetil éter (1634-04-4), KCN (151-50-8), Zn (7440-66-6), 1-bromo-2,4-dinitrobenzoceno (584-48-5), 2-piridincarboxaldehído (1121-60-4), 3-piridincarboxaldehído (500-22-1), 4-piridincarboxaldehído (872-85-5), clorhidrato de hidroxilamina (5470-11-1), acetato de sodio (127-09-3), amoniaco acuoso (1336-21-6), acetato de amonio (631-61-8), dicarbonato de di-terc-butilo (24424-99-5), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 25952-53-8), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol HOBt·xH₂O (123333-53-9), ICH₃ (74-88-4), 2-bromopiridina (109-04-6), 2-cloropiridina (109-09-1), NiCl₂ (7718-54-9), NaBH₄ (16940-66-2), TEA (121-44-8), se compraron en Sigma Aldrich, México, grado reactivo.

Solventes y suplementos: Los disolventes utilizados fueron agua, acetonitrilo (ACN), diclorometano (CH₂Cl₂), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo (EtOAc), dimetilformamida (DMF), óxido de deuterio (D₂O), cloroformo deuterado CDCl₃, dimetilsulfóxido deuterado DMSO-*d*₆, todos ellos se compraron en Sigma Aldrich, México. El agua desionizada (18.2 MΩ cm) se obtuvo mediante un sistema purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS tras previa destilación. El aceite de menhaden (CAS No. 8002-50-4) se compró en Sigma Aldrich, el material de referencia certificado aceite de hígado de bacalao (No. de certificado LRAC8228) se adquirió con Supelco. Los aceites vegetales comestibles y suplementos de aceite de pescado analizados fueron adquiridos en tiendas departamentales locales en la ciudad de Guanajuato capital, México.

Sistemas de reacción, almacenamiento y muestreo: Tubo J-Young con tapa de teflón, matraces bola (25 mL) y Erlenmeyer (10, 25 y 50 mL), línea Schlenk, viales de vidrio de 30 mL, tubos Eppendorf de 1.5 y 2 mL, tubos falcón de 15 mL, tubos para RMN, viales para automuestreador e insertos de 350 µL.

Instrumentación analítica y condiciones de los análisis:

-Para el análisis por espectrometría de masas con infusión directa se utilizó un espectrómetro de masas de alta resolución equipado con sistema de ionización por electronebulización y analizador de masas en tándem cuadrupolo tiempo de vuelo (ESI(+/-)-QTOF MS) modelo Maxis-Impact de Bruker®. Las muestras se introdujeron al equipo por infusión directa mediante una bomba de jeringa de 1 vía de la marca KDScientific.

-Para el análisis por LC-MS de los ácidos derivatizados se utilizó un cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 de Dionex, Thermo Scientific equipado con bomba binaria, desgasificador, compartimento con termostato para columna y automuestreador, acoplado con un espectrómetro de masas de trampa iónica de la serie amaZon equipado con una fuente de ionización por electronebulización (ESI-ITMS) de Bruker Daltonics. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna kinetex de 2.6 μm C18, 150 x 3.00 mm de phenomenex.

-Para el análisis mediante experimentos 1D y 2D homo y hetero multinucleares (de protón ^1H , carbón desacoplado de hidrógeno $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^2H , Attached Proton Test ATP, Correlation Spectroscopy COSY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy NOESY, Heteronuclear Single Quantum Correlation HSQC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation HMBC) en CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$, se utilizó un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 500MHz modelo Avance III HD Ultrashield de Bruker®. El secado de muestras tras purificaciones o extracción líquido-líquido para retirar disolventes, o como etapa preparativa para análisis se llevó a cabo en evaporador rotatorio marca Heidolph modelo G1.

Softwares para procesamiento de datos: Las estructuras químicas y los esquemas se ilustraron usando los siguientes softwares: a) ChemSketch de ACD labs, b) ChemDraw Professional o c) Inkscape. Para la configuración del método y el control del espectrómetro de masas, así como para la adquisición de datos se utilizó el Software otofControl (BrukerDaltonics). Para la configuración y control del método cromatográfico se utilizó el software HyStar. El procesamiento de datos se realizó con el Software Compass DataAnalysis 4.1 (BrukerDaltonics). La substracción de línea base se realizó con algoritmo Gauss con filtración de 3 puntos, 7 ciclos y llanura de 0.5. La asignación de fórmula molecular se hizo con la función "SmartFormula Manually" con tolerancia de 2 ppm. La cuantificación se llevó a cabo con los datos preprocesados usando el software QuantAnalysis (BrukerDaltonics). Las curvas de calibración para calcular el porcentaje de sustitución %D/H unido a carbono se realizaron con apoyo del plug-in Periodic Table Editor declarando nuevas relaciones hipotéticas de abundancia isotópica de ^1H y ^2H asociadas a un símbolo para distinguir el elemento declarado. Posteriormente, se utilizó la herramienta de simulación de patrón isotópico (Simulate Pattern) para registrar las variaciones teóricas de las contribuciones isotópicas de acuerdo con el porcentaje de deuterio contenido en las fórmulas químicas encontradas experimentalmente para n deuterios contenidos entre 0 y 100% con incrementos de 20%. Las intensidades y/o áreas de los picos más sensibles al cambio de relación isotópica entre hidrógeno y deuterio para los iones de relevancia se graficaron en Excel ajustando por regresión la línea de tendencia con funciones lineales o polinómicas según el caso y generando la ecuación de calibración asociada. Los espectros de NMR se procesaron con el Software TopSpin 4.2.3 de Bruker®.

Para el tratamiento estadístico se utilizó Excel, de la paquetería Office.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo IV. Resultados y discusión

IV.1. Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 del agente derivatizante AEPy

IV.1.1 Deuteración de piridina vía intercambio H/D empleando el sistema $\text{KO}^t\text{Bu}/\text{DMSO-}d_6$

Inicialmente se llevó a cabo la deuteración de piridina en las posiciones β y γ de acuerdo con lo descrito recientemente por dos grupos de investigación de manera independiente (Kopf, Liu, et al., 2022b; Y. Li et al., 2022b), empleando el sistema $\text{KO}^t\text{Bu}/\text{DMSO-}d_6$ bajo atmósfera de nitrógeno con calentamiento convencional ($100\text{ }^\circ\text{C}$) durante tres días (Figura 23).



Figura 23. Deuteración de piridina mediada por base.

Luego de reproducir exitosamente la deuteración reportada, se evaluó el intercambio inverso (D/H) permutando los isotopólogos de piridina (Py/Py- d_5) y de dimetilsulfóxido (DMSO- d_6 /DMSO) para obtener el isotopólogo bideuterado de piridina- α - d_2 a partir de la piridina perdeuterada adquirida comercialmente (Figura 24).

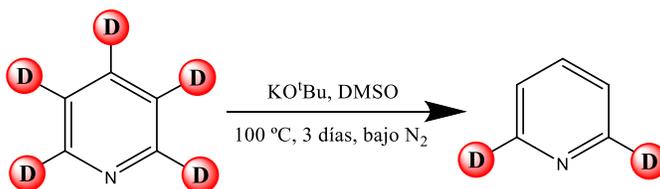


Figura 24. Condiciones de intercambio D/H empleados para la obtención de la piridina- α - d_2 .

La regioselectividad de la deuteración en ambos sistemas está conferida, de acuerdo con experimentos y estudios teóricos realizados por los autores, por la estabilidad relativa de intermediarios aniónicos sobre los átomos de carbono del heterociclo, resultando más estables los carbaniones soportados en las posiciones β y γ respecto a la posición α .

La caracterización de ambos productos se realizó por dos técnicas: para el porcentaje global de deuteración se utilizó espectrometría de masas de alta resolución (Figura 25), y a su vez la posición de los deuterios fue confirmada por espectroscopía de resonancia magnético nuclear de protón (Figura 26).

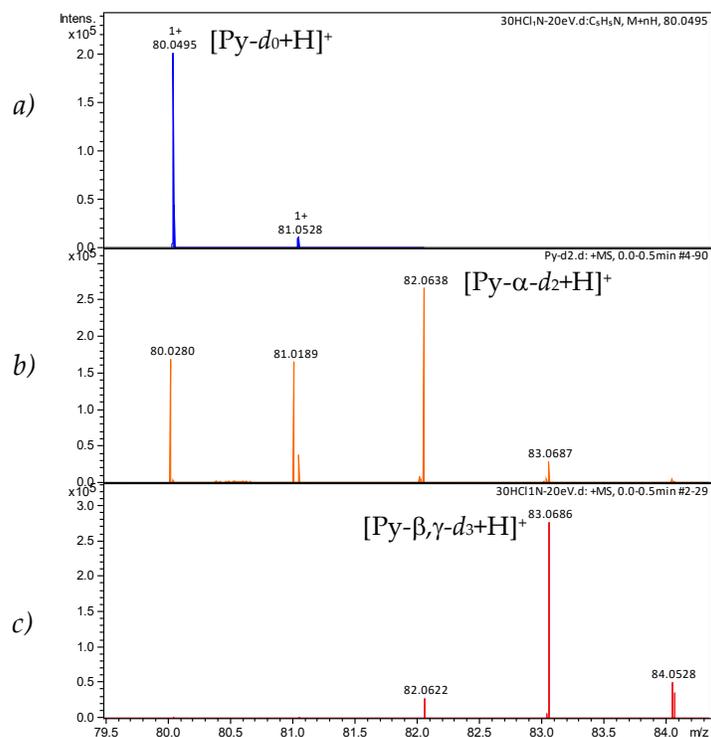


Figura 25. Comparación de espectros de masas de alta resolución de la piridina con composición isotópica natural (a) y de los isotopólogos sintéticos α - d_2 (b) y β,γ - d_3 (c), adquiridos por infusión directa en ESI-QTOF-MS.

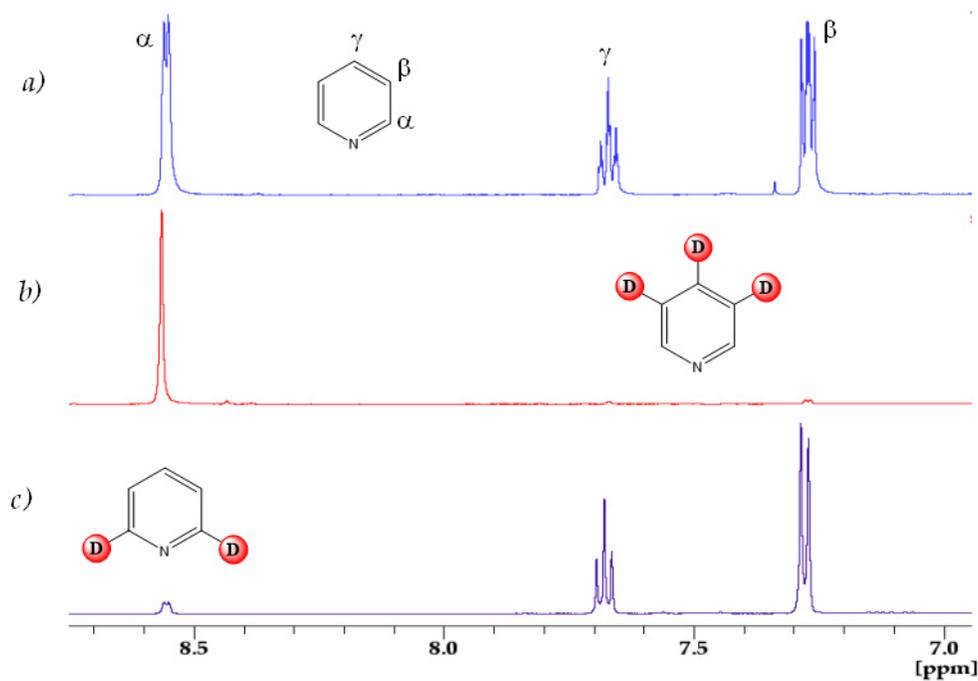


Figura 26. Espectros de ^1H NMR de los tres isotopólogos de piridina, d_0 o distribución isotópica natural (a), isotopólogo β,γ - d_3 (b) e isotopólogo α - d_2 (c).

En los espectros de masas se puede apreciar el pico pseudo-monoisotópico D_2 del ion $[\text{Py-}\alpha\text{-}d_2\text{+H}]^+$ con m/z 82.06, así mismo se observan los picos de m/z 80.02 y 81.01 (espectro *b* en *figura 25*) correspondientes al dimetilsulfóxido parcialmente enriquecido con deuterio $[\text{DMSO+H}]^+$. El pico pseudo-monoisotópico D_3 del ion $[\text{Py-}\beta,\gamma\text{-}d_3\text{+H}]^+$ se observa en m/z 83.06, y en este caso de manera análoga al anterior se observan las señales del $[\text{DMSO-}d_6\text{+H}]^+$ parcialmente agotado con relación m/z 83.04 y 84.07 (espectro *c* en *figura 25*).

La comparación de los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de los dos isotopólogos sintéticos respecto a la piridina con abundancia natural, evidencian la tendencia regioselectiva para el intercambio de isótopos de hidrógeno (*figura 26*) así como el alto grado de incorporación de deuterio. El intercambio isotópico en las posiciones β y γ se confirma de manera indirecta por la ausencia de señales en los desplazamientos 7.28 y 7.68 ppm, respectivamente, mientras que para el sistema etiquetado en α la ausencia de señal en 8.55 ppm confirma la presencia de deuterios en esta posición, además, los cambios en las multiplicidades por pérdida de acoplamiento a tres enlaces entre hidrógenos complementan lo discutido previamente ($J^{\alpha-\beta}=4.35$ Hz para $\text{Py-}d_3$, $J^{\gamma-\alpha}=1.85$ Hz y $J^{\beta-\alpha}=4.35$ Hz para $\text{Py-}d_2$).

IV.1.2 Síntesis y caracterización de los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 de AEPy

La síntesis de los isotopólogos del agente derivatizante AEPy (bromhidrato del bromuro de 1-(2-aminoetil)piridinio) consistió en la cuaternización independiente de tres isotopólogos de piridina: el de abundancia natural, la $\text{Py-}d_3$ previamente etiquetada en nuestro laboratorio (la piridina bideuterada se reservó para la posterior construcción de otro derivatizante) y la $\text{Py-}d_5$ obtenida de una casa comercial, mediante una reacción de sustitución frente al bromhidrato de 2-bromoetilamina (*Figura 27*) con modificaciones de un procedimiento reportado para el isotopólogo de abundancia natural (X. L. Chen et al., 2020).

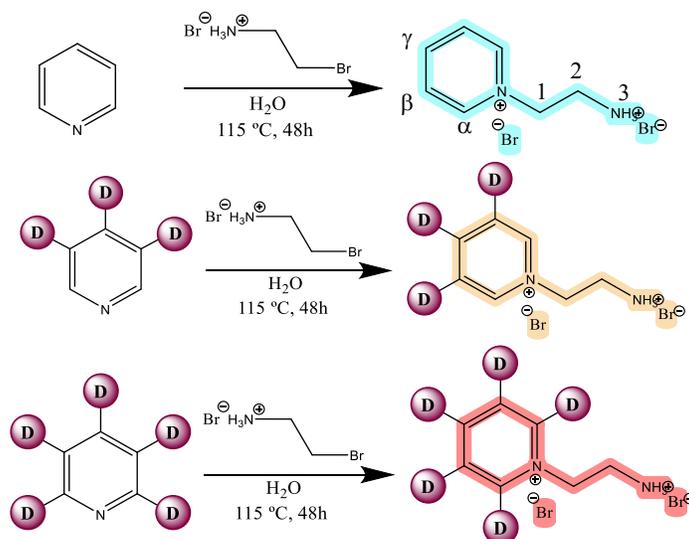


Figura 27. Reacción general para la obtención del derivatizante codificado por isótopos AEPy (d_0 , d_3 y d_5).

Los productos obtenidos tras la síntesis se confirmaron por análisis de HRMS y NMR, siguiendo las etiquetas y verificando la consistencia del grado de enriquecimiento para los isotopólogos pesados respecto a sus sustratos de partida. Particularmente los espectros de masas permitieron la observación de los iones previstos para los tres isotopólogos AEPy- d_0 , AEPy- d_3 y AEPy- d_5 , con relaciones m/z 123.08, 126.10 y 128.12, respectivamente. En la *figura 28* se muestran los espectros MS de los tres isotopólogos adquiridos por separado vía infusión directa, es claro que ambos isotopólogos pesados (AEPy- d_3 y AEPy- d_5) no poseen contribuciones en su patrón isotópico que interfieran con el pico monoisotópico de AEPy- d_0 , haciéndolos adecuados hasta este punto para su utilización como estándares internos tipo ILIS.

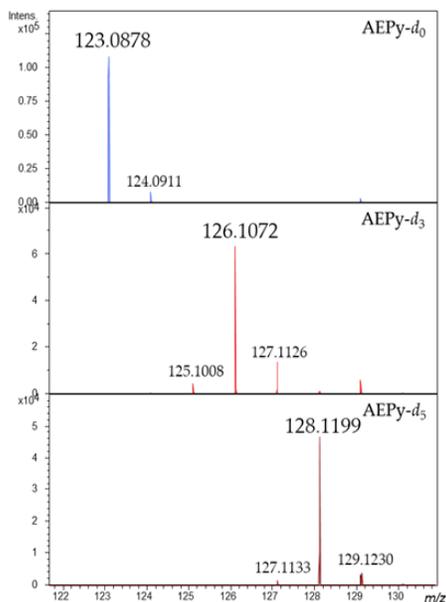


Figura 28. Espectros de masas de los tres isotopólogos del derivatizante. AEPy- d_0 (azul), AEPy- d_3 (naranja) y AEPy- d_5 (rojo).

El espectro de ^1H NMR de AEPy- d_0 mostró las tres señales esperadas en la región de los aromáticos a 9.19, 8.67 y 8.23 ppm, cómo doblete, triplete y triplete, respectivamente, dos tripletes en la región de metilenos a 4.98 y 3.57 ppm y un singulete correspondiente a la amina primaria en 8.32 ppm, los isotopólogos tri- y penta-deuterados se confirmaron por ausencia de la señal α y de las tres señales aromáticas, respectivamente. Puntualmente, el isotopólogo AEPy- d_3 se obtuvo con menor pureza, se decidió continuar utilizándolo tal cuál, pues no se observaron inconvenientes de comportamiento durante el análisis por HRMS.

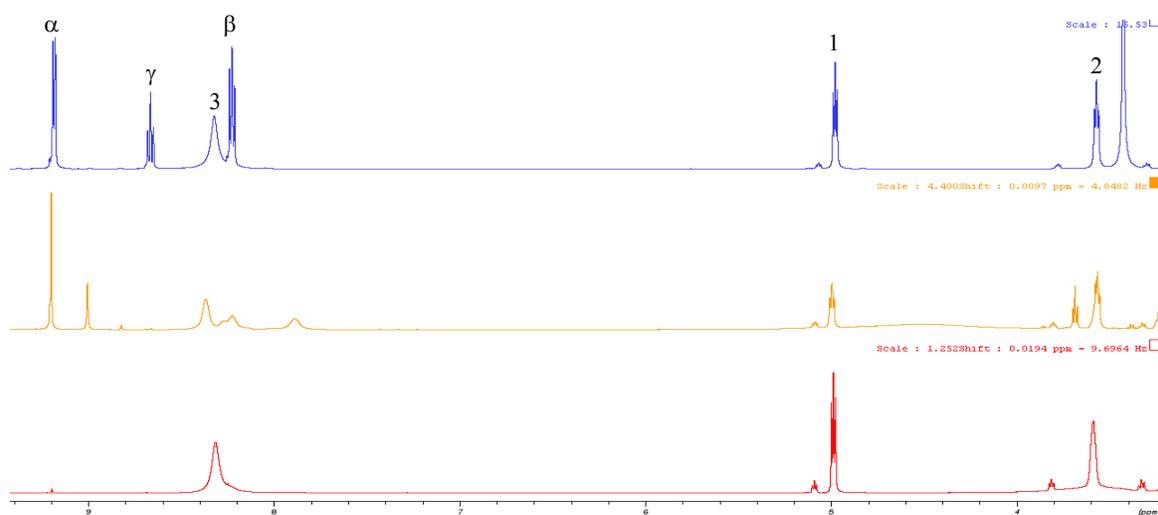


Figura 29. Espectros de ^1H NMR de los tres isotopólogos del derivatizante AEPy. AEPy- d_0 (azul), AEPy- d_3 (naranja) y AEPy- d_5 (rojo).

IV.2 Síntesis del reactivo de Mukaiyama

Se preparó el haluro de 2-halo-N-metilpiridinio haciendo reaccionar la 2-cloropiridina con yoduro de metilo (*Figura 30*) de acuerdo con la reacción reportada originalmente por Teruaki Mukaiyama (Mukaiyama, 1979).

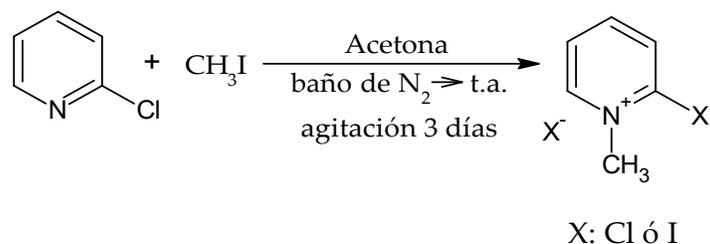


Figura 30. Reacción para la obtención de la sal de Mukaiyama.

Se verificó la formación del producto esperado yoduro de 2-cloro-N-metilpiridinio (CMPI) por ^1H NMR (*figura 31*) y HRMS (*figura 32*), se observó adicionalmente la formación de 2-yodo-N-metilpiridinio sin sorpresa, pues se ha reportado con anterioridad el intercambio de halógenos α $\text{Py}^+\text{-X} + \text{Y}^- \leftrightarrow \text{Py}^+\text{-Y} + \text{X}^-$ en estos sistemas (Leon Bradlow & Vanderwerf, 1951).

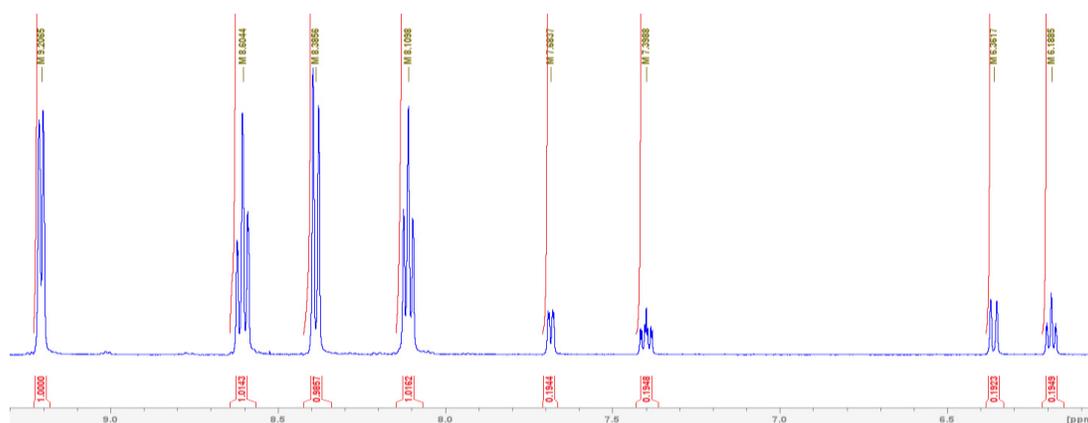


Figura 31. Espectro de ^1H NMR del producto de reacción entre la 2-cloropiridina y el yoduro de metilo, las cuatro señales mayoritarias (9.2, 8.6, 8.3 y 8.1) corresponden al producto 2-cloro-N-metilpiridinio mientras que las minoritarias (7.6, 7.3, 6.3 y 6.1) son atribuibles al producto 2-yodo-N-metilpiridinio, además se observan las señales de los metilos en campo alto.

El discernimiento entre las señales y sus correspondientes especies se apoya en un experimento complementario utilizando la 2-bromopiridina en lugar de su análogo clorado.

Transcurrido el tiempo de reacción se colectaron los cristales formados, se decantaron, se lavaron dos veces con acetona fría y se secaron para utilizarse en las etapas posteriores.

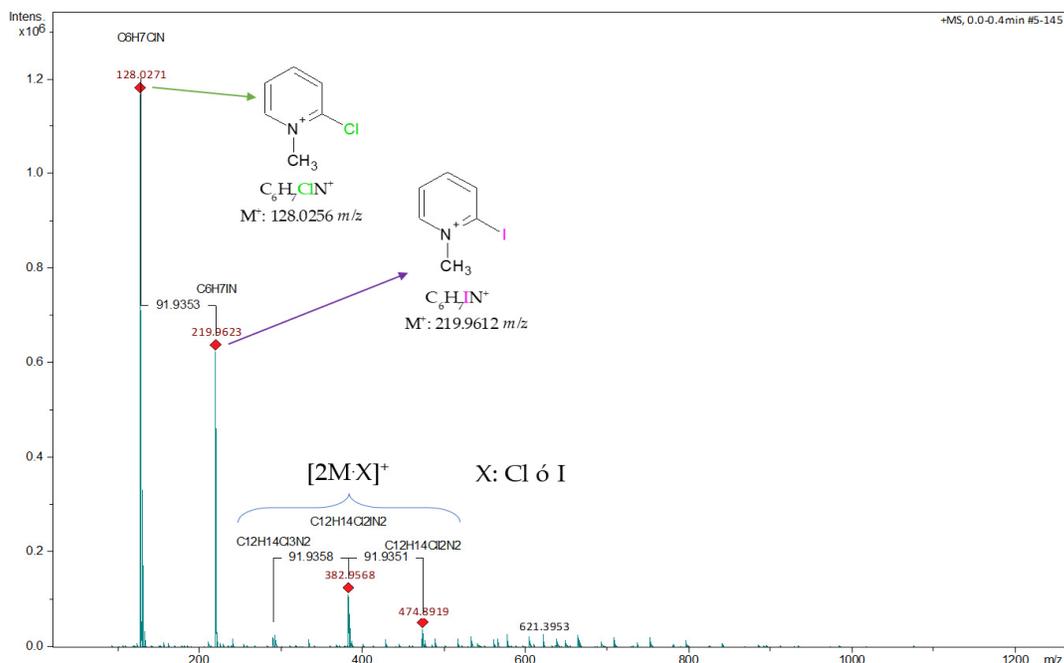


Figura 32. Espectros adquiridos en ESI(+)-QqTOF-MS por infusión directa de los productos obtenidos de la reacción entre la 2-cloropiridina y el ICH₃. Se observan los productos 2-cloro-N-metilpiridinio, 2-yodo-N-metilpiridinio y además algunos dímeros del tipo $[2M-X]^+$ formados en fase gas. Las Δm corresponden a la diferencia de masa entre el yodo y el cloro.

IV.3 Comparación del rendimiento del reactivo de Mukaiyama (CMPI) y la carbodiimida EDC como agentes de acoplamiento para la derivatización de ácidos grasos modelo

Luego de realizar pruebas de derivatización preliminares en ácidos grasos de cadena corta y verificación de estabilidad del deuterio después de la reacción (*Anexo 1*), se llevaron a cabo una serie de experimentos para comparar la eficacia relativa de reacción al emplear CMPI ó EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) como agentes de acoplamiento en la reacción de derivatización (obtención de amidas) entre AEPy-*d*₀ y una mezcla de seis ácidos grasos saturados (SFA) con cadenas de 6, 7, 9, 11, 12 y 18 carbonos y concentración de 50 mM c/u. Para examinar el efecto de temperatura, las reacciones se llevaron a cabo a 30 y 40 °C. Las cuatro condiciones se designaron con las claves CMPI-30, CMPI-40, EDC-30 y EDC-40 de acuerdo con el agente de acoplamiento y la temperatura, los experimentos se realizaron por triplicado y en todos los casos el tiempo de reacción fue de 30 minutos, al terminar las soluciones de reacción se diluyeron 500 veces en ACN:H₂O (1:1) para su análisis por infusión directa. Para comparar la eficacia relativa de reacción entre los cuatro tratamientos, se adicionó al final de la reacción una solución con 2 equivalentes de cada uno de los 6 ácidos derivatizados con AEPy-*d*₃ (empleando las condiciones del experimento CMPI-30 en paralelo) a todas las condiciones de reacción. Las intensidades de los ácidos derivatizados en las condiciones comparadas se normalizaron respecto a las intensidades

de sus respectivos isotopólogos deuterados adicionados por igual tras la reacción. Los resultados se reportan en la *Figura 33*.

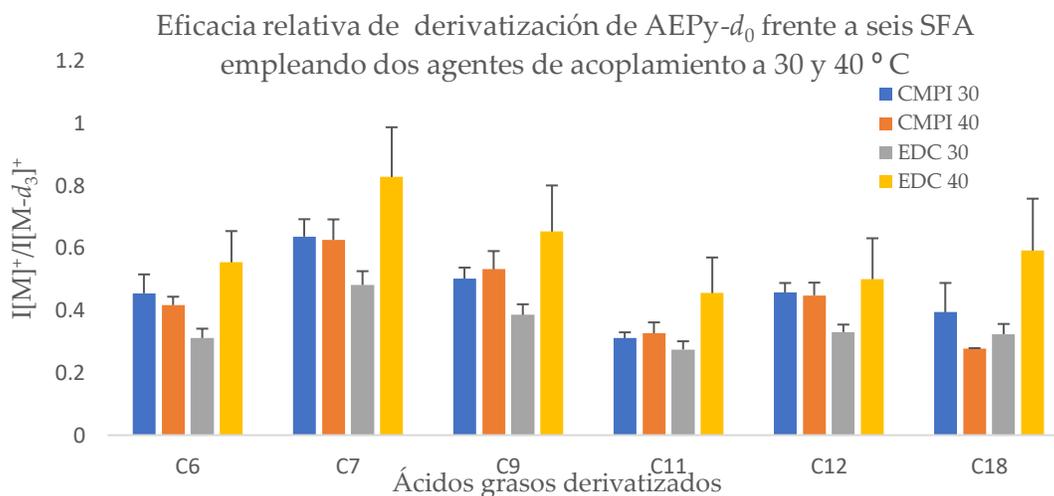


Figura 33. Comparación de la eficacia relativa de derivatización entre dos agentes de acoplamiento a dos temperaturas distintas, los resultados para cada ácido se muestran normalizados respecto a su isotopólogo trideuterado adicionado por igual a los cuatro tratamientos. ($n=3$)

El gráfico de la *figura 33* arrojó información clara e interesante, la temperatura no influye significativamente en la reacción de derivatización cuando se utiliza CMPI como agente de acoplamiento, en cambio, al utilizar EDC para activar los ácidos, el rendimiento relativo se favorece consistentemente al emplear más alta temperatura. En general, para incrementar el rendimiento de derivatización la mejor opción resultó ser el EDC como agente de acoplamiento y la temperatura de reacción de 40 ° C. Cabe mencionar que la repetibilidad de los resultados no es excelente (valores de DE) debido a que fueron obtenidos antes del mantenimiento del espectrómetro de masas.

IV.4 Efecto de la composición de solventes en la derivatización de ácidos grasos empleando el reactivo de Mukaiyama y el agente derivatizante AEPy

La etapa clave para favorecer el rendimiento durante la formación de amidas en reacciones que implican agentes de acoplamiento es la formación del “éster activo”, pues la generación del producto de sustitución deseado depende de la cantidad y estabilidad de este intermediario. La presencia de solventes nucleófilos promueve la reacción de solvolisis, evitando la formación del producto (*Figura 34*); además, la baja solubilidad del clorhidrato de AEPy en ACN absoluto despertó el interés por evaluar el efecto del solvente portador del derivatizante sobre la eficacia de la reacción. Se utilizaron mezclas ACN/H₂O y MeOH/H₂O en distintas proporciones (en las que AEPy sí es soluble), así mismo se probó la reactividad en presencia de trietilamina ACN:Et₃N y en un solvente polar aprótico (DMF).

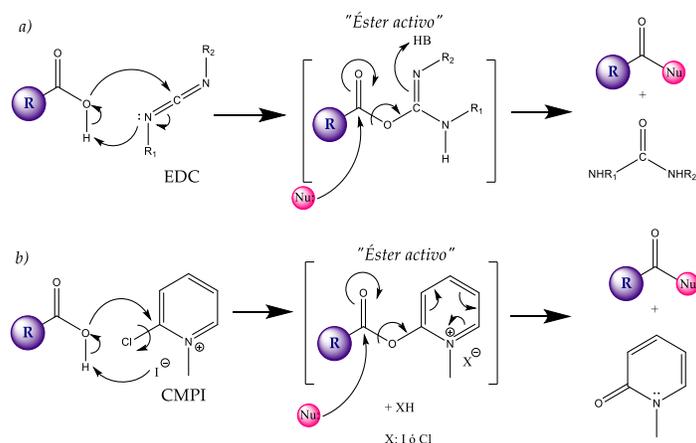


Figura 34. Formación del éster activo y del producto de sustitución entre un ácido carboxílico y un nucleófilo (AEPy o solvente nucleófilo) utilizando la carbodiimida EDC (a) o el reactivo de Mukaiyama CMPI (b) como agentes de acoplamiento.

Como un ejemplo de los ácidos a derivatizar, se utilizó el ácido propiónico al 75 mM en ACN:DMF (4:1) agregando CMPI al 75 mM en ACN/Et₃N al 0.1 M. En este sistema, se compararon 7 opciones con distinta composición de solventes para el derivatizante AEPy: A) Et₃N 0.1 M en ACN, B) ACN/DMF (4:1), C) H₂O 100%, D) ACN/H₂O (1:1), E) ACN/H₂O (80:20), F) MeOH 100% y G) MeOH/H₂O (1:1), en todos los casos con concentración de AEPy 50 mM, manteniendo constantes la temperatura y el tiempo de reacción (40 °C y 30 minutos, respectivamente). Terminada la reacción las mezclas se diluyeron 100 veces en ACN/H₂O (1:1) y se analizaron por HRMS realizando infusión directa (Figura 35).

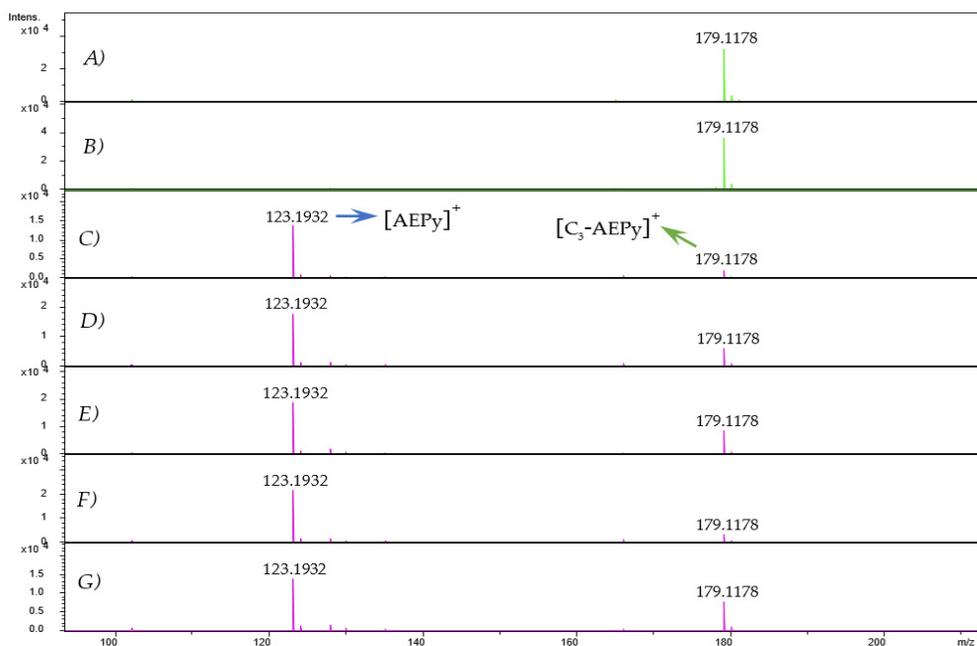


Figura 35. Espectros de masas tras las reacciones utilizando las distintas composiciones de solventes, el ion de m/z 123.19 corresponde al derivatizante sin reaccionar, mientras que el ion de m/z 179.11 corresponde ácido propiónico derivatizado (el agente de acoplamiento fue CMPI).

Los experimentos llevados a cabo únicamente con H₂O ó MeOH y con cualquier relación de ACN/H₂O o MeOH/H₂O ponen en evidencia que la reacción fue incompleta, pues se observa baja intensidad del ion de m/z 179 (correspondiente al producto de derivatización del ácido propiónico), y por la presencia de un ion de gran intensidad en m/z 123, correspondiente al AEPy sin reaccionar, esto sugiere que está ocurriendo la solvólisis del éster activo, evitando el desplazamiento de la reacción hacia la formación de los productos; la relación entre intensidades de los iones 179/123 ofrece una noción de la tendencia a solvólisis de las distintas composiciones de solventes. Como se observa en la Fig. 35, dicha relación para las mezclas ACN/H₂O presentó la tendencia E > D > C con valores de 0.5, 0.4 y 0.2, respectivamente. En el caso del solvente compuesto por MeOH 100% y por MeOH/ACN (1:1), la tendencia observada fue G > F, con valores 179/123 de 0.6 y 0.2 respectivamente. En los experimentos llevados a cabo en mezclas compuestas por solventes no nucleófilos (ACN/Et₃N y DMF) no sólo se observa mayor intensidad del ion de interés (m/z 179), sino que también se observa el consumo casi completo del derivatizante AEPy, con relación de iones 179/123 de 176.2 para A y 111.6 para B. A simple vista parece no existir una contribución importante de la trietilamina en la reactividad, sin embargo, tanto por la compatibilidad del acetonitrilo con columnas cromatográficas como por la presencia de base que potencialmente puede inhibir la protonación de especies indeseadas en mezclas complejas, se eligió al ACN/Et₃N como la mejor alternativa para las reacciones posteriores.

IV.5 Condiciones instrumentales para análisis de ácidos derivatizados con los isotopólogos de AEPy

IV.5.1 Efecto del voltaje del capilar en la intensidad de la señal y relación S/N

Se analizaron por infusión directa tres soluciones equivalentes conteniendo 23 ácidos grasos (CRM LRAC8228), derivatizados independientemente con los tres isotopólogos de AEPy- (d_0 , d_3 y d_5), se realizó un barrido de 7 niveles de voltaje en el capilar sostenidos cada uno por intervalos de 0.5 minutos en una única adquisición, en la *fig. 36* se muestra el resultado del experimento con los niveles de voltaje representados en el eje x.

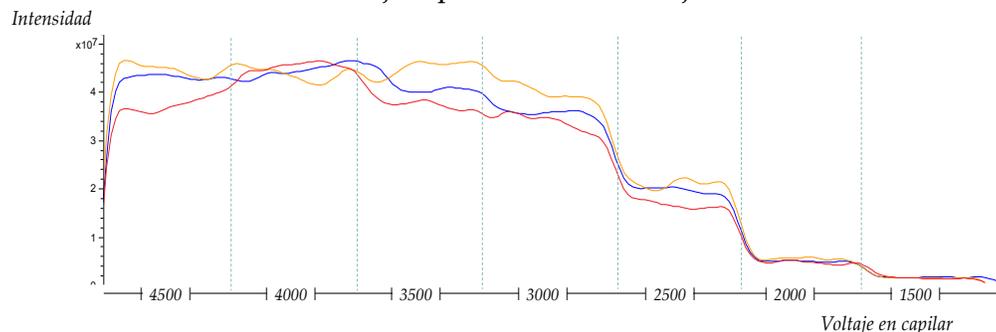
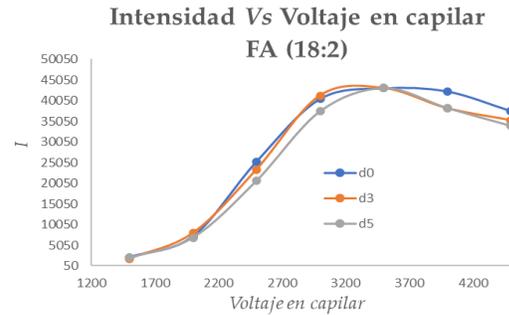
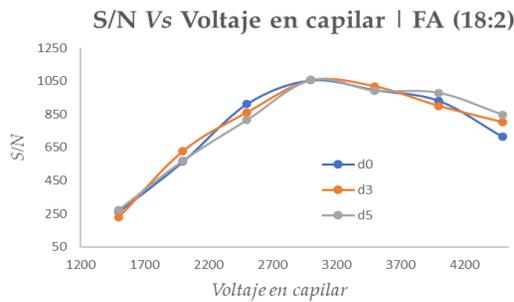
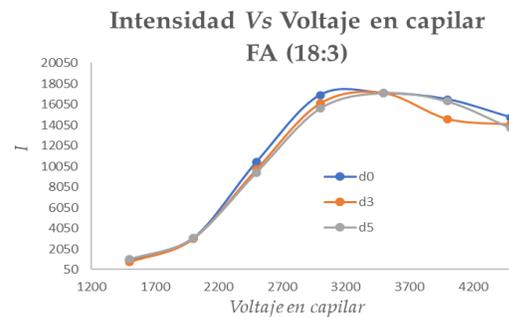
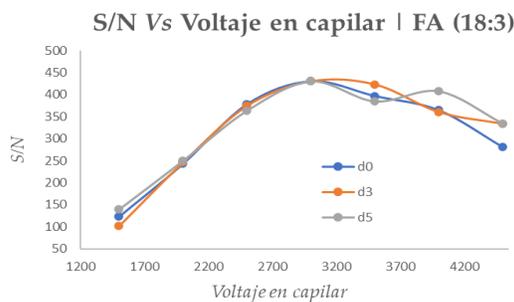


Figura 36. Variación de la intensidad de la señal en el modo TIC (total ion current por sus siglas en inglés) adquirida para las mezclas de los ácidos grasos en hígado de bacalao derivatizados con cada isotopólogo de AEPy (d_0 en azul, d_3 en naranja y d_5 en rojo) respecto al cambio de voltaje en el capilar con decrementos de voltaje de 500 Volts, desde 4500 hasta 1500 durante intervalos de tiempo de 0.5 minutos.

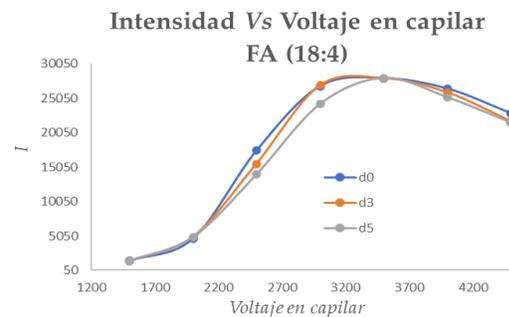
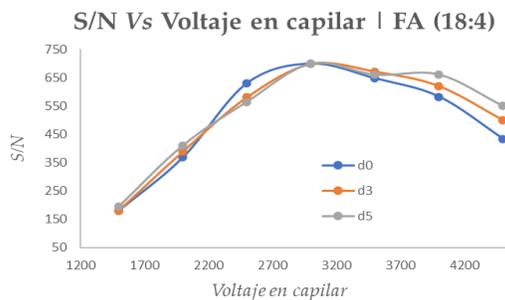
Por su parte, en la *figura 37*, se muestran los mismos datos, pero presentando las intensidades de iones extraídos para algunos ácidos de interés (18:2, 18:3, 18:4, 20:4, 20:5 y 22:6) junto con las gráficas representando la relación señal/ruido. Está claro que para todos los casos la más alta relación S/N se obtiene empleando un voltaje de 3100 Volts, por lo que se estableció este voltaje para el trabajo futuro.



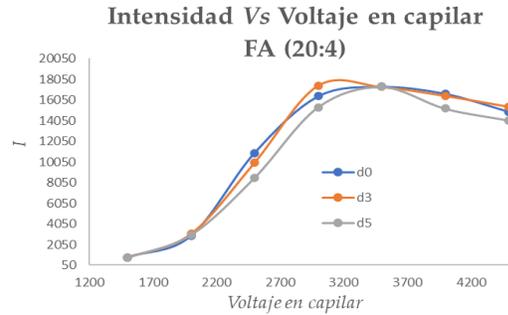
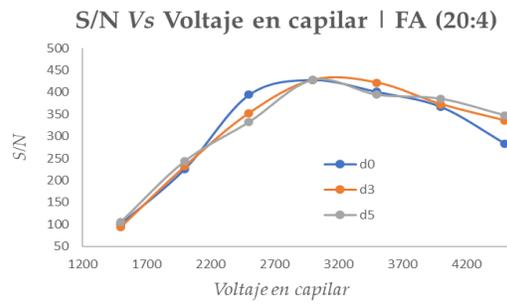
Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido linoleico 18:2 n-6



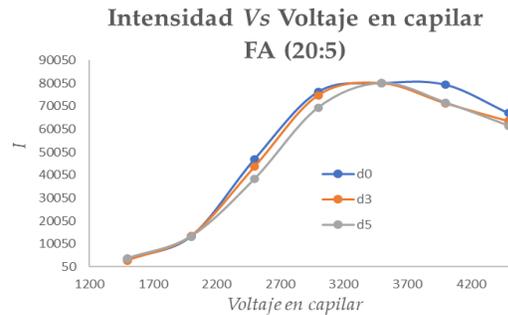
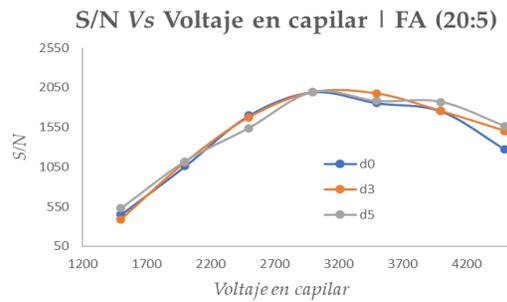
Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido α -linolénico 18:3 n-3



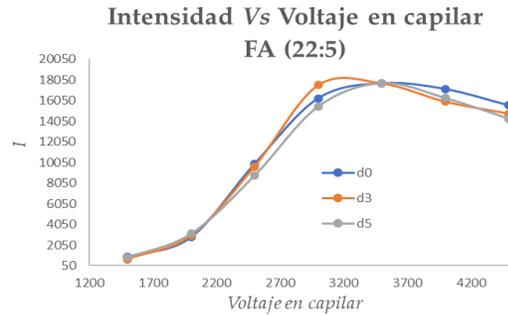
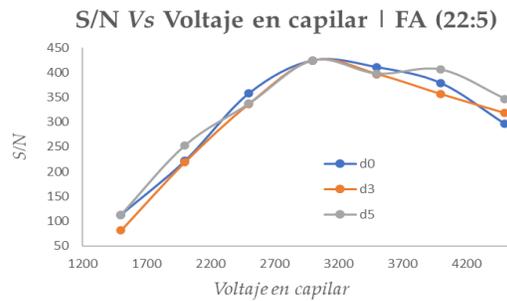
Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido estearidónico 18:4 n-3



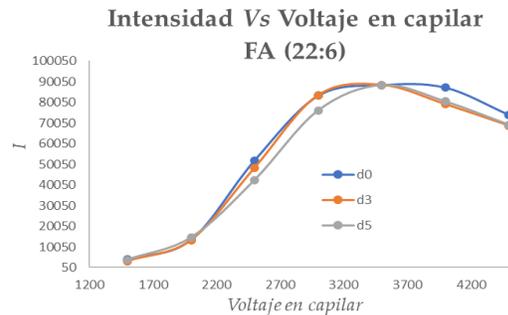
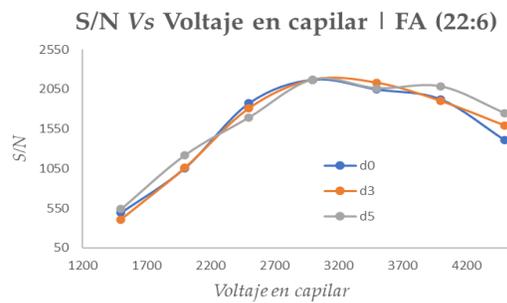
Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido araquidónico/eicosatetraenoico 20:4 n-6/n-3 con relación 29.79% : 70.21%, respectivamente.



Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3



Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido docosapentaenoico 22:5 n-3



Respuestas de relación S/N e Intensidad frente a voltaje en capilar del ácido docosahexaenoico 22:6 n-6

Figura 37. Efecto del cambio del voltaje en el capilar sobre la intensidad de la señal y la relación señal/ruido de algunos de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el material de referencia de aceite de hígado de bacalao, perfiles normalizados entre isotópologos respecto a la S/N en 3100 Volts y a la intensidad en 3500 Volts del canal d0.

IV.6 Evaluación de desempeño de sistemas de isotopólogos d_0 | d_3 y d_0 | d_5 de AEPy en la reacción de derivatización de ácidos grasos

Con las condiciones de reacción y parámetros instrumentales seleccionadas a partir de los experimentos previos, se procedió a comparar el desempeño de los pares de isotopólogos AEPy- d_0 /AEPy- d_3 y AEPy- d_0 /AEPy- d_5 , inicialmente se evaluó la uniformidad de reactividad de los tres isotopólogos en una mezcla compleja de ácidos saturados, mono- y polinsaturados presentes en el material de referencia certificado usado en experimentos anteriores (CLO, con clave LRAC8228). Luego, se compararon los factores de respuesta entre dos isotopólogos para cada sistema de pares a partir de resultados obtenidos por HPLC-ESI(+)-LIT-MS. Los espectros fueron adquiridos para mezclas 1:1 de los dos isotopólogos, obteniendo el registro de los “canales” ligero y pesado. Los datos MS se adquirieron para cinco distintos niveles de dilución.

IV.6.1 Uniformidad de reactividad de los 3 isotopólogos

Se llevaron a cabo reacciones de derivatización paralelas usando cada uno de los tres isotopólogos de AEPy (d_0 , d_3 y d_5) sobre los FA del material de referencia certificado empleando las condiciones de reacción previamente seleccionadas (concentración de FA totales de 10 mg/mL, EDC en agua al 620mM, HOBt 75mM en ACN, AEPy 75mM en ACN/Et₃N 0.1M de Et₃N, 40 °C por 30 minutos). Se adquirieron los espectros de masas para cada una de las muestras y para cada uno de los isotopólogos de AEPy por infusión directa.

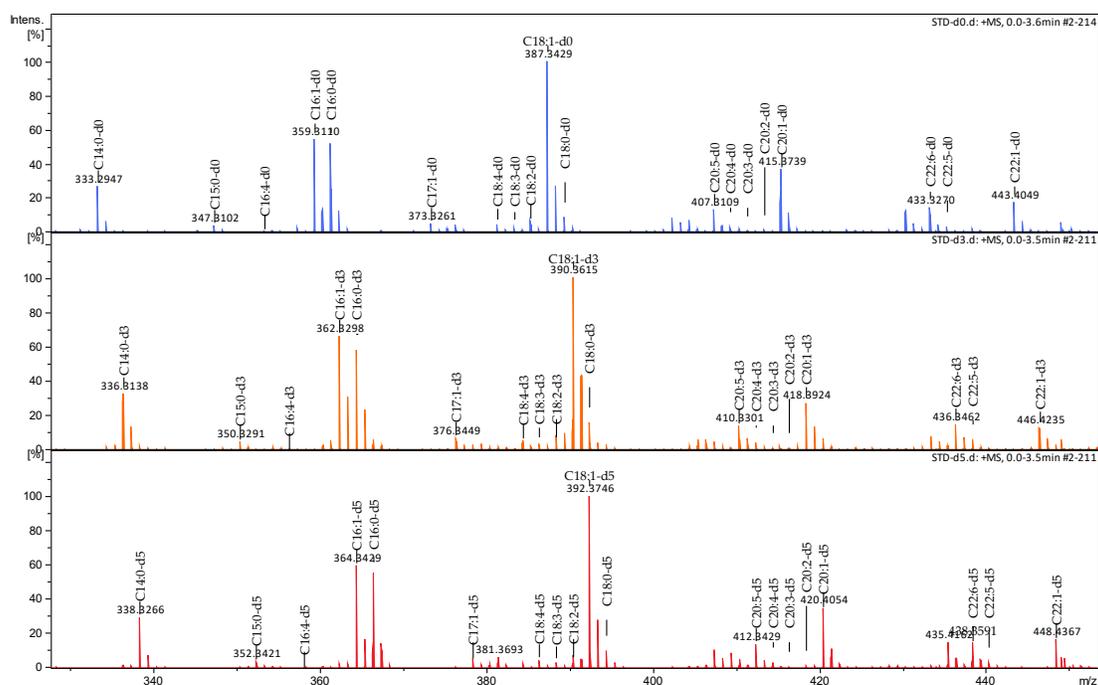


Figura 38. Espectros de masas de los ácidos grasos presentes en el aceite de hígado de bacalao derivatizados en soluciones individuales con los isotopólogos de AEPy (d_0 en azul, d_3 en naranja y d_5 en rojo) adquiridos por infusión directa en un sistema ESI-QqTOF blancos de reacción en anexo 2.

La Figura 38 muestra tres espectros adquiridos; se observa que cada uno de ellos contiene señales de las mismas especies con las etiquetas y diferencias de masas esperadas para cada clúster de FA de acuerdo con el isotópologo del derivatizante empleado.

Además, los iones registrados están en concordancia con la lista de los ácidos reportados por el proveedor del material de referencia certificado. Para comparar la eficacia de derivatización para tres isotópologos, en la figura 39 se presentan las intensidades de los iones correspondientes a cada uno de los ácidos en material de referencia, que fueron normalizados por la señal de C16:0 en el mismo espectro.

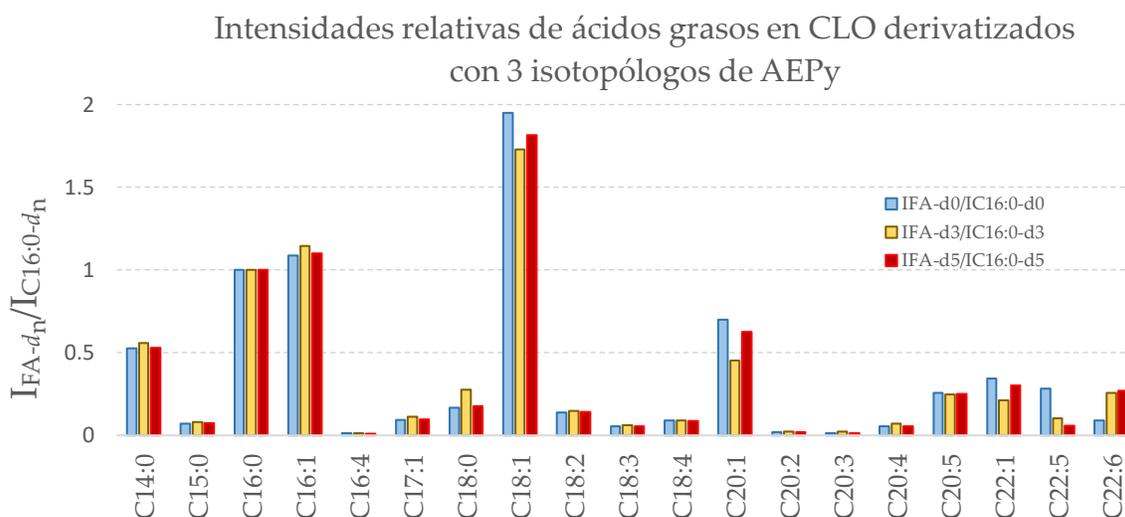


Figura 39. Intensidades de los iones de ácidos grasos en aceite de hígado de bacalao derivatizados con tres isotópologos de AEPy ($-d_n$, donde $n=0, 3$ ó 5) relativas a la intensidad del ion C16:0- d_n , adquiridos independientemente para cada serie de isotópologos por infusión directa en un sistema ESI-QqTOF.

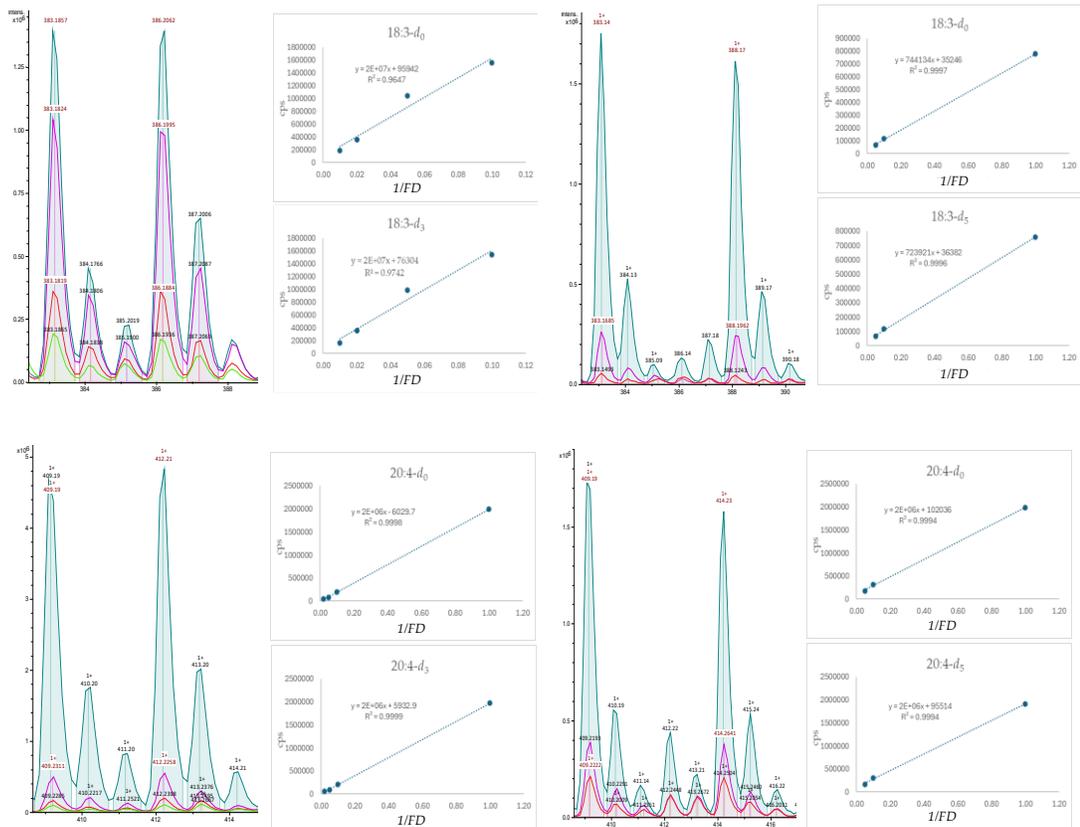
Aunque para la mayoría de los ácidos se pueden notar muy uniformes intensidades relativas entre los tres isotópologos, también existen algunos ácidos que presentan diferencias importantes. Una posible causa a considerar son las diferencias de contribuciones en el patrón isotópico de cada isotópologo, particularmente para AEPy- d_3 los iones $[M-d_3+1]^+$ y $[M-d_3+2]^+$ presentan intensidades relativas al ion pseudo-monoisotópico distintas respecto a las de AEPy- d_0 y AEPy- d_5 . Cabe también recordar que en el espectro adquirido con la introducción por infusión directa aparecen todos iones generados a partir de la muestra con varios iones para cada ácido graso, reflejando patrones isotópicos naturales o alterados por la presencia de deuterio; estos clústeres son distribuidos en escala de valores m/z en función de su tamaño de cadena y con separaciones de dos Da para cada insaturación en la cadena y desplazamientos por la incorporación de deuterios; por ello pueden formarse diferentes solapamientos entre iones de diferentes compuestos y sus isotópologos, como una fuente de potenciales interferencias espectrales. Otras fuentes de error podrían originarse a partir de componentes de matriz procedentes de la muestra derivatizada,

afectando diferenciadamente a los ácidos derivatizados con cada isotópologo en función de sus relaciones m/z .

Para evitar este tipo de interferencias, se puede incorporar una etapa de separación cromatográfica de los derivados de los ácidos grasos para su acoplamiento on-line con el sistema ESI(+)-QTOF-MS.

IV.6.2 Comparación de los factores de respuesta de los sistemas de isotópologos

Para emplear un compuesto como estándar interno, es deseable que éste presente un error relativo < 5 % en el factor de respuesta respecto al analito de interés. Para evaluar lo anterior, para cada sistema de isotópologos se preparó una solución madre de concentración 10 mg/mL del material de referencia con mezcla 1:1 de los ácidos del CRM derivatizados con cada isotópologo, posteriormente se realizaron 5 diluciones (con factores de dilución x1, x10, x20, x50 y x100), se graficaron curvas de cambio de intensidad respecto al inverso del factor de dilución (1/FD) de los iones en ambos pares de sistemas utilizando entre 3 y 5 puntos, se consideró la pendiente de la función obtenida por el método de regresión lineal como factor de respuesta en cada uno de los casos.



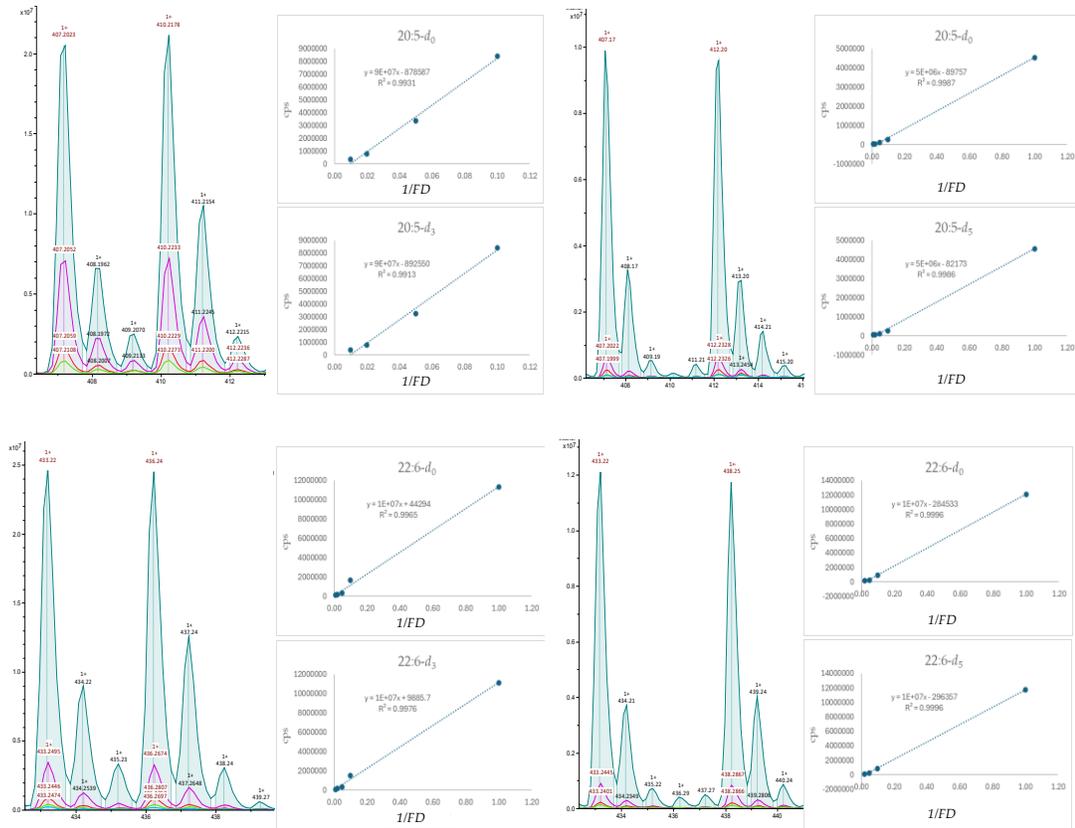


Figura 40. Comparación de factores de respuesta entre pares de isotopólogos $d_0|d_3$ y $d_0|d_5$ de los ácidos grasos en hígado de bacalao derivatizados con AEPy, específicamente se muestran los espectros de los pares de señales con concentración decreciente (de acuerdo con grado de dilución), así como sus correspondientes curvas de respuesta y parámetros de regresión lineal y ecuación de la función.

para encontrar la mejor R^2 , se compararon los canales d_0 y d_3 para cada ácido en el primer sistema, así como los d_0 y d_5 en el segundo sistema (fig. 40).

Para cada uno de los sistemas de isotopólogos, se analizaron simultáneamente y bajo las mismas condiciones los dos canales de cada ácido graso en los distintos niveles de dilución, lo anterior gracias a las mezclas 1:1 tanto para $d_0|d_3$ como para $d_0|d_5$, encontrando errores relativos de la pendiente de las curvas de calibración menores al 5% (entre 0.05 y 3.63%) en todos los casos, lo que demuestra que ambos sistemas cumplen con el criterio para emplearse como estándares internos, en la tabla 3 se muestran los resultados para los cuatro PUFAs de interés presentes en la muestra evaluada e ilustrados en la figura 40.

Ácido graso	Mezcla de isotopólogos d_0 d_3			Mezcla de isotopólogos d_0 d_5		
	%Error (<i>m</i>)	No. de puntos	R ²	%Error (<i>m</i>)	No. de puntos	R ²
18:3	0.05	4	0.9647 (d_0)	2.79	3	0.9997 (d_0)
			0.9742 (d_3)			0.9996 (d_5)
20:4	1.85	4	0.9998 (d_0)	3.63	3	0.9994 (d_0)
			0.9999 (d_3)			0.9994 (d_5)
20:5	0.400	5	0.9987 (d_0)	0.22	4	0.9931 (d_0)
			0.9986 (d_3)			0.9913 (d_5)
22:6	1.61	5	0.9965 (d_0)	2.9	4	0.9996 (d_0)
			0.9997 (d_3)			0.9996 (d_5)

Tabla 3. Parámetros obtenidos de la comparación de factores de respuesta para ambos pares de isotopólogos (d_0 | d_3 y d_0 | d_5) de AEPy de cuatro ácidos grasos poliinsaturados presentes en la mezcla de reacción, denotando principalmente los errores relativos de las pendientes entre isotopólogos de cada par, utilizando entre 3 y 5 puntos de dilución y con coeficientes de regresión lineal altos (0.9647-0.9999).

IV.7 Derivatización de ácidos grasos en muestras reales utilizando los isotopólogos d_0 , d_3 y d_5 de AEPy

En el primer intento, se realizaron derivatizaciones de ácidos extraídos de diferentes aceites vegetales comestibles; estos extractos se prepararon y analizaron por ESI(+)-QTOF-MS utilizando las condiciones seleccionadas previamente. El perfil de ácidos grasos encontrado en cada muestra fue comparado con reportes anteriores sobre el contenido de ácidos grasos en estos productos con el fin de verificar si las condiciones de reacción e instrumentales propuestas en este trabajo son adecuadas para el análisis de muestras reales de composición compleja.

IV.7.1 Derivatización de ácidos grasos en muestras reales

Se utilizaron 7 aceites vegetales adquiridos en tiendas departamentales locales en la ciudad de Guanajuato, Gto. México, aceites extra virgen de chía, linaza, ajonjolí, oliva 1 y 2 (dos marcas distintas) y aceites puros de semilla de uva y de aguacate, cuyas declaraciones nutrimentales reportadas en las respectivas etiquetas se describen en la *tabla 4*.

Antes de la derivatización, se llevó a cabo la liberación de ácidos grasos de triglicéridos y su extracción, utilizando el procedimiento desarrollado por Quehenberger y colaboradores (Quehenberger et al., 2011) en apego al consorcio de LIPID MAPS. Cabe mencionar que el protocolo citado fue desarrollado para el análisis de matrices biológicas, pero este fue adaptado a las condiciones adecuadas para aceites vegetales (anexo 3). Específicamente, a 100 mg de cada aceite se adicionó 1 mL de MeOH:KOH al 15% (m/m), se incubaron las mezclas por media hora a 37 °C, transcurrido el tiempo se acidificó hasta alcanzar un pH <5

Aceite	Tamaño de la porción	Lípidos totales	Saturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
<i>Chía</i>	100 mL	93 g	11 g	8 g	74 g (20 g ω -6 y 54 g ω -3)
<i>Linaza</i>	100 mL	92 g	9 g	17 g	66 g (16 g ω -6 y 50 g ω -3)
<i>Oliva (1)</i>	100 g	100 g	15 g	78 g	7 g
<i>Oliva (2)</i>	14 g	14 g	2.1 g	10.9 g	1 g
<i>Uva</i>	10 g	9.97 g	1.12 g	2.43 g	6.42 g
<i>Aguacate</i>	5 mL	4.6 g	0.9 g	3.0 g	0.7 g
<i>Ajonjolí</i>	100 mL	99.6 g	15.1 g	40.5 g	43.9 g

Tabla 4. Composición de lípidos de los aceites empleados para las pruebas de derivatización de acuerdo con las etiquetas de los proveedores, notablemente los proveedores de aceite de chía y de linaza especificaron los porcentajes de omega 3 y 6 dentro de la composición de los lípidos poliinsaturados de dichos aceites.

adicionando 2.3 mL de HCl_{ac} 1N para después extraer los ácidos grasos libres dos veces con 3 mL de iso octano, finalmente los extractos lipídicos se reunieron y se secaron.

Se determinó la masa de ácidos grasos totales obtenidos a partir de los 100 mg de cada aceite (77.3 mg en chía, 78.9 mg en linaza, 77.4 mg en ajonjolí, 77.9 mg en aguacate, 66.3 mg en uva, 47.2 mg en oliva 1, 46.8 en oliva 2), lo que da una noción del contenido de ácidos libres y ácidos en forma de triglicéridos. A partir de estas muestras se prepararon soluciones con concentración 10 mg/mL de ácidos grasos en ACN:DMF (4:1). Se tomaron alícuotas de 20 μ L de cada una de las soluciones adicionando 20 μ L de EDC·HCl 620 mM y 20 μ L de HOBt 75 mM y dejándolo actuar por 10 minutos a temperatura ambiente (esta etapa correspondió a la activación de los ácidos formando sus esteres con ECD). Posteriormente se adicionaron 20 μ L de AEPy-do 75 mM y las muestras se calentaron a 40 °C durante 30 minutos. Terminada la reacción de derivatización se diluyeron las mezclas de reacción 10 veces en ACN:H₂O (1:1) para ser analizadas por ESI(+)-QTOF-MS mediante infusión directa (figura 41).

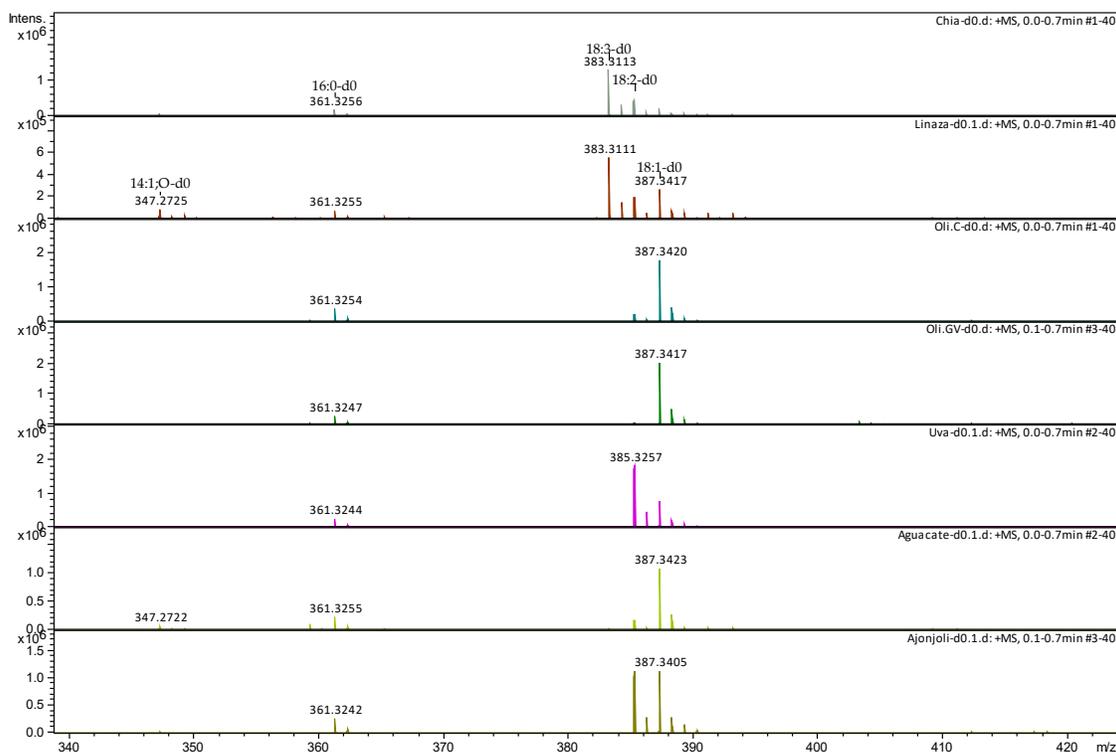


Figura 41. Espectros de masas obtenidos de ácidos grasos totales extraídos de diferentes aceites vegetales y derivatizados con AEPy- d_0 . Las soluciones fueron introducidas por infusión directa en un sistema ESI(+)-QqTOF-MS.

Con base en los valores m/z de los iones más intensos en los espectros adquiridos, se confirma que los ácidos grasos mayoritarios para todos los aceites vegetales fueron los de 18 carbonos. Incluso considerando que la respuesta instrumental no es necesariamente igual para cada ácido, se puede notar una distribución de intensidades de las señales de ácidos consistente con lo reportado en el perfil nutricional por los proveedores de los aceites. Como ejemplo, los perfiles de ácidos en aceites de chía y linaza son similares en la descripción nutricional, conteniendo ambos al ácido linolénico (C18:3, ω -3) de relación m/z 383 como el FA mayoritario; además, la linaza contiene poco más del doble de ácidos monoinsaturados respecto a la chía, lo cual queda claramente reflejado en las intensidades del ion 387 (C18:1) respecto a las de los iones 383 y 385 en cada muestra. Otra observación que confirma un buen desempeño del procedimiento de derivatización propuesto es la concordancia de los perfiles obtenidos experimentalmente con los esperados en los espectros de aceites de oliva (1 y 2) y de aguacate, en los que el ácido oleico (C18:1) es el mayoritario. Por último, la relación casi 1:1 de ácidos mono- y poliinsaturada declarada para el aceite de ajonjolí queda evidenciada en los iones de intensidad similar 385 (C18:2) y 387 (C18:1).

El siguiente paso fue comparar los espectros adquiridos para las mismas muestras de aceites, pero utilizando AEPy- d_0 y AEPy- d_5 como agentes derivatizantes; dichos espectros se

presentan en la *figura 42*; para mayor claridad se presentan regiones espectrales correspondientes a iones de los ácidos C18 con 0-3 insaturaciones.

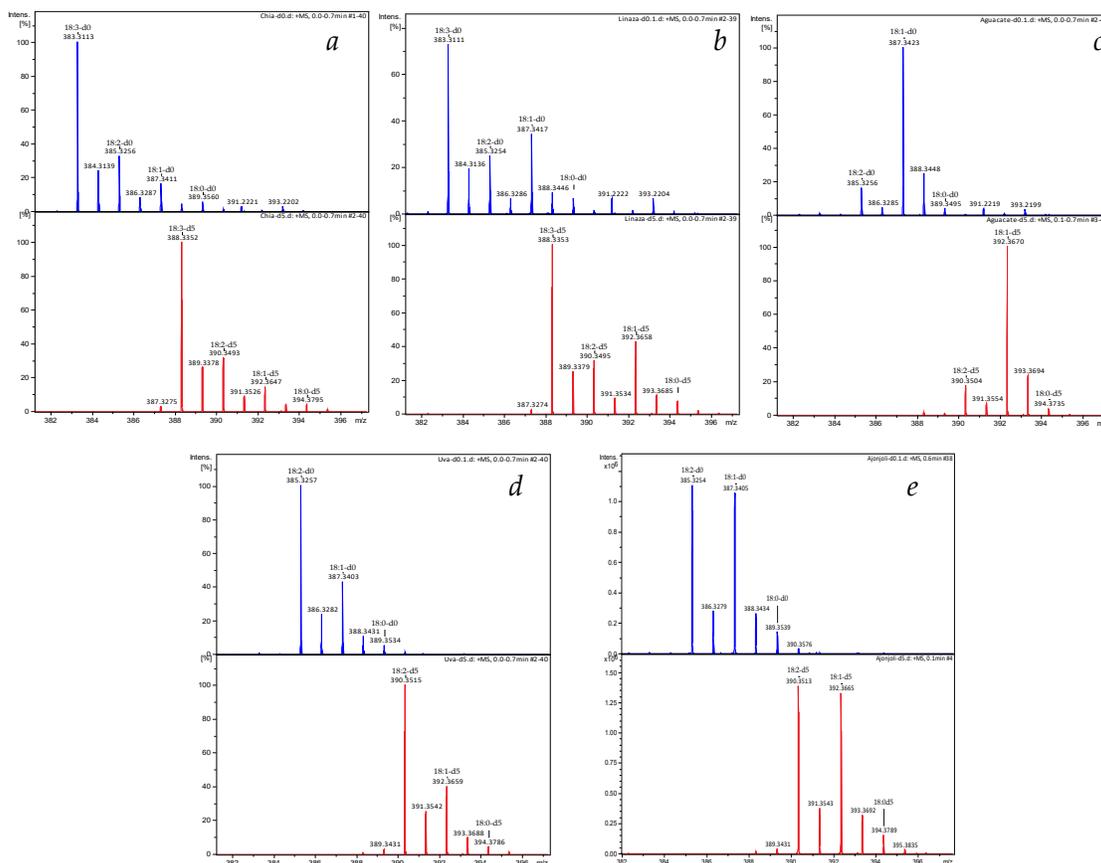


Figura 42. Sección de espectros de masas donde aparecen señales de los ácidos grasos de dieciocho carbonos con entre 0 y 3 insaturaciones derivatizados por separado con el sistema de isotopólogos AEPy-*d*₀ y AEPy-*d*₅ para los ácidos extraídos de los siguientes 5 aceites vegetales: *chía* a), *linaza* b), *aguacate* c), *uva* d) y *ajonjolí* e), analizados por infusión directa en ESI-QqTOF.

Es importante enfatizar que la composición de ácidos grasos C18 es representativa para cada uno de los aceites en términos de la variedad de número de insaturaciones y en términos de la distribución relativa del contenido de cada uno de estos ácidos. Dichas diferencias en los perfiles de los FA entre distintos aceites se observan en la *figura 42*. Así mismo, la derivatización con dos isotopólogos de AEPy (*d*₀ y *d*₅) arrojó perfiles de señales muy consistentes entre los dos canales para las cinco muestras tomadas como ejemplo. Con estos resultados se confirma que los isotopólogos de AEPy obtenidos en este trabajo serán útiles en el análisis cuantitativo de los FA en aceites vegetales. El isotopólogo deuterado puede ser utilizado para obtener un estándar interno o para distinguir los calibrantes de los analitos naturalmente presentes en la muestra en una sola corrida analítica y en el mismo espectro de masas.

IV.8 Análisis de ácidos grasos en muestras reales mediante derivatización codificada por isótopos con enfoques dirigido y no dirigido y comparación de desempeño de los sistemas AEPy- d_0 |AEPy- d_3 y AEPy- d_0 |AEPy- d_5

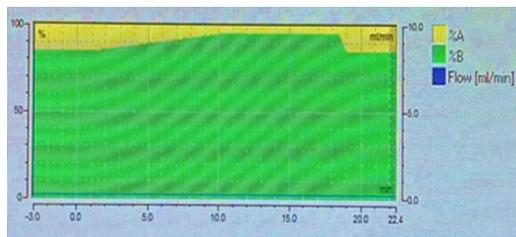
El derivatizante codificado por isótopos AEPy se aplicó al perfilado de ácidos grasos (enfoque no dirigido) en aceite de pescado comparando ambos sistemas de isotopólogos ($d_0|d_3$ y $d_0|d_5$). Además, se llevó a cabo el análisis cuantitativo de FA en varias muestras, incluyendo 7 aceites vegetales comestibles, 3 suplementos basados en aceite de pescado y un alga comestible, lo anterior empleando el sistema de isotopólogos AEPy $d_0|d_5$ mediante un enfoque dirigido, generando estándares internos tipo ILIS vía ICD aplicado a un material de referencia certificado.

IV.8.1 Enfoque no dirigido

La idea en esta parte del trabajo fue derivatizar los FA en una muestra con tres isotopólogos de AEPy en tres alícuotas de esta muestra por separado y preparar mezclas correspondientes a AEPy- d_0 |AEPy- d_3 y AEPy- d_0 |AEPy- d_5 para su análisis por espectrometría de masas. En este caso se llevó a cabo una previa separación cromatográfica y el espectrómetro de masas con trampa iónica (HPLC-ESI(+)-ITMS). Esto con el fin de hallar los patrones isotópicos conferidos por el par de cada sistema y de esta manera anotar las señales correspondientes a los ácidos grasos y descartar potenciales señales artefacto y/o componentes de la matriz. La asignación de los FA fue en base a los patrones isotópicos de cada sistema que aparecen con diferencias de masa constantes de $\Delta m=3.02$ Da para el sistema $d_0|d_3$ y $\Delta m=5.03$ Da para el sistema $d_0|d_5$. Se utilizó el aceite de menhaden (producto de sigma, CAS No. 8002-50-4) como modelo de prueba debido a su diverso contenido de ácidos grasos. La composición de ácidos grasos en este producto reportada por el fabricante es la siguiente: 6-9 % de mirístico (14:0), 15-20 % de palmítico (16:0), 9-14 % de palmitoleico (16:1), 3-4 % de esteárico (18:0), 5-12 % de oleico (18:1), < 3 % de linoleico (18:2), < 3 % de linolénico (18:3), 2-4 % de estearidónico (18:4 ω -3), < 3% de araquidónico (20:4), 10-15 % de eicosapentaenoico (20:5 ω -5), 8-15 % de docosahexaenoico (22:6 ω -3) y un 20% remanente de ácidos grasos no identificados.

Para el análisis del aceite de menhaden se procedió con la extracción y aislamiento de los ácidos grasos mediante la metodología descrita en el apartado anterior, saponificación seguida de acidificación, extracción, secado y reconstitución en ACN/DMF (4:1). Luego, alícuotas iguales de 20 μ L de una solución de la muestra (correspondiente a 10 mg/mL de FA) fueron sometidas a derivatización en paralelo con los tres isotopólogos de AEPy (d_0 , d_3 y d_5), terminada la reacción se reunieron partes iguales de cada par de canales d_0 con d_3 y d_0 con d_5 para ser analizadas por HPLC-ESI(+)-ITMS (figuras 43 y 44 y anexo 4). Las condiciones cromatográficas se especifican a continuación:

- Fase móvil A: MeOH
- Fase móvil B: NH₄HCO₂ 10 mM
- Columna: Kinetex C18 150 x 3 mm, 2.6µm.
- Tiempo de corrida: 14 minutos
- Rango de m/z: 250-600



Gradiente de elución

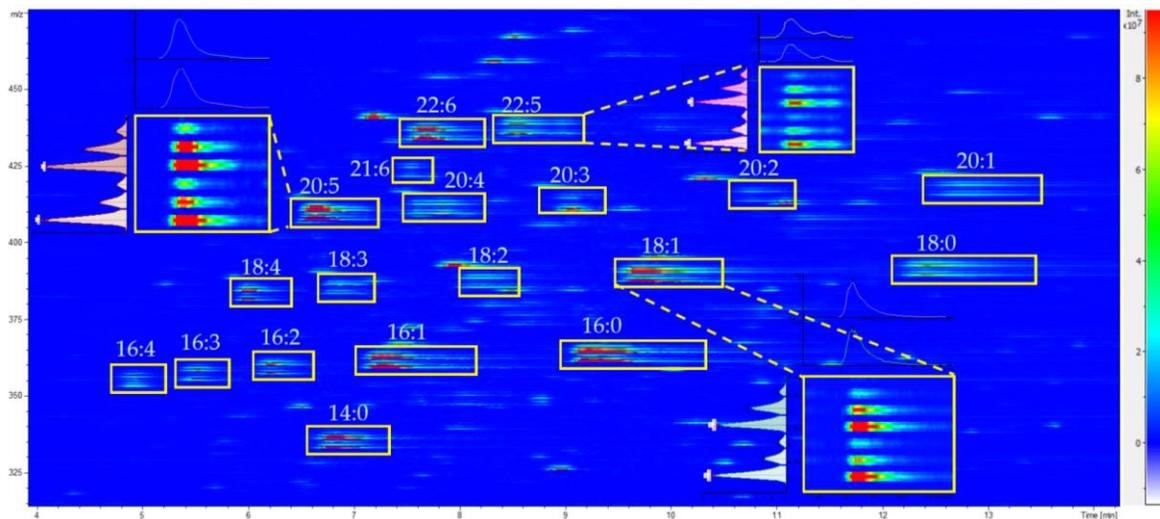


Figura 43. Cromatograma de ácidos grasos en aceite de menhaden derivatizados con pares de isotopólogos AEPy-d₀/d₃ visualizado como mapa de calor.

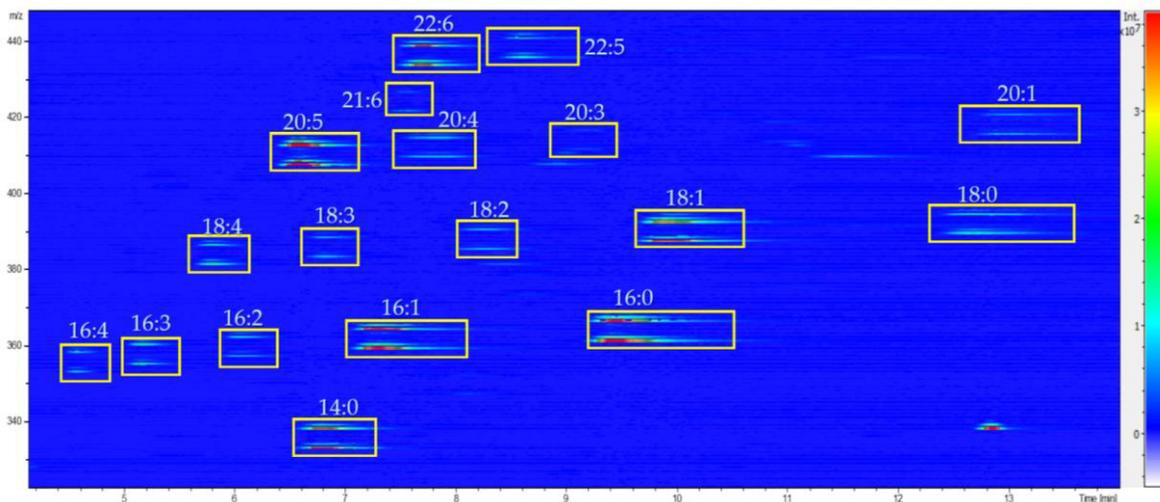
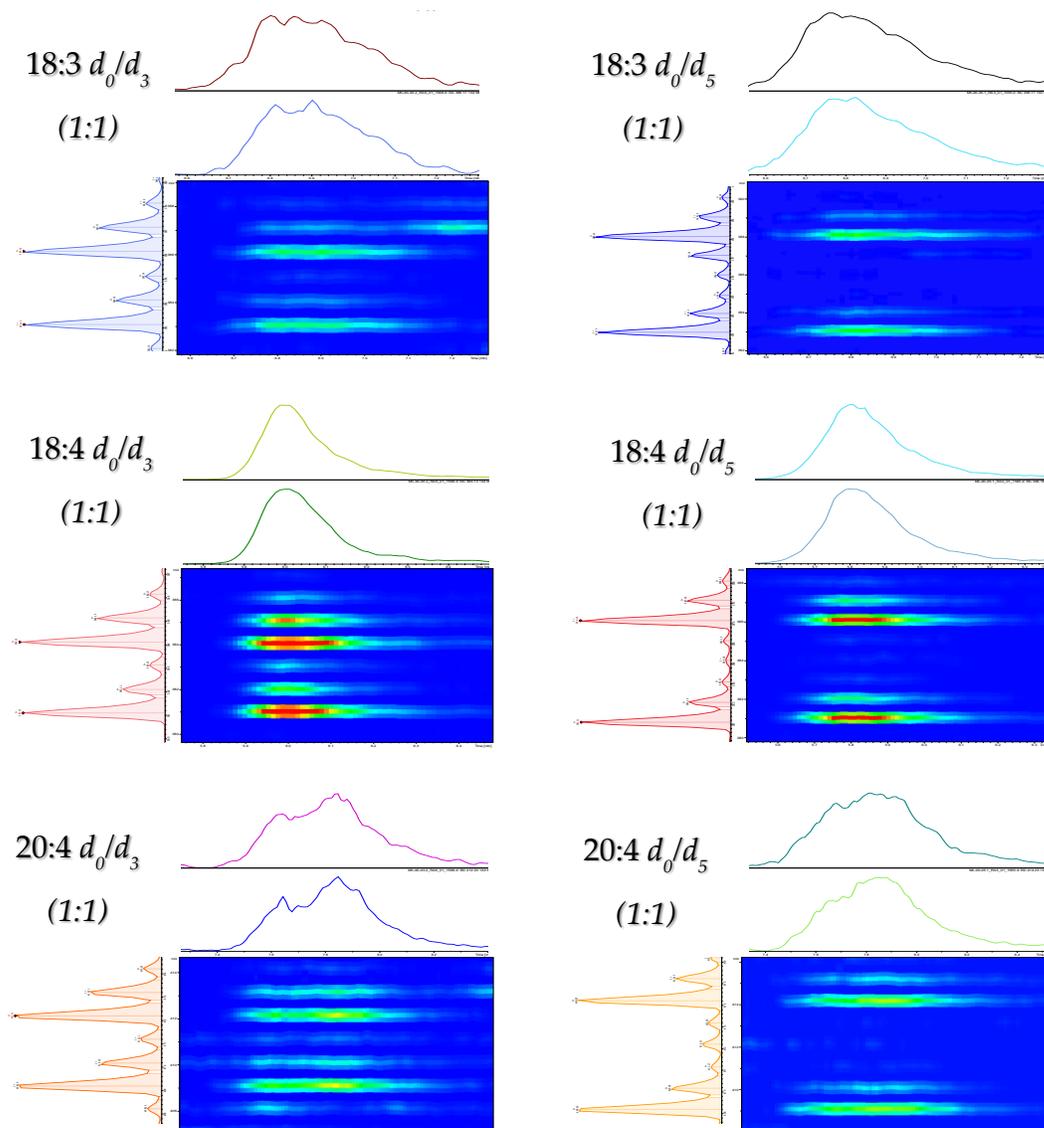


Figura 44. Cromatograma de ácidos grasos en aceite de menhaden derivatizados con pares de isotopólogos AEPy-d₀/d₃ visualizado como mapa de calor.

El perfil de ácidos grasos es consistente con la composición reportada por el proveedor, siendo los ácidos mayoritarios el palmítico (16:0, 15-20 %), el palmitoleico (16:1, 9-14 %), el eicosapentaenoico (20:5 ω-3, 10-15 %) y el docosahexaenoico (22:6 ω-3, 8-15 %), esperados y

observados en rangos de concentración similares, seguidos del oleico (18:1, 5-12 %) y del mirístico (14:0, 6-9 %). A continuación, se muestran ampliificaciones de los pares de picos correspondientes a ácidos grasos procedentes de aceite de menhaden derivatizados con ambos sistemas de isotopólogos de AEPy (d_0/d_3 y d_0/d_5) bajo las mismas condiciones de adquisición, evidenciando apropiada co-elución entre ambos pares de isotopólogos y diferencia de masa con correcta definición de patrones isotópicos en ambos casos *Figura 45*.



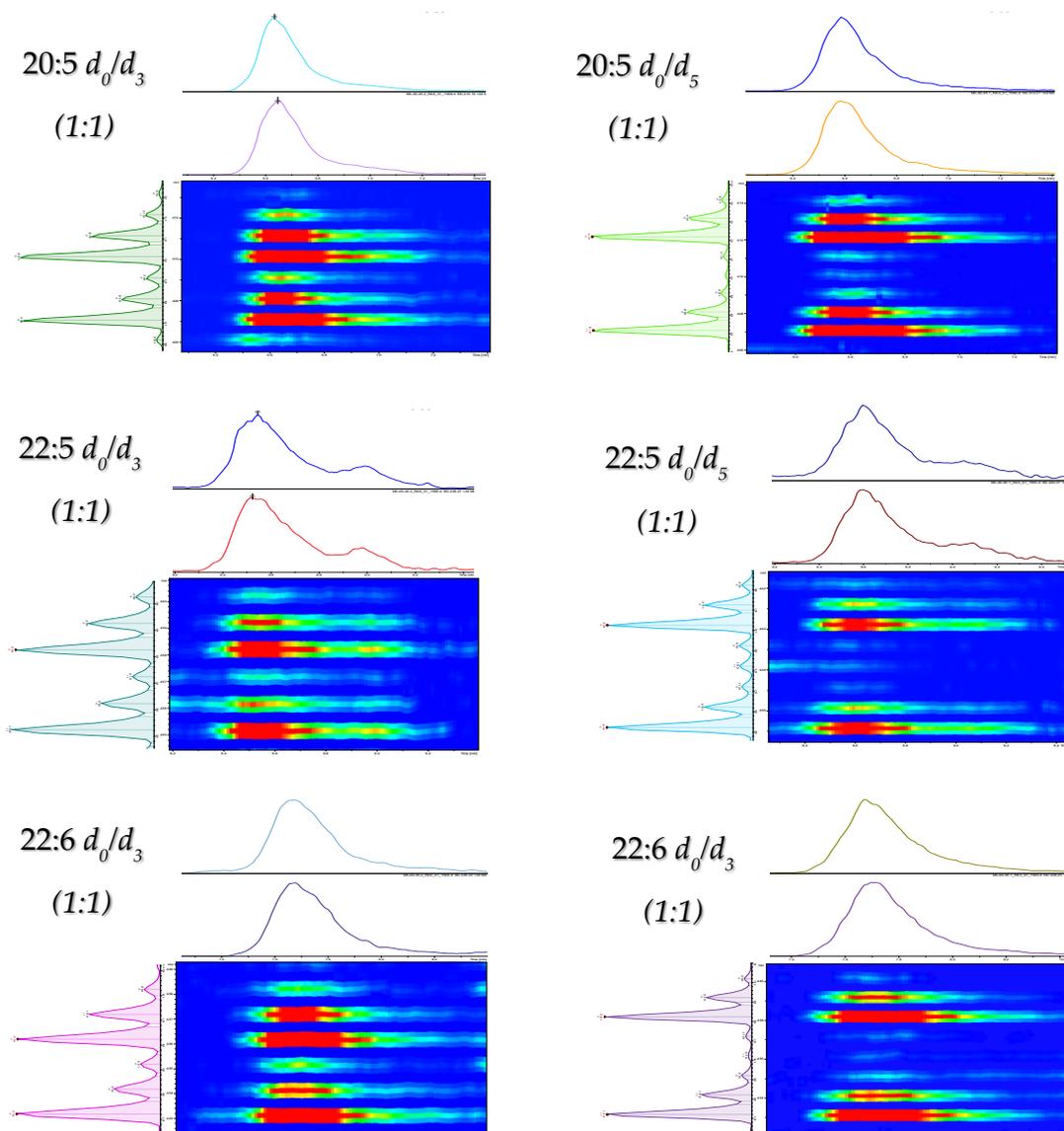


Figura 45. Amplificaciones de las señales correspondientes a ambos sistemas de pares de isotopólogos (d_0/d_3 y d_0/d_5) de PUFAs de la serie ω -3 (18:4, 20:5 y 22:6, de acuerdo con lo indicado por el proveedor) y otros potenciales ω -3 encontrados en aceite de menhaden tras ICD con AEPy. (Tiempo de retención en el eje x y relación m/z en el eje y).

Se anotaron ocho ácidos grasos adicionales a los once reportados por el proveedor, de entre los cuales uno consistió en un ácido graso poco convencional y que sale del rango de detección de la técnica de oro para determinación de ácidos grasos (GC-FID), se trató del ácido graso de cadena muy larga y altamente insaturado (VLC-HUFA, por sus siglas en inglés) 28:8 (ω -3) (fig. 46), reportado previamente en dinoflagelados y PUFAs concentrados a partir de aceites de peces (Mansour, 2005; Mansour et al., 1999; Van Pelt et al., 1999).

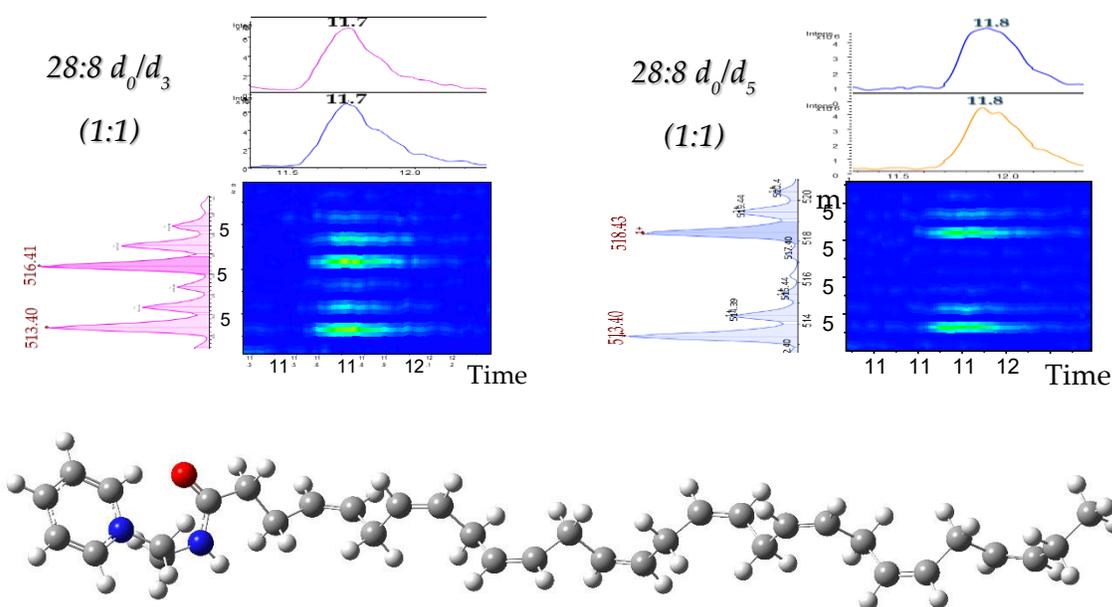


Figura 46. Amplificaciones de las señales correspondientes a ambos sistemas de pares de isotopólogos (d_0/d_3 y d_0/d_5) del VLC-HUFA (very long chain highly unsaturated fatty acid) encontrado en el aceite de menhaden tras ICD con AEPy, y su estructura optimizada en su versión extendida.

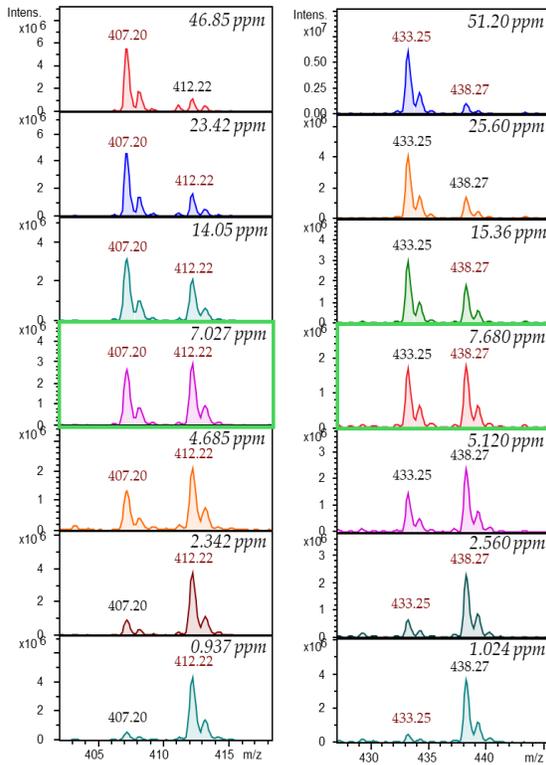
Aunque en esta parte del trabajo se analizó el aceite de menhaden, cuya composición esta reportada por el proveedor, se demostró la capacidad de la estrategia de derivatización con dos diferentes isotopólogos pesados del agente derivatizante en la detección/confirmación de ácidos grasos no incluidos en la etiqueta del producto.

IV.8.2 Enfoque dirigido

Se analizaron 11 muestras reales, 7 consistieron en aceites comestibles: chía, linaza, aguacate, ajonjolí, semilla de uva, oliva-1, oliva-2, tres consistieron en suplementos dietéticos basados en aceite de pescado, y una muestra sólida de alga comestible (*Porphyra yezoensis*). Se obtuvieron curvas de calibración para 15 ácidos grasos contenidos en el material de referencia certificado (Cod Liver Oil SA LRAC8228) utilizando 7 niveles de concentración a partir de una solución madre de 2 mg/mL de ácidos totales derivatizados con AEPy- d_0 obteniendo concentraciones de FA totales (en mg/mL) de: 0.5, 0.25, 0.15, 0.075, 0.05, 0.025 y 0.01, como estándares internos se usó una mezcla de ácidos del CRM derivatizados con AEPy- d_5 añadido a cada punto de la curva con una concentración de 0.075 mg/mL. De los ácidos en el CRM, 15 consistieron en isómeros estructurales únicos de FA y 4 consistieron en mezclas de isómeros estructurales de FA (el proveedor no ofrece detalles sobre el perfil de estereoisómeros de los PUFAs contenidos en el material), a continuación, se enlistan los iones correspondientes a cada especie o mezcla, así como las ecuaciones de funciones obtenidas por método de regresión lineal para cada uno de los ácidos, sus niveles extremo de concentración (C_m : conc. inferior y C_M : conc. superior) y coeficiente de correlación lineal:

Ácido graso (o mezcla de isómeros)	Composición %	m/z d ₀ /d ₅	C _m -C _M (ppm)	Función de calibración	R ²
14:0	4.77	333.3/338.3	0.477-23.9	$C=0.206(R_{d0/d5})+0.027$	0.9995
15:0	0.36	347.3/352.3	0.036-1.80	$C=1.957(R_{d0/d5})+0.346$	0.9993
16:0	10.00	361.3/366.3	1.00-50.0	$C=0.108(R_{d0/d5})+0.0274$	0.9997
16:1 (n-7)	10.06	359.3/364.3	1.01-50.3	$C=0.109(R_{d0/d5})+0.0831$	0.9996
16:4 (n-1)	0.40	353.2/358.3	0.040-2.00	N.D.	N.D.
18:0	1.97	389.3/394.4	0.197-9.85	$C=0.529(R_{d0/d5})+0.0221$	0.9997
18:1 (n-7 ; n-9)	4.93 ; 19.14	387.3/392.4	2.41-120	$C=0.0429(R_{d0/d5})+0.0177$	0.9999
18:2 (n-6)	1.78	385.3/390.3	0.178-8.90	$C=0.578(R_{d0/d5})+0.139$	0.9997
18:3 (n-3)	0.88	383.3/388.3	0.088-4.40	$C=1.281(R_{d0/d5})+0.042$	0.9997
18:4 (n-3)	2.57	381.3/386.3	0.257- 12.85	$C=0.427(R_{d0/d5})+0.0932$	0.9996
20:1 (n-7 ; n-9 ; n- 11)	0.42 ; 10.33 ; 2.05	415.4/420.4	1.075-53.7	$C=0.0961(R_{d0/d5})+0.0455$	0.9992
20:2 (n-6)	0.28	413.3/418.4	0.028-1.40	N.D.	N.D.
20:3 (n-3)	0.17	411.3/416.4	0.017-0.85	N.D.	N.D.
20:4 (n-3 ; n-6)	0.99 ; 0.42	409.3/414.3	0.141-7.05	$C=0.591(R_{d0/d5})+0.279$	0.9998
20:5 (n-3)	9.37	407.3/412.3	0.93746.8	$C=0.116(R_{d0/d5})+0.0145$	0.9999
21:5 (n-3)	0.47	421.3/426.3	0.047-2.35	N.D.	N.D.
22:1 (n-9 ; n-11)	0.72 ; 6.38	443.4/448.4	0.71-35.5	$C=0.139(R_{d0/d5})+0.0386$	0.9992
22:5 (n-3)	1.31	435.3/440.4	0.131-6.55	$C=0.693(R_{d0/d5})+0.286$	0.9997
22:6 (n-3)	10.24	433.3/438.3	1.02-51.2	$C=0.113(R_{d0/d5})+0.0493$	0.9999

Tabla 5. Composición porcentual en masa de ácidos grasos contenida en el material de referencia certificado (Cod Liver Oil SA LRAC8228), en el caso de isómeros se muestran agrupados por el nivel de alcance del método utilizado en este trabajo. En los siguientes columnas se representan los valores m/z utilizados para cada uno de los ácidos y su isotópologo, nivel mínimo (C_m) y máximo (C_M) de concentración, ecuación de calibración y R² correspondientes.



Cómo ejemplo del principio de la calibración con estándar interno vía ICD, se ilustra la variación de relación de isotopólogos con cambios de concentración del isotopólogo ligero respecto al isotopólogo pesado (constante en todos los puntos), para dos PUFAs de interés con par de isotopólogos d_0/d_5 de relación m/z 407.20 y 412.22 para EPA y m/z 433.25 y 238.27 para DHA, cuyos isotopólogos pesados se adicionan en cada punto de calibración con una concentración conocida de 7.027 y 7.680 ppm, respectivamente. Se denota con un recuadro verde el nivel de dilución en el que se igualan las concentraciones del estándar derivatizado con AEPy- d_0 de ambos EPA y DHA con sus respectivos estándares internos derivatizados con AEPy- d_5 (figura 47, EIC en anexo 5y 6).

Figura 47. Ejemplo de siete niveles de concentración donde se observan cambios relativos de intensidad entre isotopólogos, conteniendo en el canal ligero los estándares de EPA y DHA de concentración decreciente, mientras que en el canal pesado se contienen los “spikes” de estándares internos, ambos generados a partir del CRM con el par de isotopólogos AEPy d_0/d_5 . Paralelamente a la construcción de las curvas de calibración, se adicionó la misma cantidad de estándar interno a través del canal d_5 a cada una de las muestras reales (derivatizadas con el canal d_0) a un nivel de dilución de ácidos grasos totales de 52.08 ppm para llevar a cabo el análisis LC-MS e interpolar el perfil de ácidos grasos de las muestra problema (figura 48).

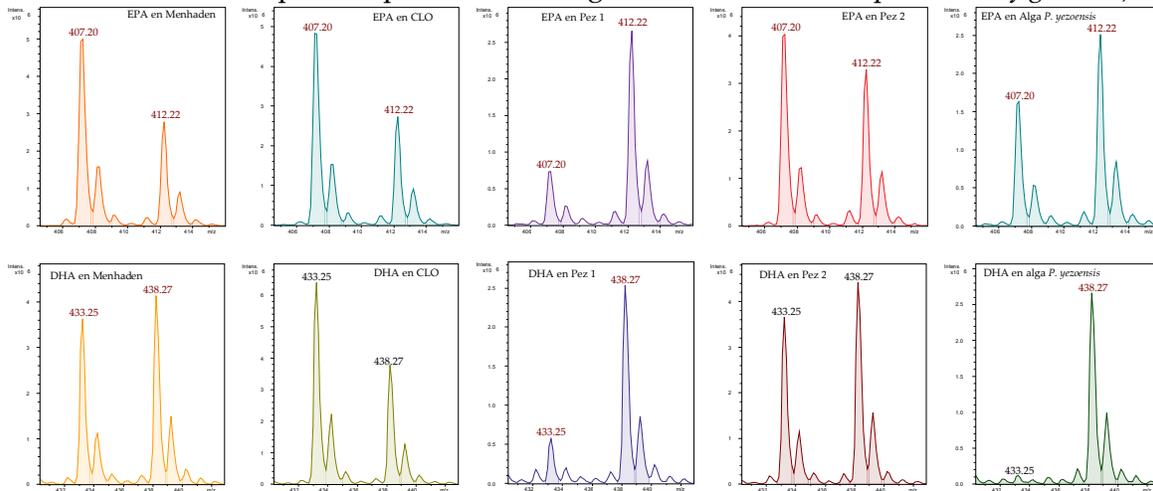


Figura 48. Contenidos de EPA y DHA en muestras derivadas de pescado y en alga *P. yezoensis*, determinadas por la relación de los iones con m/z 407.20 y 433.25 respecto a sus estándares internos, correspondientes a los iones con m/z 412.22 y 438.27.

La cuantificación se llevó a cabo realizando cuatro replicas analíticas en dos días de una técnica, en la *tabla 6* se muestran los resultados cuantitativos de los ácidos encontrados en la dilución final (52.08 ppm) para las distintas muestras como promedio +/- desviación estándar. La preparación de muestra para el alga *P. yezoensis* fue diferente al tratarse de un material sólido; se homogenizaron 10 g de material seco con 10 mL de H₂O y 200 mL de CH₃Cl/MeOH (2:1), el homogenizado se maceró por tres días, luego se filtró a través de un cartucho con zeolita y se secó, obteniendo 79.8 mg de materia seca, el producto resultante se trató con 800 µL de potasa metanólica al 15 % a 37 °C por 30 min, seguido de acidificación con 1.84 mL de HCl_{ac} 1N, posteriormente se extrajo tres veces con 2.4 mL de isooctano, se reunieron las fracciones orgánicas y se secaron obteniendo 2.8 mg de FA, se resuspendieron en ACN/DMF (4:1) llevándolos a una concentración final de 10 mg/mL para realizar el protocolo de derivatización con AEPy-*d*₀ y agregar la mezcla de estándares internos.

<i>Aceite</i>	<i>Chía</i>	<i>Linaza</i>	<i>Aguacate</i>	<i>Ajonjolí</i>	<i>Uva</i>	<i>Oliva 1</i>	<i>Oliva 2</i>	<i>Menhaden</i>	<i>CLO(S)</i>	<i>Pez 1</i>	<i>Pez 2</i>	<i>Alga</i>
<i>FA</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>	<i>C ± SD</i>
14:0	N.D. ²	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.73±0.07	2.16±0.08	0.29±0.01	0.12±0.01	1.16±0.04
16:0	2.68±0.17	2.29±0.10	1.63±0.09	3.77±0.14	3.69±0.16	4.13±0.16	1.79±0.14	3.68±0.14	4.81±0.18	0.57±0.01	3.51±0.15	5.85±0.10
16:1	N.D.	N.D.	0.96±0.05	N.D.	0.18±0.01	N.D.	0.24±0.02	3.83±0.10	2.74±0.09	0.31±0.01	N.D.	N.D.
18:0	1.05±0.04	1.27±0.01	N.D.	1.52±0.04	1.18±0.06	1.21±0.04	N.D.	0.49±0.02	0.68±0.06	0.16±0.01	1.46±0.05	1.34±0.06
18:1	3.91±0.15	9.06±0.15	7.71±0.07	17.04±0.90	11.56±0.37	26.06±1.54	7.77±0.17	2.96±0.11	6.14±0.06	N.D.	11.66±0.52	N.D.
18:2	7.57±0.57	7.52±0.32	2.09±0.09	18.19±1.59	20.85±1.55	1.03±0.06	1.51±0.08	0.58±0.03	0.73±0.03	N.D.	12.65±1.36	N.D.
18:3	17.31±1.05	17.89±0.85	0.21±0.01	0.30±0.01	0.44±0.03	N.D.	N.D.	0.76±0.02	0.72±0.04	N.D.	2.71±0.11	N.D.
18:4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.26±0.10	3.24±0.07	N.D.	1.04±0.09	N.D.
20:4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.41±0.11	N.D.	N.D.	1.91±0.11	N.D.
20:5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17.31±0.78	16.49±1.22	2.02±0.20	11.55±0.56	5.57±0.11
22:5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.86±0.12	N.D.	0.27±0.03	0.59±0.02	N.D.
22:6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.16±0.42	16.3±0.40	1.43±0.07	6.98±0.25	N.D.

¹Concentraciones en ppm en la disolución final (52.08 ppm de ácidos totales); ²No detectados; n = 4, de las cuales 4 analíticas de un mismo experimento técnico
Tabla 6. Resultados de determinación de 12 ácidos grasos (SFAs, MUFAs y PUFAs) en muestras reales, incluyendo 7 aceites vegetales, aceite de menhaden, 3 suplementos dietéticos basados en aceites de pescado (CLO: aceite de hígado de bacalao; Pez 1: aceite de pescado sin especificación y Pez 2: aceite de salmón) y alga *P. yezoensis*.

Luego de la derivatización y la dilución final para la inyección de muestras se alcanzó una concentración de 52.08 ppm de ácidos totales, recalculando cada FA en 100 mg de aceite (considerando los rendimientos en masa tras la saponificación y extracción) se encontraron las siguientes cantidades de EPA y DHA en las muestras de alga y aceites de pez (*tabla 7*):

<i>mg FA / 100 mg aceite</i>	<i>Aceite de menhaden</i>		<i>Suplemento CLO</i>		<i>Suplemento Pez 1</i>		<i>Suplemento Pez 2 (Salmón)</i>		<i>Alga P. yezoensis</i>	
	<i>E^a</i>	<i>D^b</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>R^c</i>
<i>EPA</i>	14.52	10-15	16.52	8.91	1.91	10.82	12.73	30	40.01 ^d	36.5 ± 0.15 ^d
<i>DHA</i>	6.85	8-15	16.34	8.67	1.35	7.21	7.69	20	N.D	0.08 ± 0.02 ^d

^a Encontrado (en el presente trabajo); ^b Declarado (por el vendedor); ^c Reportado (Guan et al., 2024); ^d % en peso seco, respecto al total de FA determinados

Tabla 7. Cantidad de EPA y DHA en mg por cada 100 mg de aceites de suplementos dietéticos de pescado y en alga comestible *P. yezoensis* mediante el enfoque dirigido empleando derivatización codificada por los isotopólogos AEPy *d*₀ ds.

Los rendimientos tras saponificación y extracción a partir de 100 mg de aceite fueron de 43.7 mg de FA para el aceite de menhaden, 52.2 mg de FA para el aceite de hígado de bacalao (suplemento CLO), 49.3 mg de FA para el Pez 1 y 57.4 mg de FA para el aceite de salmón (Pez 2). De este grupo de muestras el perfil más confiable es el de menhaden por venir de un proveedor de sustancias químicas y contar con una ficha más amplia, mientras que los suplementos no están sujetos a procedimientos estrictos para su reporte de perfil nutricional. De ahí, las cantidades encontradas en menhaden y su cercanía con los rangos reportados por el proveedor son un buen indicador. En el caso del suplemento CLO las cantidades encontradas sobreestiman casi al doble las cantidades declaradas por el proveedor (16.52 y 16.34 mg contra 8.91 y 8.67 mg por 100 mg del producto), sin embargo, el suplemento contiene vitaminas A y D y la formulación final no es suficientemente clara. Las cantidades encontradas en el suplemento de Pez 1 se encuentran muy por debajo de lo reportado por el proveedor, en la etiqueta se especifica el contenido de proteínas y azúcares, lo que complica la matriz. En el caso del suplemento de aceite de salmón (Pez 3) las cantidades encontradas son inferiores a las reportadas por el proveedor (12.73 y 7.69 mg contra 30 y 20 mg por 100 g del producto). Independientemente de las inconsistencias entre las cantidades encontradas y las declaradas, los tres suplementos dietéticos presentan una relación EPA/DHA de las cantidades encontradas consistente con la relación en las reportadas. En el caso del alga *P. yezoensis* el contenido de EPA encontrado (en porcentaje en masa respecto al total de FA encontrados) está acorde con lo reportado en otras fuentes (Guan et al., 2024). Los límites de detección instrumentales (LOD) para EPA y DHA fueron 0.08 mg L⁻¹ y 0.05 mg L⁻¹, mientras que sus límites de cuantificación (LOQ) fueron 0.26 mg L⁻¹ y 0.15 mg L⁻¹, respectivamente.

Los aceites vegetales arrojaron resultados en algunos casos subestimados de acuerdo con reportes bibliográficos; en el aceite de chía el ácido linolénico (18:3) fue el mayoritario con 33.24 mg / 100 mg, seguido del linoleico (18:2) y del oleico (18:1) con 14.53 y 7.51 mg / 100 mg, respectivamente (mientras que los valores reportados rondan 52-63.4 mg, 19.8-20.8 y 7.3-8.2 mg /100 mg (Ayerza, 1995)). El aceite de linaza presentó un orden de abundancia de ácidos distinto 18:3 > 18:1 > 18:2, con concentraciones de 34.35, 17.40 y 14.44 mg / 100 mg, respectivamente (algunos valores reportados para los mismos ácidos son 53.21, 18.51 y 17.25 mg / 100 mg, respectivamente (Gruia et al., 2012)). Ambos aceites presentaron concentración de ácido oleico y linoleico dentro o cerca del rango de concentraciones dadas en otros reportes, pero la concentración del ácido linolénico fue significativamente inferior a la reportada. Resulta interesante el hecho de que, a mayor grado de insaturación del ácido en la serie, mayor es la diferencia del valor encontrado respecto al reportado en la literatura, esto invita a sugerir al menos tres potenciales fuentes de subestimación. La primera podría ser que los ácidos poliinsaturados en la muestra se están oxidando con distinto grado de susceptibilidad (en función del grado de insaturación), pues no se adicionó 2,6-di-tert-butilfenol, un antioxidante ampliamente utilizado en el análisis de PUFAs; cómo apoyo a

este argumento, los suplementos de aceite de pescado se extrajeron de las cápsulas al momento del análisis, quedando menos susceptibles a oxidación. Otra potencial fuente de error a considerar consiste en que la subestimación provenga de algún error en el procedimiento y manipulación de la muestra, pues una de las desventajas inherentes al enfoque ICD es la naturaleza multietapa del análisis, incrementando el riesgo de equivocaciones. La tercera posible fuente de subestimación es que se esté trabajando fuera del rango dinámico lineal (pues éste no se determinó), ya que la relación de intensidades 18:3-*d*₀/18:3-*d*₅ en las muestras de chía y linaza está casi 5 veces por encima de la relación de isotopólogos en el punto más alto de la curva de calibración.

De entre los aceites comestibles el de aguacate y el de oliva poseen, junto con el de macadamia (este último no se analizó), la mayor ocurrencia natural de ácido oleico, conteniendo el de macadamia la mayor cantidad 80% seguido por el de oliva 74% y por el de aguacate 65% (Stolp & Kodali, 2022). Si bien para los dos tipos de aceites (aguacate y oliva) el contenido absoluto de ácidos en los resultados cuantitativos parece estar subestimado nuevamente, las proporciones porcentuales respecto al total de ácidos determinados en cada muestra se aproximan muy bien a lo reportado, conteniendo las muestras de aguacate, oliva 1 y oliva 2 la siguiente composición porcentual de ácido oleico: 61.19 % (13.32 mg / 100 mg de aceite), 80.35 % (14.17 mg / 100 mg de aceite) y 68.70 % (45.03 mg / 100 mg de aceite), respectivamente. El aceite de semillas de uva suele contener perfil variable de ácidos de acuerdo con la variedad y origen de la planta, pero frecuentemente posee al linoleico como ácido mayoritario 61-73% seguido del oleico 14-25% y del linolénico 0-0.6% (Carmona-Jiménez et al., 2022), en el presente estudio se encontraron concentraciones de porcentaje en masa de 55.01 % de linoleico, 30.50 % de oleico y 1.16 % de linolénico. Para el caso del aceite de ajonjolí los ácidos mayoritarios fueron el linoleico y el oleico con porcentaje en masa de 44.56 y 41.74 % seguidos por el ácido palmítico con 9.23 % de composición porcentual, mientras que lo reportado en 7 genotipos de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) para los mismos ácidos se presenta en los rangos de 44.34 – 54.85 % para el linoleico, 26.60 – 37.93 % para el oleico y 8.97 – 10.58 % para el palmítico (Morris et al., 2021).

Se calcularon algunos índices de valor nutrimental (*tabla 8*) que describen el potencial efecto de la composición de ácidos grasos de las muestras sobre el riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular en consumidores (J. Chen & Liu, 2020); el valor COX o índice de “oxidabilidad” propuesto por Fatemi y Hammond (Fatemi & Hammond, 1980) describe la susceptibilidad de un aceite o grasa a la oxidación, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$COX = \frac{[18:1 (\%) + 10.3 * 18:2 (\%) + 21.6 * 18:3 (\%)]}{100}$$

El índice de aterogenicidad (AI) propuesto por Ulbricht y Southgate (Ulbricht & Southgate, 1991), el cual está asociado con el riesgo de obstrucción arterial por consumo del aceite o

grasa en cuestión, pese a que se considera al ácido láurico para el cálculo y éste no se encuentra en el material de referencia y por lo tanto no fue determinado, se inspeccionaron los cromatogramas buscando el ion de m/z 305.25 correspondiente al ácido 12:0 sin encontrarlo, por lo que se asume como cero en la siguiente ecuación:

$$AI = \frac{[12:0 (\%) + 4 * 14:0 (\%) + 16:0 (\%)]}{(\sum MUFA + \sum PUFA_{\omega-3} + \sum PUFA_{\omega-6})}$$

El índice de trombogenicidad (TI) muestra la tendencia a coagulación en los vasos sanguíneos (también desarrollado por Ulbricht y Southgate en 1991), descrito en la siguiente ecuación:

$$TI = \frac{[14:0(\%) + 16:0(\%) + 18:0(\%)]}{(\sum MUFA/2) + (\sum PUFA_{\omega-6}/2) + (3 * \sum PUFA_{\omega-3}) + (\sum PUFA_{\omega-3}/PUFA_{\omega-6})}$$

Y finalmente se calculó la relación de ácidos hipo- e hipercolesterolémicos (hH) mediante la formula desarrollada por Santos-Silva y colaboradores (Santos-Silva et al., 2002):

$$hH = \frac{[cis - 18:1(\%) + \sum PUFA]}{[14:0(\%) + 16:0(\%)]}$$

	Chía C ± SD	Linaza C ± SD	Aguacate C ± SD	Ajonjolí C ± SD	Uva C ± SD	Oliva 1 C ± SD	Oliva 2 C ± SD	Menhaden C ± SD	CLO(S) C ± SD	Pez 1 C ± SD	Pez 2 C ± SD	Alga C ± SD
14:0	N.D. ^z	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.68±0.14	4.00±0.15	5.74±0.20	0.22±0.02	8.33±0.29
16:0	7.47±0.47	6.02±0.26	12.94±0.71	9.23±0.34	9.74±0.42	12.73±0.49	15.83±1.24	7.66±0.29	8.90±0.33	11.29±0.20	6.48±0.28	42.02±0.72
16:1	N.D.	N.D.	7.62±0.40	N.D.	0.47±0.03	N.D.	2.12±0.18	7.97±0.21	5.07±0.17	6.14±0.20	N.D.	N.D.
18:0	2.93 ± 0.11	3.34±0.03	N.D.	3.72±0.10	3.11±0.16	3.73±0.12	N.D.	1.02±0.04	1.26±0.11	3.17±0.20	2.69±0.09	9.63±0.43
18:1	10.90±0.42	23.82±0.39	61.19±0.55	41.74±2.20	30.50±0.98	80.36±4.75	68.70±1.50	6.16±0.23	11.37±0.11	N.D.	21.52±0.96	N.D.
18:2**	21.70±1.63	19.77±0.84	16.59±0.71	44.56±3.89	55.01±4.09	3.18±0.18	13.35±0.71	1.21±0.06	1.13±0.05	N.D.	23.35±2.51	N.D.
18:3*	48.24±2.93	47.04±2.23	1.67±0.08	0.73±0.02	1.16±0.08	N.D.	N.D.	1.58±0.04	1.33±0.07	N.D.	5.00±0.20	N.D.
18:4*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.70±0.21	6.00±0.13	N.D.	1.91±0.17	N.D.
20:4**	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.02±0.23	N.D.	N.D.	3.52±0.20	N.D.
20:5*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	36.04±1.62	30.53±2.26	40.0±3.96	21.32±1.03	40.01±0.79
22:5*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.95±0.25	N.D.	5.35±0.59	1.09±0.04	N.D.
22:6*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16.99±0.87	30.18±0.74	28.32±1.39	12.88±0.46	N.D.
SFA	10.40±0.58	20.11±0.29	12.94±0.71	12.95±0.44	12.85±0.58	16.46±0.61	15.83±1.24	14.36±0.47	14.16±0.59	20.20±0.60	9.39±0.39	59.98±1.44
MUFA	10.90±0.42	23.82±0.39	68.81±0.95	41.74±2.20	30.97±1.01	80.36±4.75	70.82±1.68	14.13±0.44	16.44±0.82	6.14±0.20	21.52±0.96	---
PUFA	69.94±4.56	66.81±3.07	18.26±0.79	45.29±3.91	56.17±4.17	3.18±0.18	13.35±0.71	71.49±3.28	69.17±3.38	73.67±	78.46±4.61	40.01±0.79
w-6/3	0.45±0.06	0.42±0.04	9.93±0.90	61.04±7.00	47.42±6.79	---	---	0.09±0.01	0.02±0.01	---	0.64±0.09	---
PUFA/SFA	6.72±	3.32±	1.41±	3.49±	4.37±	0.19±	0.84±	4.98±	4.88±	3.65±	8.35±	0.67±
COX	12.76±0.77	12.43±0.57	2.68±0.96	5.16±0.43	6.22±0.45	9.00±0.07	9.96±0.09	---	---	---	---	---
AI	0.09±	0.07±	0.15±	0.11±	0.11±	0.15±	0.19±	0.35±	0.29±	0.43±	0.07±	1.88±
TI	0.06±	0.06±	0.2±	0.28±	0.28±	0.38±	0.38±	0.06±	0.05±	0.09±	0.06±	0.50±
hH	10.82±	15.05±	6.14±	9.43±	8.90±	6.56±	5.18±	5.82±	6.24±	4.32±	14.92±	0.79±

*ω-3; **ω-6

Tabla 8. Composición proporcional (%) de los ácidos grasos encontrados en las muestras analizadas y algunos índices nutricionales del potencial efecto en la salud cardiovascular de los aceites (se asume contenido total de omega 3 y omega 6 en los ácidos señalados con uno y dos asteriscos, respectivamente, así como el total de 18:1 en configuración cis).

Las muestras de aceite de chía y linaza poseen el valor COX más alto de acuerdo con su composición de ácidos grasos, el alto índice de susceptibilidad a oxidación en estas muestras explica la diferencia de perfiles de composición porcentual encontrados de 18:3 y 18:2 respecto a los reportados para dichos aceites.

Dentro de los índices nutricionales, IA y IT son los más frecuentemente usados en la literatura y los que muestran más clara evidencia. Considerando que los ácidos grasos saturados son pro-arterogénicos y los insaturados son anti-arterogénicos, son deseables valores pequeños de IA, de tal manera que el consumo de alimentos o productos con bajo IA pueden reducir el colesterol y los valores de LDL-c en plasma sanguíneo humano (J. Chen y H. Liu, 2020), si bien algunos autores recomiendan el consumo de alimentos con valor IA de 0.39 con el fin de conseguir valores cardioprotectores de referencia del AIP (índice arterogénico del plasma) (Bei Mariana, 2019), ninguna organización oficial de salud ha provisto aún valores recomendables de estos índices, y además se consideran en constante cambio de acuerdo a nuevas investigaciones sobre efecto de cada ácido en el desarrollo/prevenición de enfermedades cardiovasculares. Algunos rangos de valores IA reportados son 0.03-3.58 para algas, 0.084-0.55 para cultivos, 0.21-1.41 para peces y 0.16-1.32 para carnes. Los rangos de valores reportados para TI son 0.14-0.56, 0.14-0.87, 0.29-1.69 y 0.39-5.04 para cultivos, peces, carne y productos lácteos, respectivamente. Finalmente, algunos valores del índice hH reportados para aceite de *Camelina sativa* prensado en frío están en el rango de 11.7-14.7 (K. Ratusz, 2018).

IV.9 Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_3 , d_6 y d_9 del agente derivatizante AMPP

Se diseñó la ruta de síntesis multietapa para obtener los cuatro isotopólogos del AMPP, de los cuales tres son nuevos en la bibliografía (d_3 , d_6 y d_9), en el esquema de la *figura 49* se muestra la estrategia retrosintética. Se propuso partir de dos sintones estructurales, el primero consistió en los cuatro isotopólogos de piridina previamente descritos (d_0 , d_2 , d_3 y d_5), los cuales se convirtieron en sus respectivas sales de Zincke (paso 1). El segundo sintón fue el 1-bromo-4-nitrobenceno y su isotopólogo d_4 enriquecido en el laboratorio (paso 2), para obtener posteriormente el producto de cianuración de ambos isotopólogos (paso 3), en el cuarto paso se llevaría a cabo la reducción/protección tanto del 4-nitrobenzocitrilo- d_0 como del 4-nitrobenzocitrilo- d_4 dando lugar a los isotopólogos d_0 y d_4 de la 4-aminobencilamina protegida con el grupo Boc sobre la amina primaria. Finalmente, para el último paso, se propone la generación de los isotopólogos d_0 , d_3 , d_6 y d_9 del AMPP mediante cuatro reacciones ANRORC (adición nucleofílica / apertura de anillo / cierre de anillo) combinando estratégicamente pares de isotopólogos de la sal de Zincke y el tert-butil-4-aminobencilcarbamato (paso 5) como se describe a continuación: d_0+d_0 , d_3+d_0 , d_2+d_4 y d_5+d_4 , respectivamente.

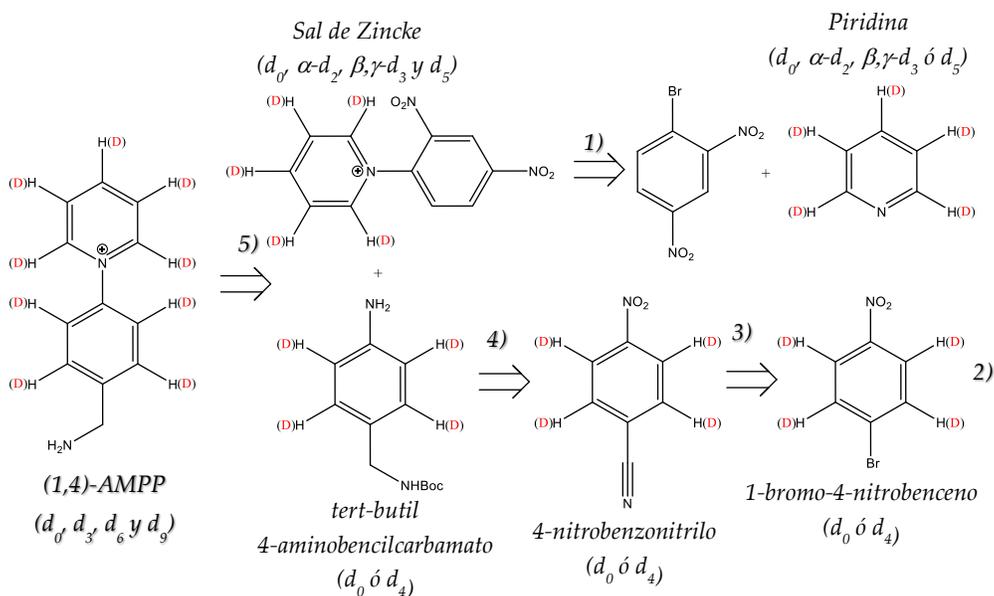


Figura 49. Análisis retrosintético de las rutas para la obtención de los 4 isotopólogos de AMPP. Adaptando y fusionando protocolos reportados para los isotopólogos ligeros en las distintas etapas: 1) (Chukanov et al., 2019). 2) (Tang et al., 2023). 3) (Ushkov & Grushin, 2011). 4) (Khurana & Kukreja, 2002).

A continuación, se describen los alcances logrados durante el desarrollo de los pasos 1-5 para la síntesis de este derivatizante de cuatro canales, así como los desafíos encontrados a lo largo del desarrollo experimental.

IV.9.1 Síntesis de los isotopólogos d_0 , d_2 , d_3 y d_5 de la sal de Zincke

Los isotopólogos de piridina adquiridos comercialmente (d_0 y d_5) así como los etiquetados en el laboratorio por intercambio de isótopos de hidrógeno en condiciones básicas (d_2 y d_3 , ver capítulo IV.1.1) se hicieron reaccionar independientemente frente al 1-bromo-2,4-dinitrobenzene para formar las respectivas sales de Zincke (Chukanov et al., 2019), en la *figura 50* se ejemplifica la reacción para el isotopólogo ligero y se enumeran sus hidrógenos.

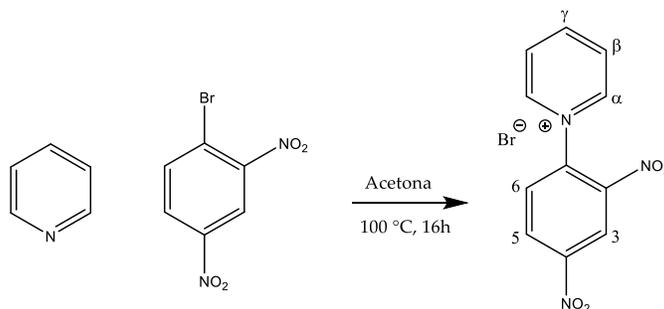


Figura 50. Reacción para la formación de la sal de Zincke- d_0 .

Los productos obtenidos como polvos amarillo pálido tras decantación se confirmaron mediante análisis por HRMS y NMR (*figura 51*) observando claramente los desplazamientos de m/z esperados, así como la ausencia de señales y cambios de multiplicidad en señales ^1H .

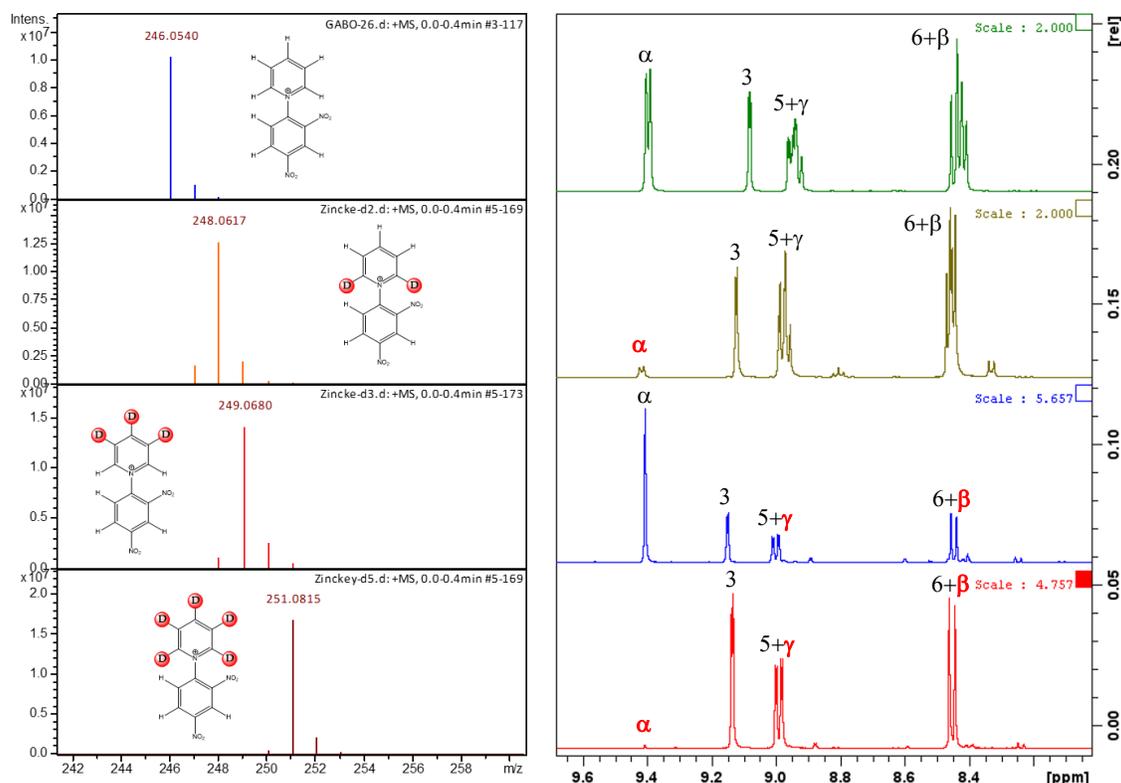


Figura 51. Espectros HRMS de los isotopólogos d_0 (a), d_2 (b), d_3 (c) y d_5 (d) de la sal de Zincke (izquierda), y sus respectivos espectros de ^1H NMR (derecha) adquiridos en DMSO con capilar DMSO- d_6 .

IV.9.2 Deuteración del 1-bromo-4-nitrobenzato catalizada por $\text{Ag}_2\text{CO}_3(\text{PPh}_3)_2$

La deuteración del 1-bromo-4-nitrobenzato se realizó exitosamente tras tres intentos siguiendo el procedimiento reportado por Tang y colaboradores (Tang et al., 2023), utilizando K_2CO_3 como base, Ag_2CO_3 y PPh_3 como pre-catalizador, D_2O como agente deuterante y éter metil-terbutílico como co-solvente (*figura 52*). El carbonato de plata fue preparado en el laboratorio de acuerdo con un protocolo reportado (Burley et al., 2013), durante los primeros intentos se protegió de la luz después de la filtración, pero al tratarse de un reactivo altamente fotosensible el rendimiento de incorporación de deuterio fue parcial, a raíz de lo observado se optó por trabajar esta reacción completamente a oscuras logrando con ello la incorporación de cuatro deuterios con rendimiento cercano al 100%.

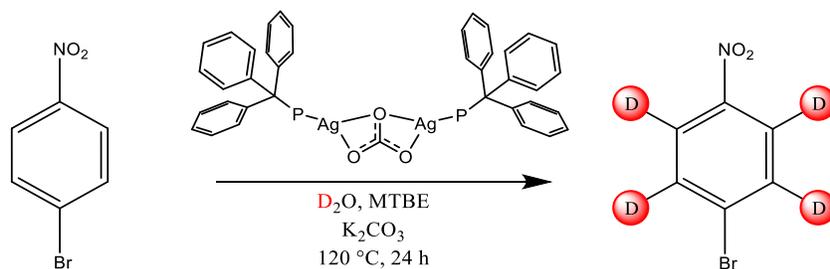


Figura 52. Reacción de deuteración del 1-bromo-4-nitrobenzono. Se emplearon 202 mg de sustrato, 1eq de K_2CO_3 , 1 mL de D_2O , 200 μL de MTBE y el catalizador se generó in situ a partir de 20 % mol de Ag_2CO_3 y 60 % mol de PPh_3 .

La caracterización del producto deuterado se realizó utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón 1H (figura 53) y deuterio 2H (figura 54). Verificando la transformación completa tanto por los cambios en la multiplicidad de las señales en el espectro de protón, así como por la aparición de señales de deuterio con el desplazamiento químico equivalente a los hidrógenos de su análogo de abundancia isotópica natural.

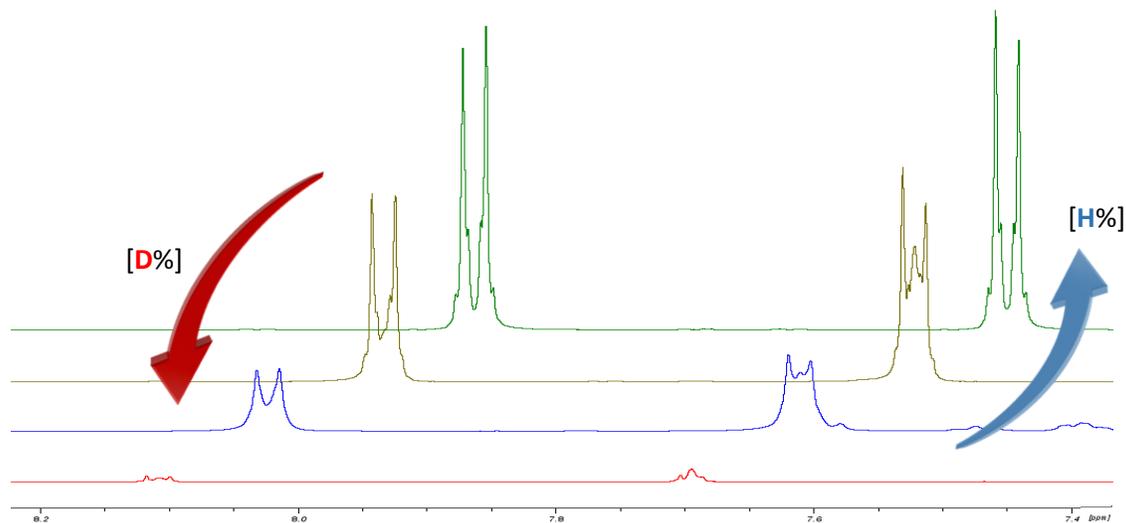


Figura 53. Espectros de 1H NMR del sustrato (1-bromo-4-nitrobenzono) antes de la deuteración (verde), luego de los primeros dos intentos (naranja y azul) y después de realizar la reacción en la oscuridad (rojo), se observa la disminución significativa de la señal, así como el cambio de doblete a singulete por pérdida del acoplamiento H-H a tres enlaces.

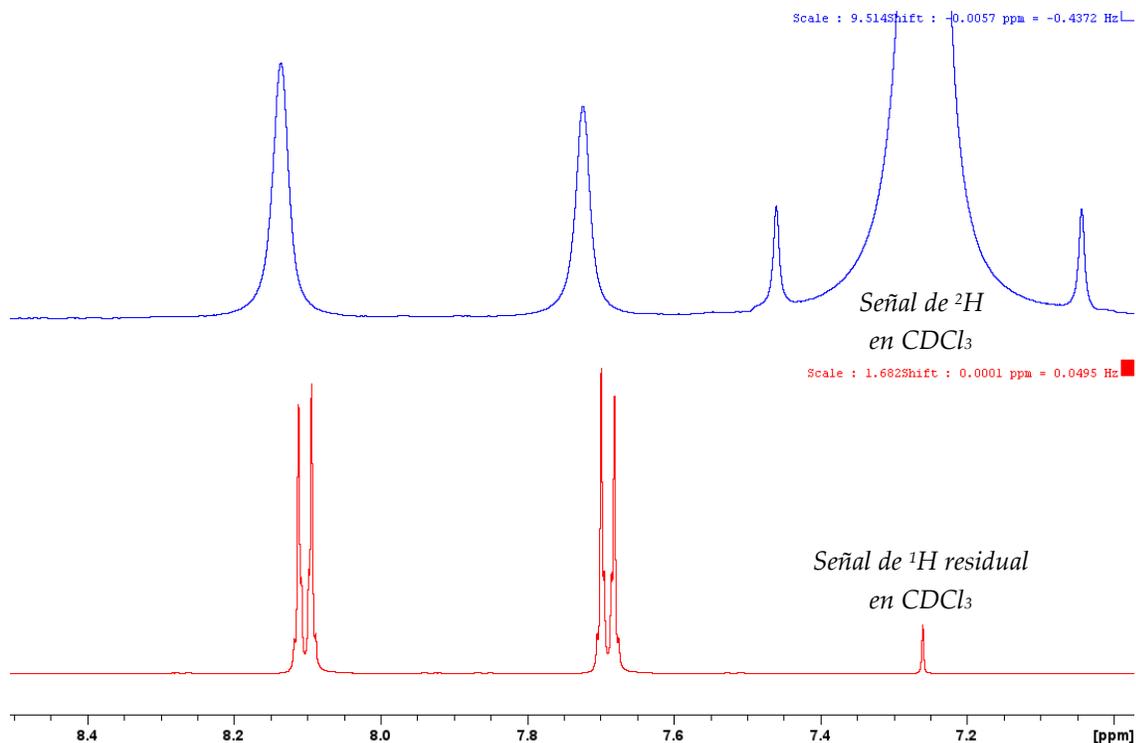


Figura 54. Espectros de resonancia magnético nuclear de deuterio ^2H -NMR del 1-bromo-4-nitrobenzene- d_4 (azul), se observan señales con desplazamiento 8.14 y 7.73 ppm, consistente con los desplazamientos de las señales de hidrógeno en ^1H -NMR del sustrato con abundancia isotópica natural (rojo), ajustando la señal residual de hidrógeno del solvente con la señal de su respectivo deuterio, ambos obtenidos en CDCl_3 .

IV.9.3 Cianuración de los isotopólogos d_0 y d_4 del 1-bromo-4-nitrobenzene

La reacción de acoplamiento C-C entre el 1-bromo-4-nitrobenzene y el cianuro se realizó combinando dos metodologías (Anderson et al., 1998; Ushkov & Grushin, 2011). El grupo de Anderson reportó la cianuración de una amplia gama de haluros de arilo y triflatos vía catálisis cooperativa entre catalizadores de paladio cero y especies de zinc o cobre, entre los sustratos evaluados reportó la cianuración de sistemas derivados de yodo-benene sustituidos con distintos grupos en la posición 4. Entre los sustituyentes evaluados se encontraron los grupos metoxilo, acetilo y nitro, los primeros dos mostraron los mayores rendimientos cuando se empleó 5 % mol de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ adicionando de 10 % mol CuI , sin embargo, con el sustituyente nitrado el mejor rendimiento fue en ausencia de yoduro de cobre. Cabe mencionar que el solvente empleado por Anderson y col. fue únicamente THF; trece años más tarde el grupo de Ushkov y Grushin evaluaron sistemáticamente las condiciones de cianuración, pues ha sido reconocido por varios autores lo desafiante de este acoplamiento cruzado, identificándolo como uno de los menos reproducibles debido a la desactivación del catalizador por el cianuro en el medio. Las aportaciones más significativas en su publicación son tres: (i) la utilización de fosfinas voluminosas como la $\text{P}(\text{tBu})_3$, (2) la composición de solventes, empleando THF/ACN (relación 1:4) con el fin de evitar altas

cantidades de cianuro disuelto y prevenir el envenenamiento del catalizador, y (3) la adición sub-estequiométrica de Zn metálico para regenerar el catalizador potencialmente envenenado. En el presente trabajo se empleó la tetrakis trifenilfosfino paladio cero $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, en consonancia con Anderson, pero bajo las condiciones descritas por Ushkov y Grushin (figura 55), el catalizador se preparó en el laboratorio de acuerdo con lo reportado en la bibliografía (Koudehi & Zibaseresht, 2020).

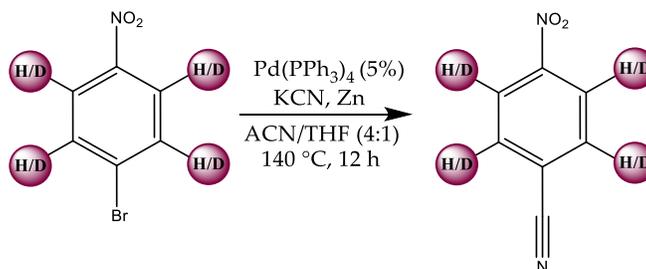


Figura 55. Reacción de cianuración del 1-bromo-4-nitrobenceno catalizada por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.

El producto de cianuración del compuesto con distribución isotópica natural se caracterizó por resonancia magnética nuclear de protón, observando claros cambios en los desplazamientos químicos del sustrato respecto al producto con conversión del 97%. Así, para el sustrato (1-bromo-4-nitrobenceno) se observaron dos dobletes en 7.86 y 8.16 ppm y en 8.19 y 8.35 para el producto (figura 56).

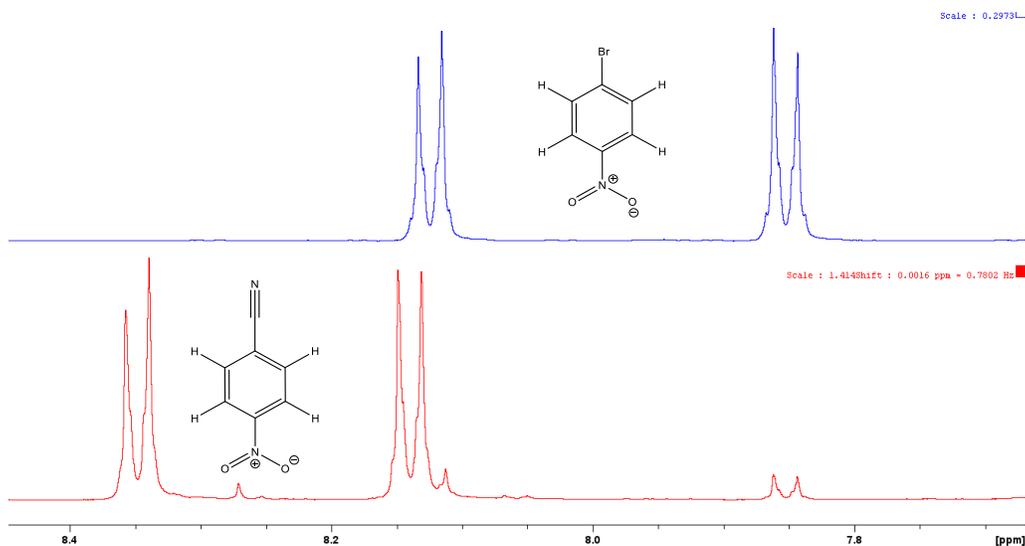


Figura 56. Comparación de espectros de resonancia magnética nuclear ^1H NMR del sustrato 1-bromo-4-nitrobenceno (azul) y del producto de cianuración 4-nitrobenzonitrilo (rojo), obtenidos en CHCl_3 con capilar $\text{DMSO}-d_6$.

La cianuración del isotópulo d_4 del 1-bromo-4-nitrobenceno continúa pendiente.

IV.9.4 Reducción/Protección de los isotopólogos d_0 y d_4 del 1-nitro-4-benzonitrilo

La reducción/protección *one-pot* del isotopólogo ligero del 4-nitrobenzonitrilo se realizó con el catalizador “P-2 Níquel”, el cual se preparó *in-situ* mezclando NiCl_2 con NaBH_4 en EtOH seco y en presencia de DIBOC (Di-*tert*-butil dicarbonato) (Khurana & Kukreja, 2002) (figura 57), sin embargo, el producto obtenido consistió en el di carbamato (figura 58), es decir, se protegieron indiferentemente la amina primaria y la amina aromática tras la reducción de ambos grupos, nitrilo y nitro, lo que implicó adicionar dos pasos adicionales al protocolo sintético, uno de desprotección y otro de protección selectiva para obtener el monocarbamato sobre la amina primaria.

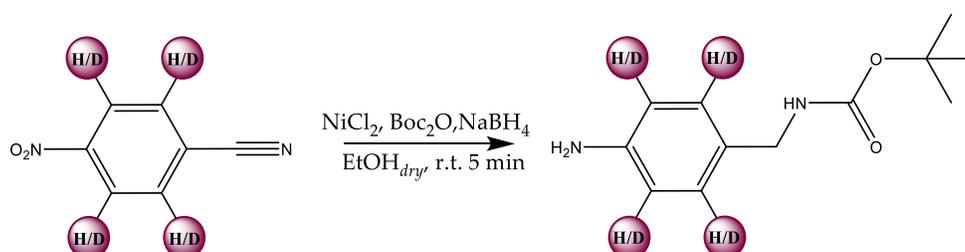


Figura 57. Ecuación de reacción esperada de reducción/protección y producto esperado 4-(N-Boc)aminobenzilamina.

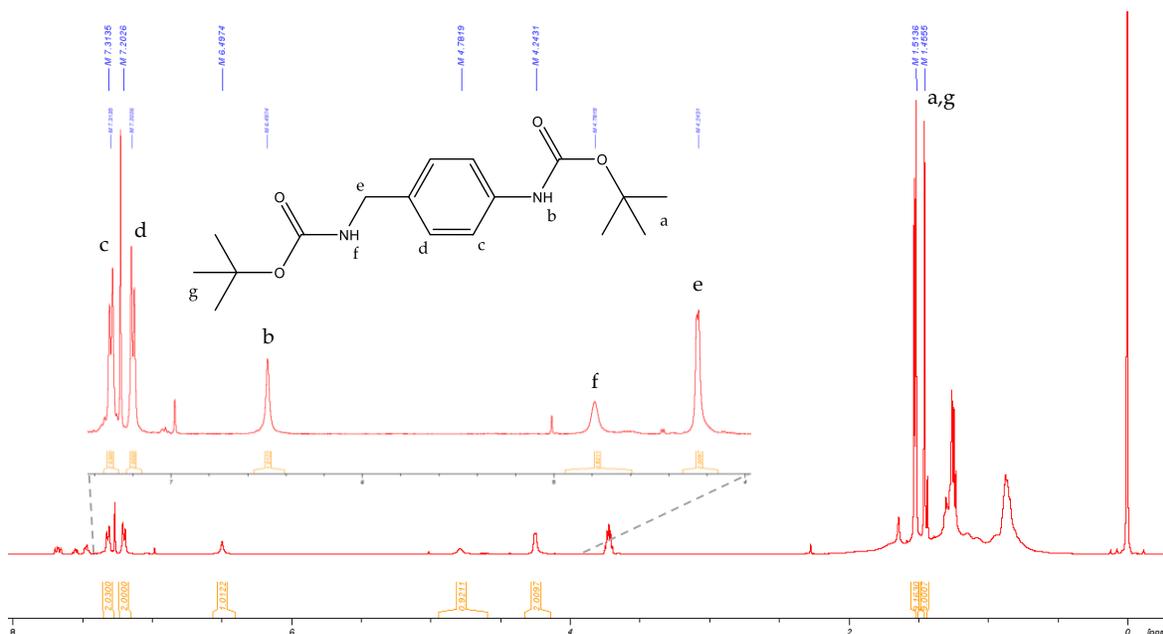


Figura 58. Espectro del producto dicarbamato obtenido por reducción del 1-nitro-4-benzonitrilo.

Parece lógico pensar que la obtención del producto 4-aminobenzilamina sin grupos protectores simplificaría el protocolo y ahorraría las etapas de desprotección y monoprotección en la síntesis, sin embargo, la ausencia del grupo protector genera un producto lateral dimérico, común en la reducción de nitrilos (figura 59), además, la

formación de complejos de Ni complica la purificación del producto deseado, en ese sentido la obtención del producto di protegido implica una etapa adicional pero al mismo tiempo dirige la síntesis al producto deseado y facilita el procesamiento del compuesto.

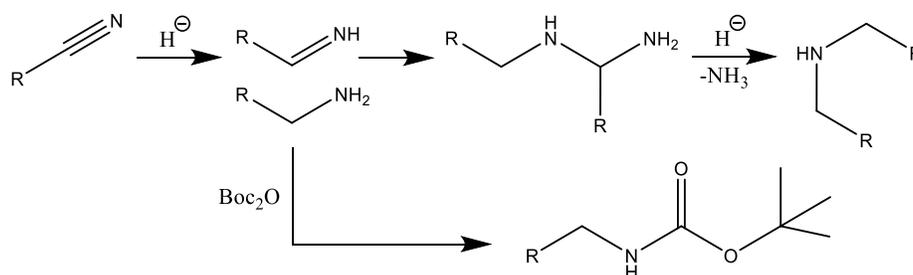


Figura 59. Etapas en la reducción de nitrilos vía hidruros, arriba se representa la formación de un subproducto dimérico por eliminación de amoníaco, en la parte de abajo se puede apreciar cómo la presencia del grupo protector Boc₂O “secuestra” la amina a medida que se forma evitando su reacción con la imina intermedia que la derivaría en el subproducto indeseado.

Actualmente éste es el avance que se tiene sobre el desarrollo de los cuatro isotopólogos del derivatizante AMPP, las etapas pendientes para concretarlo son las siguientes:

1. Cianuración del 1-bromo-4-nitrobenzeno-*d*₄
2. Reducción/protección del 1-nitro-4-benzonitrilo-*d*₄
3. Desprotección de los isotopólogos *d*₀ y *d*₄ del dicarbamato derivado del punto 2.
4. Monoprotección en la amina primaria de los isotopólogos *d*₀ y *d*₄ de la 4-aminobencilamina (obtenidas del punto 3).
5. Obtención de los 4 isotopólogos de AMPP vía mecanismo ANRORC (*figura 60*).

Los puntos 1 y 2 consisten en reproducir sobre el isotopólogo *d*₄ lo realizado con su análogo ligero en los apartados IV.9.3 y IV.9.4, mientras que los puntos 3 y 4 son procedimientos reportados, pese a que bajo las condiciones de reducción con el catalizador P-2 Níquel ocurre la protección tanto de la amina primaria como de la aromática, existen reportes para la monoprotección en la amina primaria de la 4-aminobencilamina utilizando DIBOC bajo condiciones sencillas (Jarre et al., 2014; Scheiner et al., 2022), y la desprotección es una hidrólisis típica de carbamatos empleando ácido trifluoroacético en DCM, por lo que en este punto, parece viable la culminación en un futuro de la síntesis multietapa planteada.

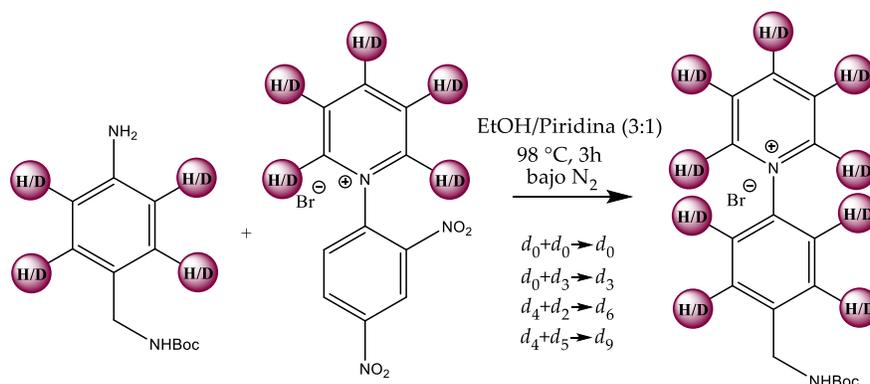


Figura 60. Obtención de los 4 isotopólogos de AMPP vía mecanismo ANRORC.

IV.10. Síntesis de los isómeros β y γ del derivatizante AMMP

Para la síntesis del derivatizante AMMP y desarrollo del derivatizante 3 planteado al inicio del texto, se partió de los aldehídos de piridina en las tres posiciones, 2, 3 ó 4, convirtiéndolos en oximas (anexo 7) y posteriormente reduciéndolas a sus respectivas aminas (figura 61) de acuerdo con lo reportado por Cai y colaboradores (Y. M. Cai et al., 2019).

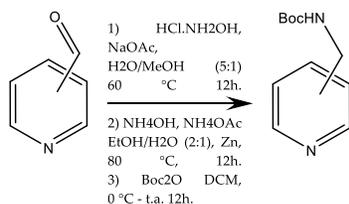


Figura 61. Esquema general para la síntesis de las picolil-aminas.

Las β y γ picolilaminas se caracterizaron por ^1H NMR (fig. 62), se reservaron para su posterior protección con diboc y la subsecuente cuaternización del heteroátomo con yoduro de metilo.

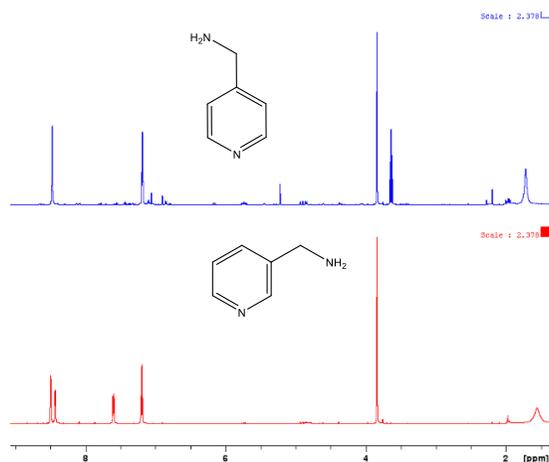


Figura 62. γ -picolilamina (Azul), β -picolilamina (Rojo).

Los demás pasos de reacción quedaron pendientes de realizar.

V. CONCLUSIONES

Capítulo V. Conclusiones

El presente trabajo se enfocó en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación (en análisis cuantitativo dirigido y perfilado no dirigido), de derivatizantes de inversión de carga codificados por deuterio, los cuales se dirigieron hacia analitos con funcionalidad de ácido carboxílico, particularmente ácidos grasos extraídos de aceites vegetales comestibles y de suplementos dietéticos basados en aceites de pescados.

Inicialmente, se diseñaron las rutas sintéticas de tres CS-ICD con base en el estado del arte de derivatizantes deuterados dirigidos hacia ácidos grasos y estrategias de etiquetado con deuterio, el desarrollo experimental de ambas partes, sintética y analítica, permitió elaborar una serie de conclusiones para los resultados con cada uno de los derivatizante:

Derivatizante 1. AEPy

Se obtuvo la piridina- d_3 con alto grado de enriquecimiento a partir de piridina de abundancia isotópica natural empleando el protocolo descrito por los grupos de Y. Li y Kopf. Liu. Además, se adaptó dicho protocolo sintético para obtener la piridina- d_2 por intercambio inverso (D/H) a partir de piridina- d_5 .

Fueron sintetizados tres isotopólogos de AEPy: de abundancia natural a partir de piridina- d_0 , trideuterado a partir de piridina- d_3 etiquetada en el laboratorio y pentadeuterado a partir de piridina- d_5 comercial, se realizó su caracterización por $^1\text{H-NMR}$ y HRMS comprobando la estabilidad del marcaje en términos de posición y grado de enriquecimiento de los deuterios tras la síntesis. Además, por comparación de sus respectivos patrones isotópicos, se verificó la viabilidad de utilizar cualquiera de los dos, AEPy- d_3 o AEPy- d_5 como estándar interno al no presentar solapamiento espectral con el isotopólogo de abundancia natural, AEPy- d_0 .

Las condiciones de derivatización se seleccionaron de acuerdo con los resultados de dos experimentos: 1) El agente de acoplamiento y la temperatura de reacción se seleccionaron a partir del mismo experimento, en el que se compararon las eficacias relativas de derivatización entre el reactivo de Mukaiyama (CMPI) y la carbodiimida EDC a dos temperaturas, 30 y 40 °C sobre SFA (C6, C7, C9, C11, C12 Y C18). 2) La composición de solventes del derivatizante fue definida luego de evaluar las siguientes mezclas portadoras de AEPy- d_0 , a) Et₃N 0.1N en ACN, b) ACN/DMF (4:1), c) H₂O 100%, d) ACN/H₂O (1:1), e) ACN/H₂O (80:20), f) MeOH 100% y g) MeOH/H₂O (1:1). Las condiciones finales seleccionadas para favorecer la formación del producto de reacción consistieron en el uso de EDC como agente de acoplamiento, temperatura de 40 °C y composición de solventes Et₃N 0.1N en ACN para el derivatizante AEPy.

Experimentos independientes de variación de voltaje en el capilar permitieron registrar secuencialmente por HRMS con infusión directa los iones correspondientes a ácidos grasos

del material de referencia certificado, derivatizados por separado con cada uno de los tres isotopólogos de AEPy, concluyendo que el voltaje en el capilar de 3100 V genera las mejores intensidades de señal y las relaciones S/N más altas.

A través de experimentos por HPLC-ESI(+)-ITMS se compararon los factores de respuesta de mezclas 1:1 de ácidos grasos del material de referencia derivatizados con cada par de isotopólogos AEPy- d_0 |AEPy- d_3 y AEPy- d_0 |AEPy- d_5 graficando la intensidad respecto al inverso del factor de dilución, para cada ácido derivatizado con cada par de isotopólogos se encontraron diferencias de la pendiente menores al 5%, confirmando nuevamente la viabilidad de los isotopólogos pesados de AEPy para su uso como estándares internos.

Se realizaron pruebas de derivatización independientes con AEPy- d_0 y AEPy- d_5 sobre ácidos grasos extraídos de cinco aceites vegetales, los perfiles de ácidos grasos de 18 carbonos con 0-3 insaturaciones, fue consistente para cada una de las muestra en cada canal, permitiendo asumir que la reacción transcurre de uniformemente entre ambos isotopólogos sobre muestras complejas.

El análisis no dirigido aplicado con ambos pares de isotopólogos de AEPy d_0 | d_3 y d_0 | d_5 sobre FA extraídos de aceite de menhaden resultó en la anotación de once FA reportados por el proveedor y ocho ácidos adicionales no descritos por el proveedor, entre los cuales se encontró un ácido de cadena muy larga y altamente insaturado, específicamente 28:8, dicho ácido se confirmó por la observación de los clústeres isotópicos conferidos por cada par de isotopólogos al mismo tiempo de retención en corridas cromatográficas independientes para cada par.

Dentro del análisis dirigido, el uso de FA presentes en el material de referencia certificado facilitó la generación de estándares internos tipo ILIS vía ICD con AEPy- d_5 , y a su vez el canal ligero (AEPy- d_0) se utilizó para los calibrantes y para derivatizar los FA de las muestras a determinar. Se construyeron curvas de calibración con 7 niveles de concentración para 15 de los ácidos grasos contenidos en el MRC, posteriormente, se analizaron 11 muestras, de las cuales 7 fueron aceites vegetales comestibles, tres suplementos dietéticos basados en aceites de pescados y un alga comestible *P. yezoensis*, encontrado valores porcentuales de los FA en los aceites vegetales y para el alga congruentes con lo reportado, mientras que en el caso de los suplementos de aceites de pescado existieron variaciones respecto a lo declarado en el perfil nutricional por los proveedores. Aunque los datos cuantitativos son prometedores, hace falta afinar y validar el método para futuras aplicaciones con mayor rigor.

Finalmente, con los datos obtenidos de los perfiles de ácidos para cada muestra, se calcularon algunos descriptores como el índice de oxidabilidad, el de arterogenicidad, el trombogénico y la relación hH (relación de ácidos hipo-hipercolesterolémicos).

Derivatizante 2. AMPP

Además del diseño de la ruta sintética para la obtención de los cuatro canales, se avanzó en la síntesis de algunos sintones deuterados, tales como las sales de Zincke ($-d_0$, $-d_2$, $-d_3$ y $-d_5$) a partir de los isotopólogos de piridina obtenidos tanto comercialmente como por intercambio H/D con catálisis básica, adicionalmente se sintetizó el 1-bromo-4-nitrobenceno- $-d_4$, el cual se etiquetó utilizando un catalizador de Ag(I).

Adicionalmente, se realizaron las reacciones de cianuración del 1-bromo-4-nitrobenceno, y reducción/protección del 4-nitrobenzotrilo (únicamente sobre los isotopólogos ligeros). Este último, generó el producto de reducción de ambos grupos obteniéndolos como sus respectivos carbamatos. La síntesis se llevó únicamente hasta este punto, faltando concretar las siguientes etapas sintéticas y la aplicación en análisis.

Derivatizante 3. Combinación AEPy-AMMP

En la síntesis de AMMP se prepararon las picolilaminas libres de dos de sus isómeros (β y γ), partiendo de sus respectivos aldehídos, sin embargo, quedaron pendientes las etapas de protección de la amina y cuaternización del nitrógeno en el fragmento aromático.

Cómo perspectivas de este proyecto de tesis, se plantea en un futuro afinar el método para análisis dirigido con el sistema AEPy- $-d_0$ |AEPy- $-d_5$ y compararlo estadísticamente con el sistema AEPy- $-d_0$ |AEPy- $-d_3$ con el fin de comprobar si la alternativa de derivatizante etiquetado en nuestro laboratorio, efectivamente ofrece el mismo desempeño que el construido con piridina- $-d_5$ comercial.

En el caso de los derivatizantes 2 y 3 (AMPP y AEPy-AMMP, respectivamente) los protocolos sintéticos muestran resultados alentadores sobre la viabilidad de conseguir las moléculas esperadas por las vías planteadas, cómo perspectiva se propone concluir la síntesis, y posteriormente determinar las condiciones para el mejor desempeño en análisis cuantitativo y perfilamiento PUFAs a un nivel estructural profundo.

ANEXOS

Anexo 1. derivatización de ácidos grasos de cadena corta

En ácidos de cadena corta se evaluaron los pares de isotópicos d_0/d_3 en reacciones por separado, se analizaron por ESI-QTOF-MS mediante infusión directa tanto por separado así como sus mezclas 1:1, el primer caso mostró intensidades inferiores para los derivatizados con AEPy- d_3 , pues se utilizó una solución impura con concentración subestimada, sin embargo, la consistencia del patrón isotópico para cada ácido derivatizado respecto al grado de enriquecimiento del derivatizante permitió inferir la estabilidad de los deuterios incorporados durante la reacción de derivatización y durante el análisis en mezclas de varios ácidos saturados. En el segundo caso se ajustaron los niveles de dilución para hacer coincidir las concentraciones.

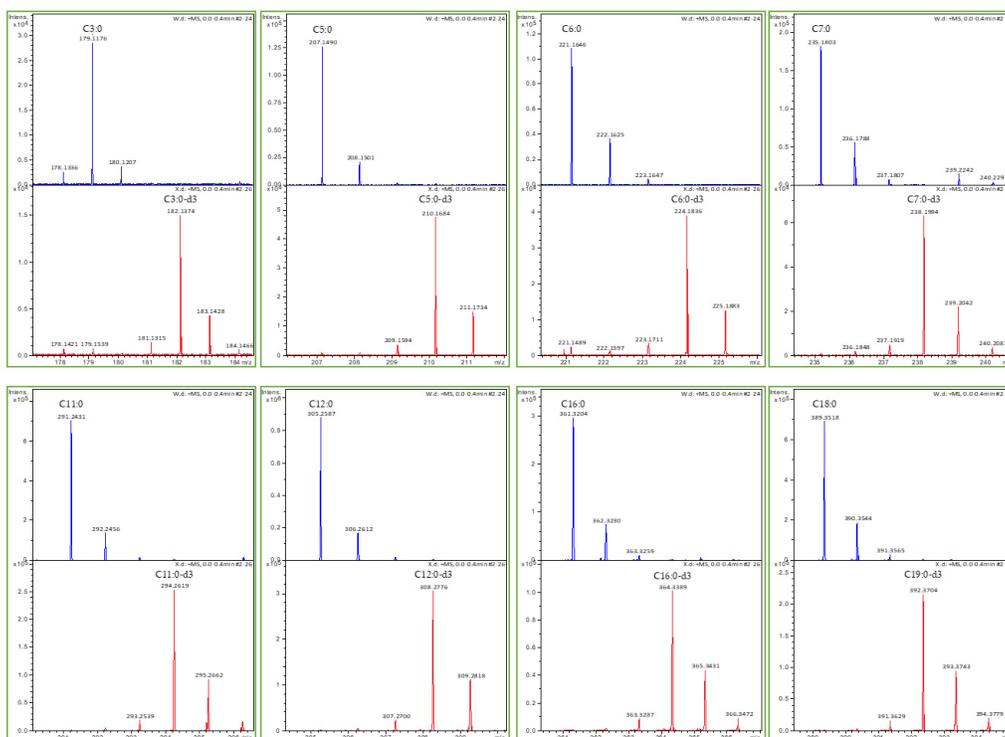


Figura A1. Comparación de patrones isotópicos de ocho ácidos grasos saturados, de cadena corta y media, derivatizados con el par de isotópicos de AEPy- d_0 (Azul) y AEPy- d_3 (Rojo).

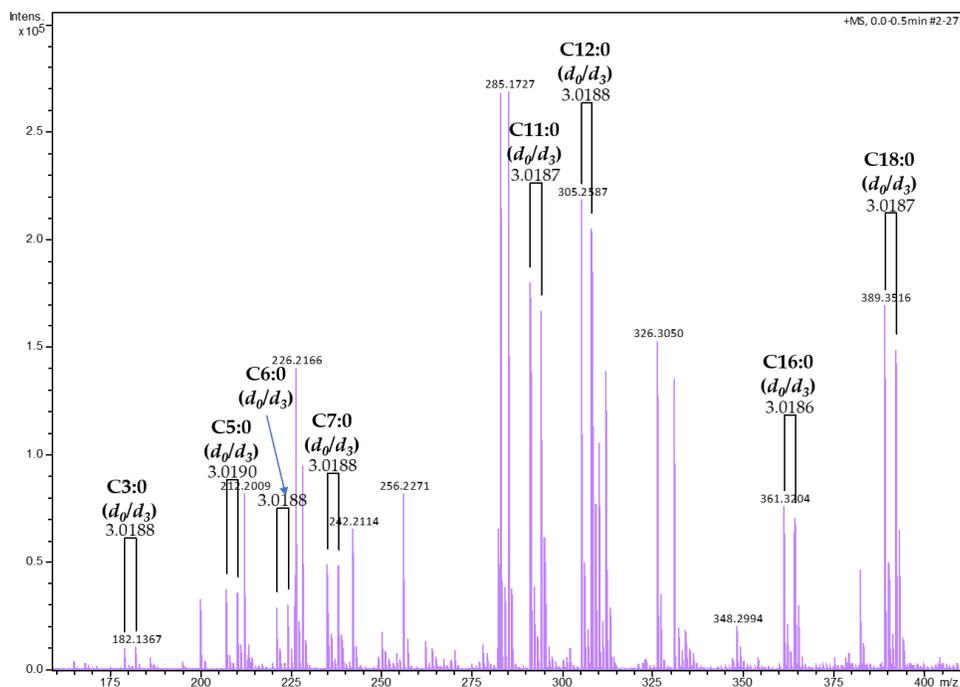


Figura A2. Espectro de masas adquirido por infusión directa en sistema ESI-QTOF-MS de la mezcla 1:1 de soluciones 50 mM derivatizados con el par de isotopólogos AEPy-d₀/AEPy-d₃, y diluidos 100 veces.

Anexo 2. Blancos de reacción de derivatización de material de referencia CLO

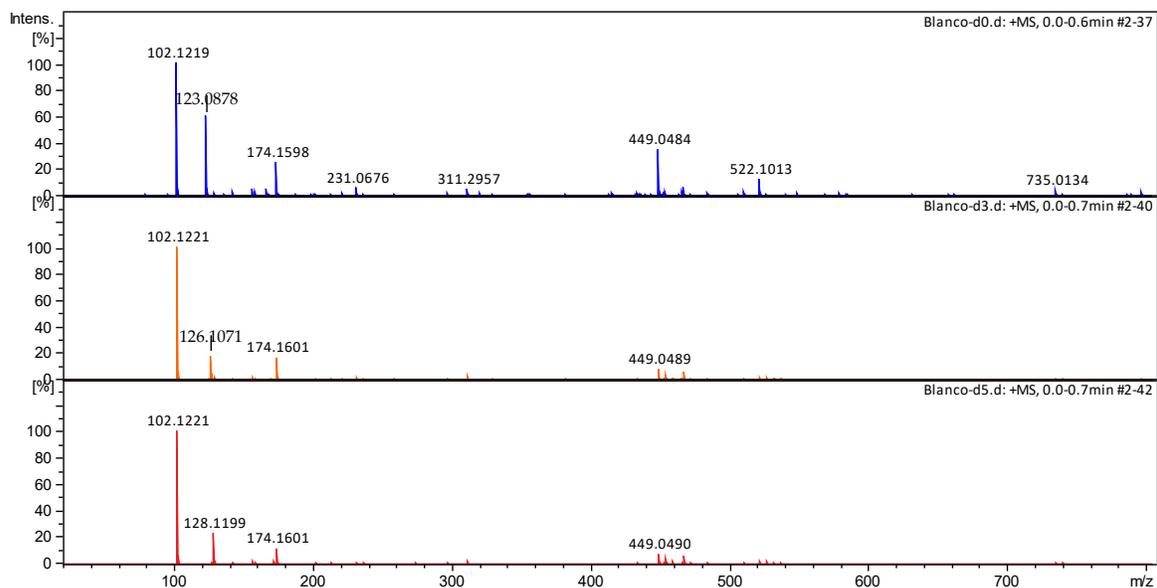


Figura A3. Blancos de la reacción de derivatización del material de referencia para cada isotopólogo de AEPy.

Anexo 3. Espectro ^1H NMR del aceite de Menhaden y de sus ácidos grasos libres

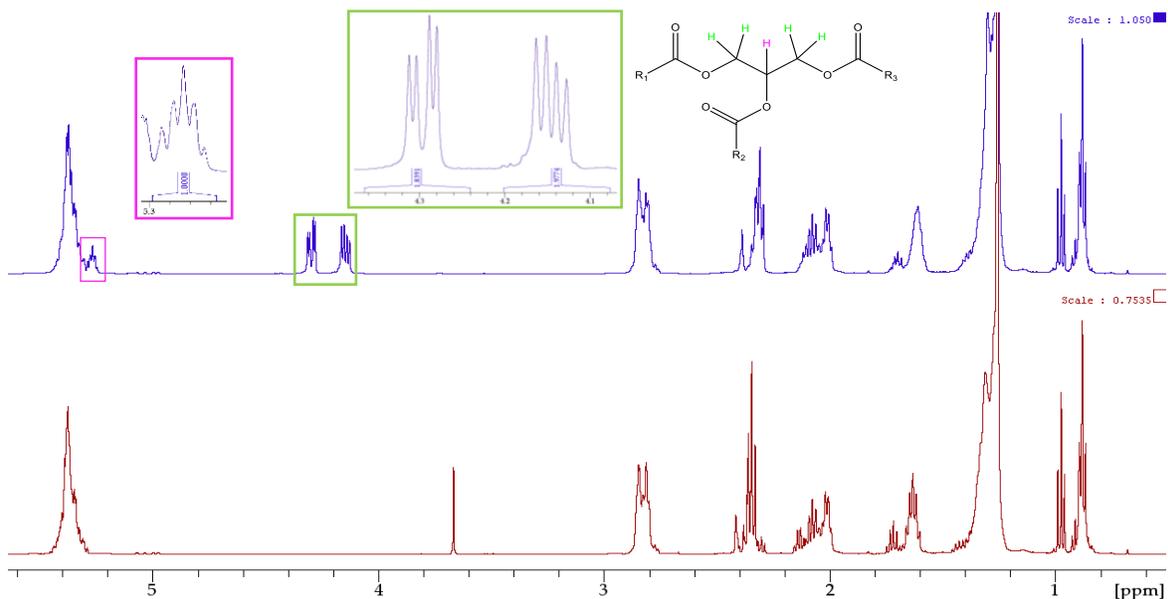


Figura A4. Espectros de ^1H NMR antes (azul) y después (guinda) de la extracción de ácidos grasos del aceite de Menhaden, arriba se ven las señales de los metilenos y del metino de los triglicéridos.

Anexo 4. Análisis no dirigido de aceite menhaden con pares de isotopólogos de AEPy

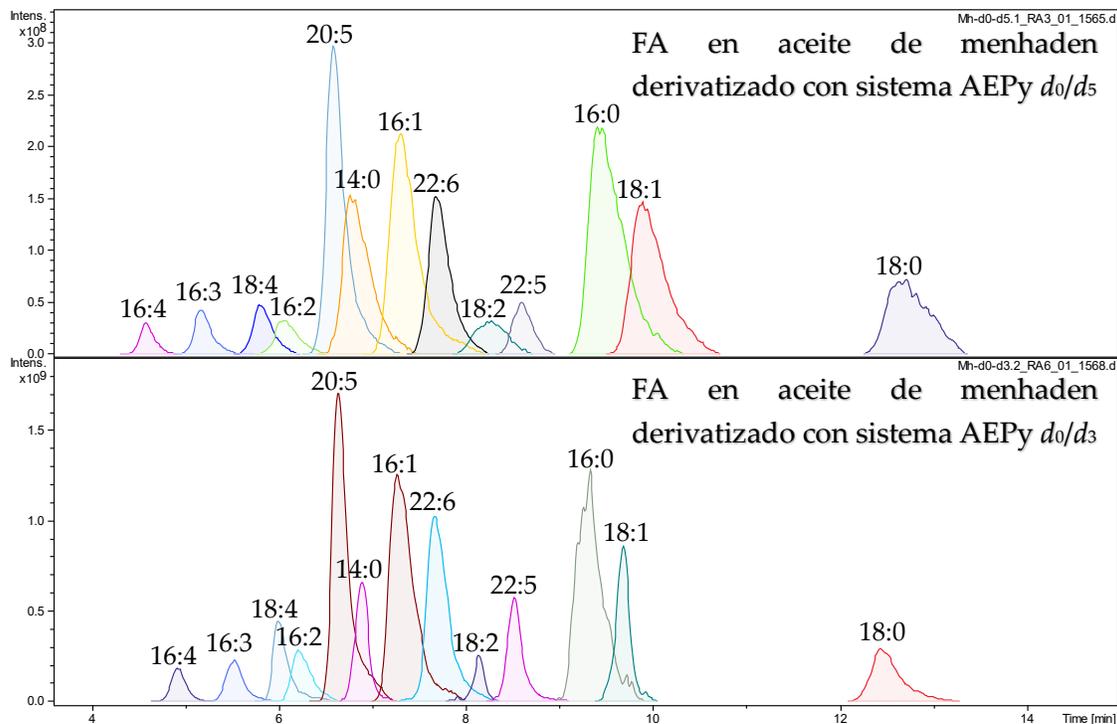


Figura A5. Cromatogramas de los ácidos grasos presentes en el aceite de menhaden derivatizados con los sistemas de isotopólogos de AEPy d_0/d_3 y d_0/d_s (abajo y arriba, respectivamente).

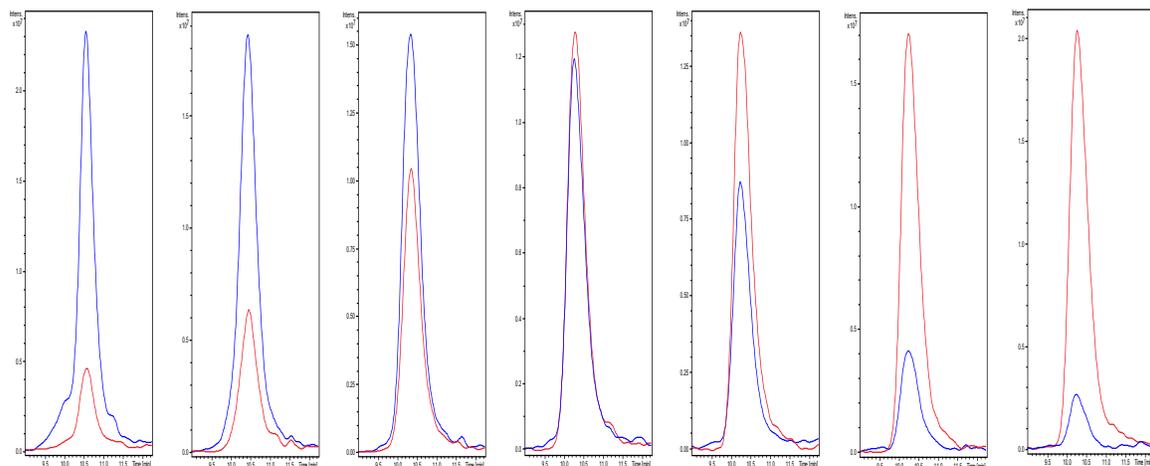
Anexo 5 y 6. EIC de las curvas de calibración de EPA y DHA y Δ del r.t. de EPA

Figura A6. EIC de la curva de calibración de EPA derivatizado con AEPy-do (azul) y su estándar interno derivatizado con AEPy-d5 (Rojo) adicionado a concentración constante (7.027 ppm) en todos los niveles de concentración.

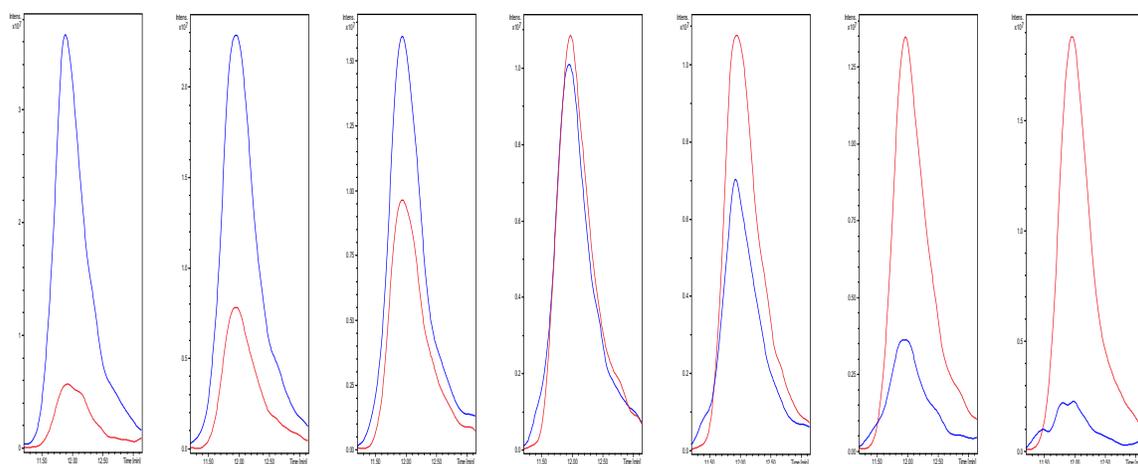


Figura A7. EIC de la curva de calibración de DHA derivatizado con AEPy-do (azul) y su estándar interno derivatizado con AEPy-d5 (Rojo) adicionado a concentración constante (7.680 ppm) en todos los niveles de concentración.

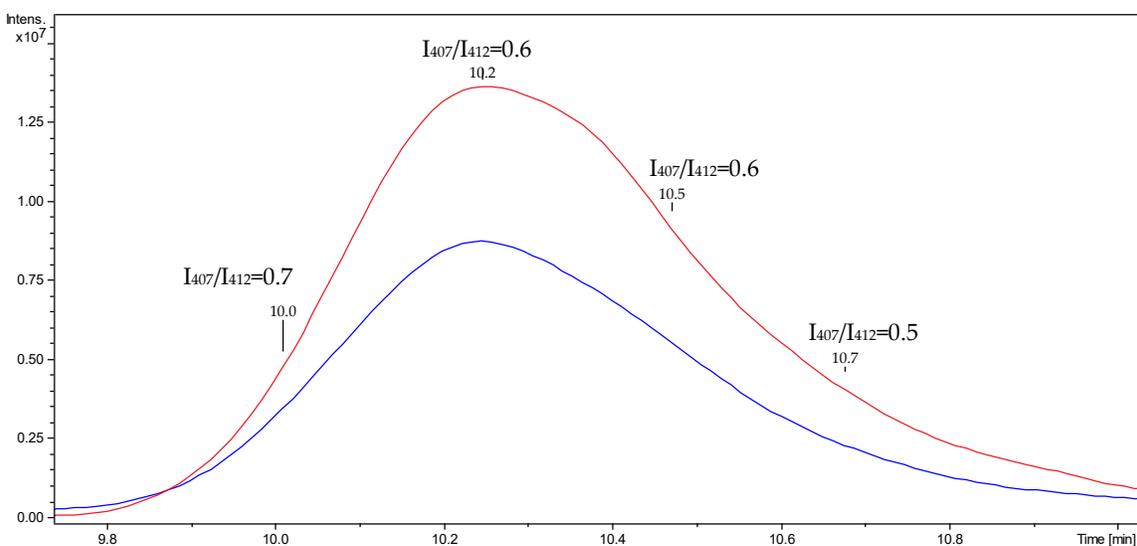
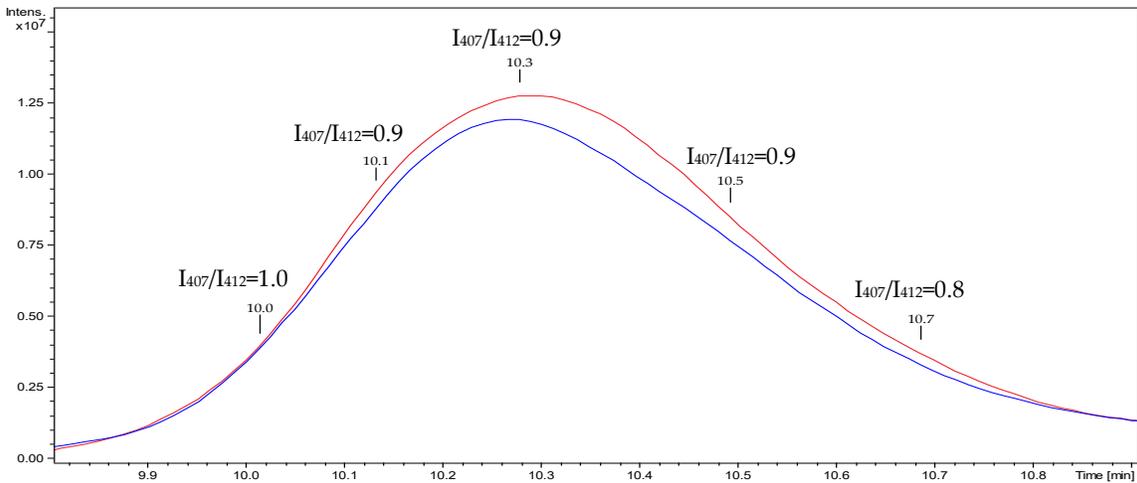
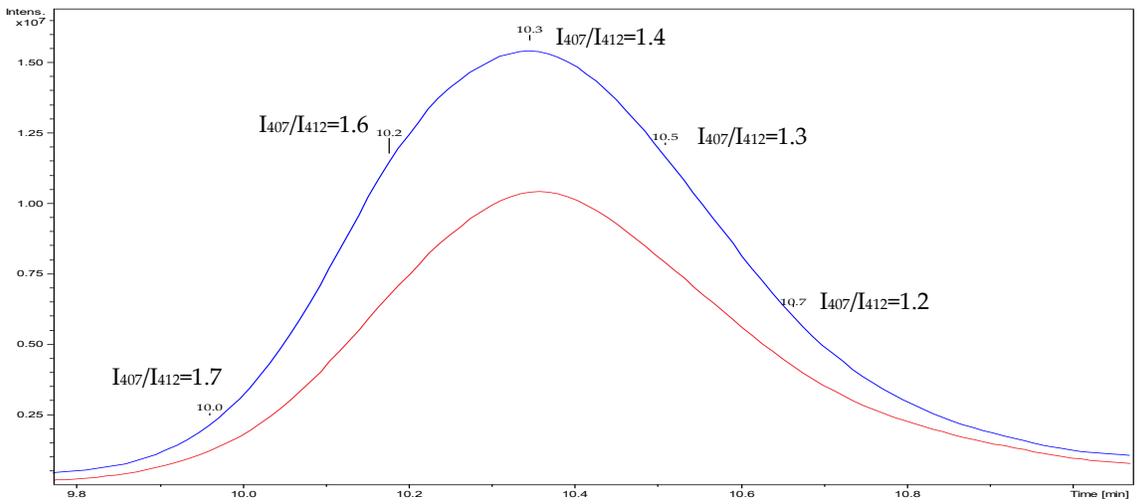
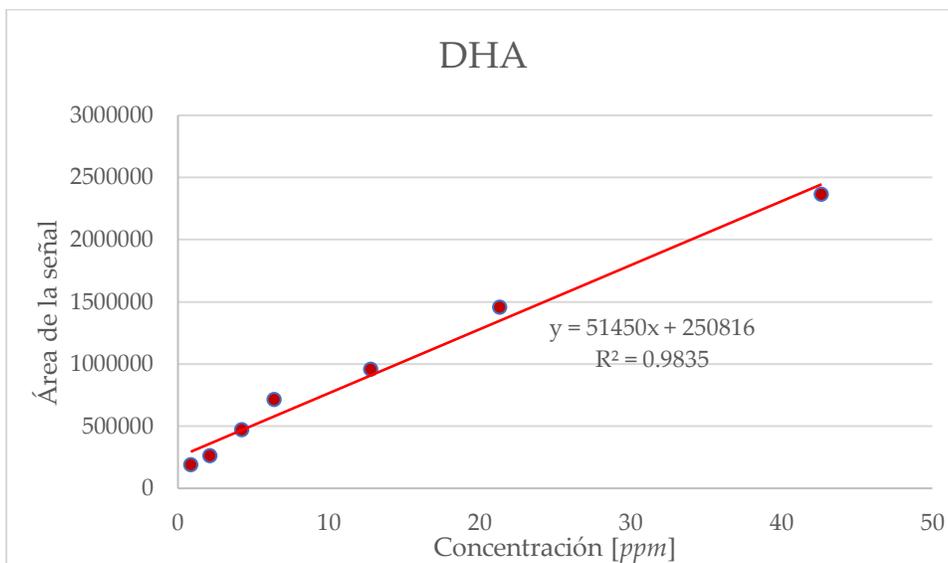
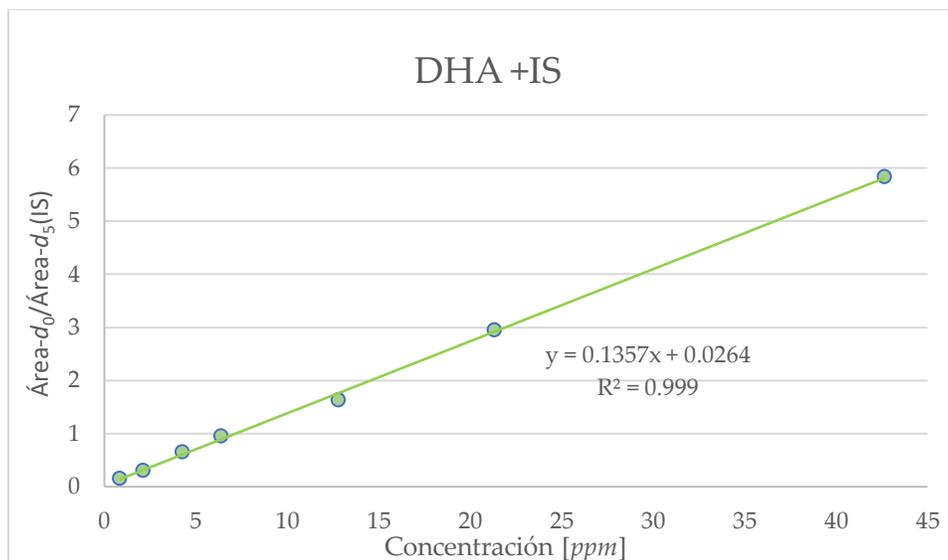


Figura A8. Tres EIC ácidos EPA derivatizados con el par de isotopólogos de AEPy 20:5-d₀/20:5-d₅, con distintas proporciones, la distribución de relaciones de los iones 407/412 evidencia un ligero desfase en los tiempos de retención, eluyendo primero el isotopólogo ligero.



Curva de calibración de DHA sin corrección por estándar interno (IS)



Curva de calibración de DHA con corrección por estándar interno (IS)

Figura A9. Mejora en la linealidad conferida por el uso de estándar interno en la curva de calibración de DHA.

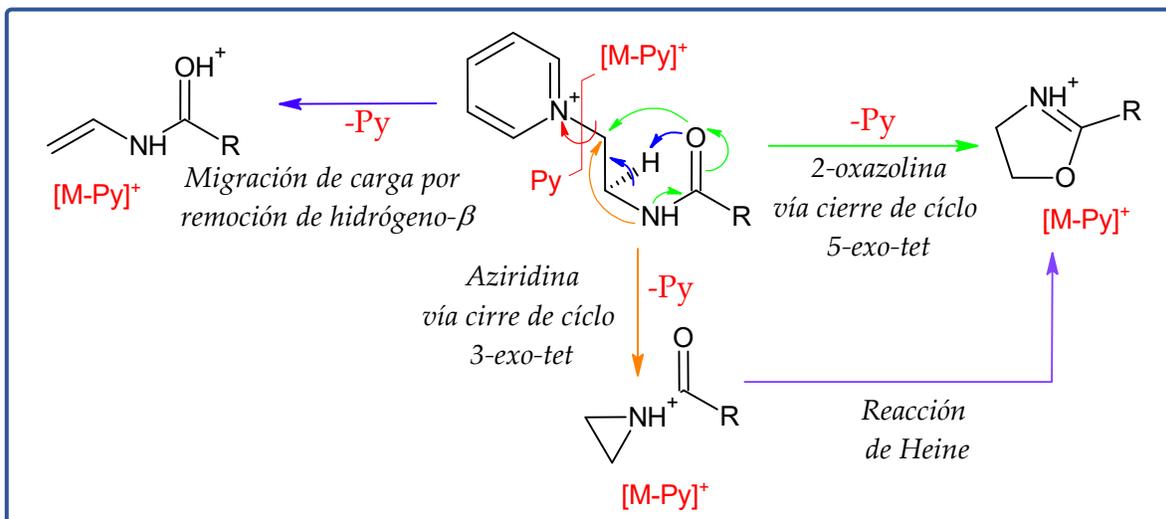


Figura A10. Posibles mecanismo de fragmentación con pérdida neutra (-PY) de los ácidos grasos derivatizados con AEPy.

Anexo 7. Oximas precursoras de las picolilaminas

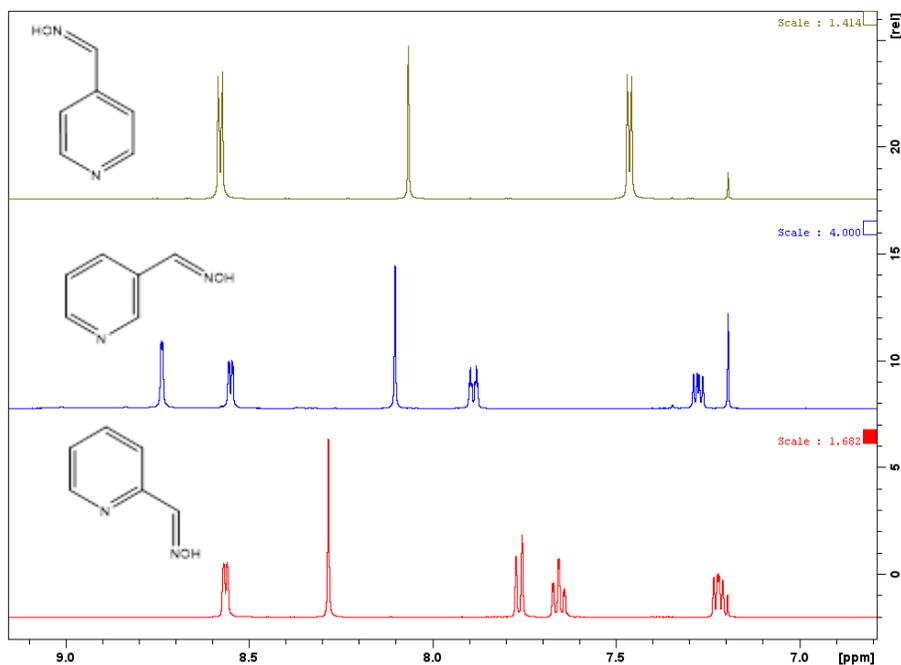


Figura A11. Espectros 1H NMR de las oximas de la α , β y γ piridincarboxaldehído.

Referencias

- Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Egorova-Zachernyuk, T. A., & Molina Grima, E. (2005). Cost-effective production of ^{13}C , ^{15}N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. *Biomolecular Engineering*, 22(5–6), 193–200. <https://doi.org/10.1016/J.BIOENG.2005.09.002>
- An, N., Cai, W. J., Zhu, Q. F., Wang, W., Hussain, D., & Feng, Y. Q. (2020). Metabolic profiling of organic acids in honey by stable isotope labeling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 87, 103423. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2020.103423>
- Anderson, B. A., Bell, E. C., Ginah, F. O., Harn, N. K., Pagh, L. M., & Wepsiec, J. P. (1998). Cooperative catalyst effects in palladium-mediated cyanation reactions of aryl halides and triflates. *Journal of Organic Chemistry*, 63(23), 8224–8228. <https://doi.org/10.1021/JO9808674/ASSET/IMAGES/LARGE/JO9808674H00001.JPEG>
- Armbruster, M. R., Grady, S. F., Cho, K., Patti, G. J., Bythell, B. J., Arnatt, C. K., Edwards, J. L., Armbruster, M. R., Grady, S. F., Arnatt, C. K., Edwards, J. L., Cho, K., & Bythell, B. J. (2023). High Throughput Metabolomics using 96-plex Isotope Tagging. <https://doi.org/10.26434/CHEMRXIV-2023-ZRJTH>
- Atzrodt, J., Derdau, V., Kerr, W. J., & Reid, M. (2018). C–H Functionalisation for Hydrogen Isotope Exchange. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(12), 3022–3047. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201708903>
- Austin, R. J., Kuestner, R. E., Chang, D. K., Madden, K. R., & Martin, D. B. (2011). SILAC compatible strain of *Pichia pastoris* for expression of isotopically labeled protein standards and quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 10(11), 5251–5259. <https://doi.org/10.1021/PR200551E>
- Ayerza, R. (1995). Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Five Northwestern Locations in Argentina.
- BACHNER, P., MCKAY, D. G., & RITTENBERG, D. (1964). THE PATHOLOGIC ANATOMY OF DEUTERIUM INTOXICATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(3), 464–471. <https://doi.org/10.1073/PNAS.51.3.464>
- Bachor, R., Mielczarek, P., Rudowska, M., Silberring, J., & Szewczuk, Z. (2014). Sensitive detection of charge derivatized peptides at the attomole level using nano-LC-ESI-MRM analysis. *International Journal of Mass Spectrometry*, 362(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2014.02.018>
- Becker, J. S. (2007). Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 1–496. <https://doi.org/10.1002/9780470517222>
- Benoit, F. M., & Harrison, A. G. (1976). Hydrogen migrations in mass spectrometry. I—The loss of olefin from phenyl-n-propyl ether following electron impact ionization and chemical ionization. *Organic Mass Spectrometry*, 11(6), 599–608. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210110606>
- Berg, T., & Strand, D. H. (2011). ^{13}C labelled internal standards—A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9366–9374. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.10.081>
- Bertrand, M., Beynon, J. H., & Cooks, R. G. (1973). Isotope effects upon hydrogen atom loss from molecular ions. *Organic Mass Spectrometry*, 7(2), 193–201. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210070209>
- Betancourt, S. K., Canez, C. R., Shields, S. W. J., Manthorpe, J. M., Smith, J. C., & McLuckey, S. A. (2017). Trimethylation Enhancement Using ^{13}C -Diazomethane: Gas-Phase Charge Inversion

- of Modified Phospholipid Cations for Enhanced Structural Characterization. *Analytical Chemistry*, 89(17), 9452–9458. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B02271/SUPPL_FILE/AC7B02271_SI_001.PDF
- Bian, X., Sun, B., Zheng, P., Li, N., & Wu, J. L. (2017). Derivatization enhanced separation and sensitivity of long chain-free fatty acids: Application to asthma using targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry approach. *Analytica Chimica Acta*, 989, 59–70. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.08.009>
- Blagojevic, V., Zhidkov, N., Tharmaratnam, S., Pham, V. T., Kaplan, H., & Bohme, D. K. (2010). Peptide quantitation with methyl iodide isotopic tags and mass spectrometry. *Analyst*, 135(6), 1456–1460. <https://doi.org/10.1039/C0AN00003E>
- Bodnar-Broniarczyk, M., Pawiński, T., & Kunicki, P. K. (2019). Isotope-labeled versus analog internal standard in LC–MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples – A compensation of matrix effects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1104, 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2018.11.026>
- Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols*, 4(4), 484–494. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2009.21>
- Bollinger, J. G., Rohan, G., Sadilek, M., & Gelb, M. H. (2013). LC/ESI-MS/MS detection of FAs by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity. *Journal of Lipid Research*, 54(12), 3523–3530. <https://doi.org/10.1194/JLR.D040782>
- Bollinger, J. G., Thompson, W., Lai, Y., Oslund, R. C., Hallstrand, T. S., Sadilek, M., Turecek, F., & Gelb, M. H. (2010). Improved sensitivity mass spectrometric detection of eicosanoids by charge reversal derivatization. *Analytical Chemistry*, 82(16), 6790–6796. https://doi.org/10.1021/AC100720P/SUPPL_FILE/AC100720P_SI_001.PDF
- Bowmaker, G. A., Effendy, Hanna, J. V., Healy, P. C., King, S. P., Pettinari, C., Skelton, B. W., & White, A. H. (2011). Solution and mechanochemical syntheses, and spectroscopic and structural studies in the silver(I) (bi)-carbonate: triphenylphosphine system. *Dalton Transactions*, 40(27), 7210–7218. <https://doi.org/10.1039/C1DT10416K>
- Bruheim, P., Kvitvang, H. F. N., & Villas-Boas, S. G. (2013). Stable isotope coded derivatizing reagents as internal standards in metabolite profiling. *Journal of Chromatography A*, 1296, 196–203. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.03.072>
- Burley, S. D., Lam, V. V., Lakner, F. J., Bergdahl, B. M., & Parker, M. A. (2013). New route to the ergoline skeleton via cyclization of 4-unsubstituted indoles. *Organic Letters*, 15(11), 2598–2600. https://doi.org/10.1021/OL400620A/SUPPL_FILE/OL400620A_SI_002.ZIP
- Cai, W. J., Yu, L., Wang, W., Sun, M. X., & Feng, Y. Q. (2019). Simultaneous Determination of Multiclass Phytohormones in Submilligram Plant Samples by One-Pot Multifunctional Derivatization-Assisted Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 91(5), 3492–3499. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.8B05087/SUPPL_FILE/AC8B05087_SI_001.PDF
- Cai, Y. M., Zhang, X., An, C., Yang, Y. F., Liu, W., Gao, W. X., Huang, X. B., Zhou, Y. B., Liu, M. C., & Wu, H. Y. (2019). Catalyst-free oxidative N–N coupling for the synthesis of 1,2,3-triazole compounds with tBuONO. *Organic Chemistry Frontiers*, 6(9), 1481–1484. <https://doi.org/10.1039/C9QO00071B>
- Carmona-Jiménez, Y., Igartuburu, J. M., Guillén-Sánchez, D. A., & García-Moreno, M. V. (2022). Fatty Acid and Tocopherol Composition of Pomace and Seed Oil from Five Grape Varieties Southern Spain. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(20). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27206980>

- Carpy, A., Patel, A., Tay, Y. D., Hagan, I. M., & Macek, B. (2015). Nic1 inactivation enables stable isotope labeling with $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -arginine in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *14*(1), 243–250. <https://doi.org/10.1074/MCP.O114.045302>
- Chahrour, O., Cobice, D., & Malone, J. (2015). Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *113*, 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.013>
- Chatterjee, B., & Chidambaram, G. (2018). Selective deuteration of organic compounds catalyzed by ruthenium pincer complexes. In *Pincer Compounds: Chemistry and Applications* (Issue 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812931-9.00025-6>
- Chen, J., & Liu, H. (2020). Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 5695, 21(16), 5695. <https://doi.org/10.3390/IJMS21165695>
- Chen, X. L., Li, X. Y., Li, S. S., Bai, X., Li, T., Goud, E. Y., Zhong, C. M., & Zuo, Y. J. (2020). Ion-Functionalized Silver(I) Carboxylates: Synthesis and Application in Ru-Catalyzed Olefin Metathesis Reaction. *Russian Journal of General Chemistry*, *90*(11), 2163–2169. <https://doi.org/10.1134/S1070363220110237>
- Chen, X., Sun, Y., Zhang, T., Shu, L., Roepstorff, P., & Yang, F. (2021). Quantitative Proteomics Using Isobaric Labeling: A Practical Guide. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *19*(5), 689–706. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.012>
- Choe, L., D'Ascenzo, M., Relkin, N. R., Pappin, D., Ross, P., Williamson, B., Guertin, S., Pribil, P., & Lee, K. H. (2007). 8-Plex Quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics*, *7*(20), 3651. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200700316>
- Chukanov, N. V., Kidd, B. E., Kovtunova, L. M., Bukhtiyarov, V. I., Shchepin, R. V., Chekmenev, E. Y., Goodson, B. M., Kovtunov, K. V., & Koptyug, I. V. (2019). A versatile synthetic route to the preparation of ^{15}N heterocycles. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, *62*(13), 892–902. <https://doi.org/10.1002/JLCR.3699>
- Davoli, E., & Gross, M. L. (1990). Charge remote fragmentation of fatty acids cationized with alkaline earth metal ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *1*(4), 320–324. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(90\)85008-A](https://doi.org/10.1016/1044-0305(90)85008-A)
- Dayon, L., & Affolter, M. (2020). Progress and pitfalls of using isobaric mass tags for proteome profiling. *Expert Review of Proteomics*, *17*(2), 149–161. <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1731309>
- Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., & Sanchez, J. C. (2008). Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Analytical Chemistry*, *80*(8), 2921–2931. <https://doi.org/10.1021/AC702422X>
- Demarque, D. P., Crotti, A. E. M., Vessecchi, R., Lopes, J. L. C., & Lopes, N. P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, *33*(3), 432–455. <https://doi.org/10.1039/C5NP00073D>
- Dilworth, D. J., Saleem, R. A., Rogers, R. S., Mirzaei, H., Boyle, J., & Aitchison, J. D. (2010). QTIPS: A novel method of unsupervised determination of isotopic amino acid distribution in SILAC experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *21*(8), 1417. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.04.002>
- El-Maghrabey, M. H., Kishikawa, N., & Kuroda, N. (2020). Current trends in isotope-coded derivatization liquid chromatographic-mass spectrometric analyses with special emphasis on

- their biomedical application. *Biomedical Chromatography*, 34(3), e4756. <https://doi.org/10.1002/BMC.4756>
- Eneroth, P., Gordon, B., Ryhage, R., & Sjövall, J. (1966). Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 7(4), 511–523. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39261-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39261-0)
- Esch, P., & Heiles, S. (2018). Charging and Charge Switching of Unsaturated Lipids and Apolar Compounds Using Paternò-Büchi Reactions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(10), 1971–1980. <https://doi.org/10.1007/S13361-018-2023-X/FIGURES/4>
- Fatemi, S. H., & Hammond, E. G. (1980). Analysis of oleate, linoleate and linolenate hydroperoxides in oxidized ester mixtures. *Lipids*, 15(5), 379–385. <https://doi.org/10.1007/BF02533555>
- Feng, G., Gao, M., Fu, R., Wan, Q., Wang, T., Zhang, Z., & Chen, S. (2022). Direct N-Me Aziridination Reaction Enables Pinpointing C=C Bonds in Lipids with Mass Spectrometry. *BioRxiv*, 2022.04.24.489320. <https://doi.org/10.1101/2022.04.24.489320>
- Flory, M. R., Griffin, T. J., Martin, D., & Aebersold, R. (2002). Advances in quantitative proteomics using stable isotope tags. *Trends in Biotechnology*, 20(12 Suppl). [https://doi.org/10.1016/S1471-1931\(02\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S1471-1931(02)00203-3)
- Frank, E., Kessler, M. S., Filiou, M. D., Zhang, Y., Maccarone, G., Reckow, S., Bunck, M., Heumann, H., Turck, C. W., Landgraf, R., & Hamsch, B. (2009). Stable isotope metabolic labeling with a novel N-enriched bacteria diet for improved proteomic analyses of mouse models for psychopathologies. *PloS One*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007821>
- Frankfater, C., Jiang, X., & Hsu, F. F. (2018). Characterization of Long-Chain Fatty Acid as N-(4-Aminomethylphenyl) Pyridinium Derivative by MALDI LIFT-TOF/TOF Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(8), 1688–1699. https://doi.org/10.1007/S13361-018-1993-Z/SUPPL_FILE/JS8B05888_SI_001.DOCX
- Gao, S., Zhou, X., Yue, M., Zhu, S., Liu, Q., & Zhao, X.-E. (2023). Advances and perspectives in chemical isotope labeling-based mass spectrometry methods for metabolome and exposome analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 162, 117022. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.117022>
- Geiger, T., Wisniewski, J. R., Cox, J., Zanivan, S., Kruger, M., Ishihama, Y., & Mann, M. (2011). Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nature Protocols*, 6(2), 147–157. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2010.192>
- Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., & Gygi, S. P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 6940–6945. https://doi.org/10.1073/PNAS.0832254100/SUPPL_FILE/2254SUPPORTINGMETHODS.HTML
- Gevaert, K., Impens, F., Ghesquière, B., Van Damme, P., Lambrechts, A., & Vandekerckhove, J. (2008). Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics*, 8(23–24), 4873–4885. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200800421>
- Gilmore, K., Mohamed, R. K., & Alabugin, I. V. (2016). The Baldwin rules: revised and extended. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(5), 487–514. <https://doi.org/10.1002/WCMS.1261>
- Gong, G. G., Zheng, J., Li, S., Bai, Y. L., & Feng, Y. Q. (2022). Triple chemical derivatization strategy assisted liquid chromatography-mass spectrometry for determination of retinoic acids in human serum. *Talanta*, 245, 123474. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2022.123474>
- Grocholska, P., & Bachor, R. (2021). Trends in the Hydrogen-Deuterium Exchange at the Carbon Centers. Preparation of Internal Standards for Quantitative Analysis by LC-MS. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26102989>

- Gross, J. H. (n.d.). *Mass spectrometry: a textbook*. 968. Retrieved July 29, 2023, from https://books.google.com/books/about/Mass_Spectrometry.html?id=PdMnDwAAQBAJ
- Gruia, A., Dumbravă, D.-G., Moldovan, C., Bordean, D.-M., Popa, V., Raba, D., Dumbrava, D., Bordean, D., & Mateescu, C. (2012). *Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (Linum Usitatissimum L.) from Romania Characterization of the sub-cellular effects of functionalised magnetic nanoparticles in targeted anti-tumor therapy-PNII-RU-TE, Babes-Bolyai University View project Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (L.) from Romania*. <https://www.researchgate.net/publication/268205116>
- Guan, B., Sun, Y., Liu, X., Zhong, C., Li, D., Shan, X., Hui, X., Lu, C., Huo, Y., Sun, R., Wei, M., & Zheng, W. (2024). Comparative evaluation of amino acid profiles, fatty acid compositions, and nutritional value of two varieties of head water *Porphyra yezoensis*: "Jianghaida No. 1" and "Sutong No.1." *Food Chemistry: X*, 22, 101375. <https://doi.org/10.1016/j.FOCHX.2024.101375>
- Gunasekera, K., Wüthrich, D., Braga-Lagache, S., Heller, M., & Ochsenreiter, T. (2012). Proteome remodelling during development from blood to insect-form *Trypanosoma brucei* quantified by SILAC and mass spectrometry. *BMC Genomics*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-556/FIGURES/7>
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, 17(10), 994–999. <https://doi.org/10.1038/13690>
- Han, Y., Qu, X., Geng, H., Wang, L., Zhu, Z., Zhang, Y., Cui, X., Lu, H., Wang, X., Chen, P., Wang, Q., & Sun, C. (2023). Isotope-Coded On-Tissue Derivatization for Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Short-Chain Fatty Acids in Biological Tissues. *Analytical Chemistry*, 95(48), 17622–17628. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.3C03308>
- Hao, Y. H., Zhang, Z., Wang, L., Liu, C., Lei, A. W., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2015). Stable isotope labeling assisted liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for quantitative analysis of endogenous gibberellins. *Talanta*, 144, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.TALANTA.2015.06.056>
- Hellhake, S., Meckelmann, S. W., Empl, M. T., Rentmeister, K., Wißdorf, W., Steinberg, P., Schmitz, O. J., Benter, T., & Schebb, N. H. (2020). Non-targeted and targeted analysis of oxylipins in combination with charge-switch derivatization by ion mobility high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(23), 5743–5757. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02795-2>
- Henry Werstiuk, N., & U, C. J. (1989). Protium–deuterium exchange of substituted pyridines in neutral D₂O at elevated temperatures. *Canadian Journal of Chemistry*, 67(1), 5–10. <https://doi.org/10.1139/V89-002>
- Hermann, G., Schwaiger, M., Volejnik, P., & Koellensperger, G. (2018). ¹³C-labelled yeast as internal standard for LC–MS/MS and LC high resolution MS based amino acid quantification in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.JPBA.2018.03.050>
- Higashi, T., & Ogawa, S. (2016a). Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 162, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.JSBMB.2015.10.003>
- Higashi, T., & Ogawa, S. (2016b). Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.JPBA.2016.04.033>
- Higashi, T., & Ogawa, S. (2020). Derivatization-based sample-multiplexing for enhancing throughput in liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification of

- metabolites: an overview. *Journal of Chromatography A*, 1634. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461679>
- Hoffmann Edmond de, S. V. (2007). *Mass Spectrometry: principles and applications, 3rd Edition - Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant*. 1–4. <https://www.wiley.com/en-be/Mass+Spectrometry%3A+Principles+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780470033104>
- Horning, M. G., Stillwell, W. G., Nowlin, J., Lertratanakoon, K., Carroll, D., Dzidic, I., Stillwell, R. N., Horning, E. C., & Hill, R. M. (1974). The use of stable isotopes in gas chromatography – mass spectrometric studies of drug metabolism. *Journal of Chromatography A*, 91(C), 413–423. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97920-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97920-8)
- Howe, I., & McLafferty, F. W. (1971). Unimolecular Decomposition of Toluene and Cycloheptatriene Molecular Ions. Variation of the Degree of Scrambling and Isotope Effect with Internal Energy. *Journal of the American Chemical Society*, 93(1), 99–105. https://doi.org/10.1021/JA00730A019/ASSET/JA00730A019.FP.PNG_V03
- Hsu, F.-F. (Ed.). (2021). *Mass Spectrometry-Based Lipidomics*. 2306. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1410-5>
- Hsu, J. L., Huang, S. Y., Chow, N. H., & Chen, S. H. (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical Chemistry*, 75(24), 6843–6852. <https://doi.org/10.1021/AC0348625>
- Hu, G. Q., Bai, J. W., Li, E. C., Liu, K. H., Sheng, F. F., & Zhang, H. H. (2021). Synthesis of Multideuterated (Hetero)aryl Bromides by Ag(I)-Catalyzed H/D Exchange. *Organic Letters*, 23(5), 1554–1560. https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.0C04139/SUPPL_FILE/OL0C04139_SI_001.PDF
- Hu, Y., Liang, L., Wei, W. T., Sun, X., Zhang, X. J., & Yan, M. (2015). A convenient synthesis of deuterium labeled amines and nitrogen heterocycles with KOt-Bu/DMSO-d₆. *Tetrahedron*, 71(9), 1425–1430. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2015.01.015>
- Huang, L., Liu, W., Zhao, L. L., Zhang, Z., & Yan, X. (2021). Base-Catalyzed H/D Exchange Reaction of Difluoromethylarenes. *Journal of Organic Chemistry*, 86(5), 3981–3988. <https://doi.org/10.1021/ACS.JOC.0C02827>
- Ilyushenkova, V. V., Kulikova, L. N., Borisov, R. S., & Zaikin, V. G. (2017). Features of the First and Second Order Electrospray Ionization Mass Spectra for Salt-Like Products Derived from Monools and Diols Using Combined Reagents Based on ω -Bromoacyl Chlorides and Nitrogen Bases. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(14), 1383–1389. <https://doi.org/10.1134/S1061934817140052/METRICS>
- Ingemann, S., Hammerum, S., Derrick, P. J., Fokkens, R. H., & Nibbering, N. M. M. (1989). Energy-dependent reversal of secondary isotope effects on simple cleavage reactions: Tertiary amine radical cations with deuterium at remote positions. *Organic Mass Spectrometry*, 24(10), 885–888. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210241006>
- Ingemann, S., Kluff, E., Nibbering, N. M. M., Allison, C. E., Derrick, P. J., & Hammerum, S. (1991). Time-dependence of the isotope effects in the unimolecular dissociation of tertiary amine molecular ions. *Organic Mass Spectrometry*, 26(10), 875–881. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210261013>
- Iyer, S. S., Zhang, Z. P., Kellogg, G. E., & Karnes, H. T. (2004). Evaluation of deuterium isotope effects in normal-phase LC-MS-MS separations using a molecular modeling approach. *Journal of Chromatographic Science*, 42(7), 383–387. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/42.7.383>
- Jarre, G., Heyer, S., Memmel, E., Meinhardt, T., & Krueger, A. (2014). Synthesis of nanodiamond derivatives carrying amino functions and quantification by a modified kaiser test. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10, 2729–2737. <https://doi.org/10.3762/BJOC.10.288>

- Katz, J. J., & Crespi, H. L. (1966). Deuterated organisms: cultivation and uses. *Science (New York, N. Y.)*, 151(3715), 1187–1194. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.151.3715.1187>
- Kaya, I., Schembri, L. S., Nilsson, A., Shariatgorji, R., Baijnath, S., Zhang, X., Bezard, E., Svenningsson, P., Odell, L. R., & Andr en, P. E. (2023). *On-Tissue Chemical Derivatization for Comprehensive Mapping of Brain Carboxyl and Aldehyde Metabolites by MALDI-MS Imaging*. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00336>
- Kerteszy, T. M., Hall, L. H., Hill, D. W., & Grant, D. F. (2009). CE50: Quantifying Collision Induced Dissociation Energy for Small Molecule Characterization and Identification. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(9), 1759–1767. https://doi.org/10.1016/J.JASMS.2009.06.002/SUPPL_FILE/JS8B03567_SI_001.RTF
- Khurana, J. M., & Kukreja, G. (2002). Rapid reduction of nitriles to primary amines with nickel boride at ambient temperature. *Synthetic Communications*, 32(8), 1265–1269. <https://doi.org/10.1081/SCC-120003619>
- Kopf, S., Bourriquen, F., Li, W., Neumann, H., Junge, K., & Beller, M. (2022). Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules. *Chemical Reviews*, 122(6), 6634–6718. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.1C00795/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR1C00795_0048.GIF
- Kopf, S., Liu, J., Franke, R., Jiao, H., Neumann, H., & Beller, M. (2022a). Base-Mediated Remote Deuteration of N-Heteroarenes – Broad Scope and Mechanism. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(19), e202200204. <https://doi.org/10.1002/EJOC.202200204>
- Kopf, S., Liu, J., Franke, R., Jiao, H., Neumann, H., & Beller, M. (2022b). Base-Mediated Remote Deuteration of N-Heteroarenes – Broad Scope and Mechanism. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(19), e202200204. <https://doi.org/10.1002/EJOC.202200204>
- Koudehi, M. F., & Zibaseresht, R. (2020). One-Pot Suzuki-Miyaura C-C Coupling Reaction versus Stepwise Reaction Involving Isolated Synthesized Catalyst Addition. *Journal of Chemical Education*, 97(10), 3822–3828. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.0C00357>
- Krijgsveld, J., Ketting, R. F., Mahmoudi, T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C. P., Plasterk, R. H. A., & Heck, A. J. R. (2003). Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nature Biotechnology*, 21(8), 927–931. <https://doi.org/10.1038/NBT848>
- Kselikova, V., Husarcikova, K., Mojzeš, P., Zachleder, V., & Bišova, K. (2022). Cultivation of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Desmodesmus quadricauda* in highly deuterated media: Balancing the light intensity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 960862. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.960862/BIBTEX>
- Kselikova, V., Vitova, M., & Bišova, K. (2019). Deuterium and its impact on living organisms. *Folia Microbiologica*, 64(5), 673–681. <https://doi.org/10.1007/S12223-019-00740-0/METRICS>
- Lamos, S. M., Shortreed, M. R., Frey, B. L., Belshaw, P. J., & Smith, L. M. (2007). Relative Quantification of Carboxylic Acid Metabolites by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using Isotopic Variants of Choline. *Analytical Chemistry*, 79(14), 5143–5149. <https://doi.org/10.1021/AC062416M>
- Lau, A. Y. -K, Solka, B. H., & Harrison, A. G. (1974). Isotope effects and H/D scrambling in the fragmentation of labelled propenes. *Organic Mass Spectrometry*, 9(6), 555–557. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210090602>
- Leavens, W. J., Lane, S. J., Carr, R. M., Lockie, A. M., & Waterhouse, I. (2002). Derivatization for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of tris(trimethoxyphenyl)phosphonium compounds and their derivatives of amine and carboxylic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(5), 433–441. <https://doi.org/10.1002/RCM.559>

- Lehmann, W. D. (2017). A timeline of stable isotopes and mass spectrometry in the life sciences. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(1), 58–85. <https://doi.org/10.1002/MAS.21497>
- Lehmann, W. D., Stephan, M., & Fürstenberger, G. (1992). Profiling assay for lipoxygenase products of linoleic and arachidonic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 204(1), 158–170. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90156-2)
- Leng, J., Wang, H., Zhang, L., Zhang, J., Wang, H., & Guo, Y. (2013). A highly sensitive isotope-coded derivatization method and its application for the mass spectrometric analysis of analytes containing the carboxyl group. *Analytica Chimica Acta*, 758, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ACA.2012.11.008>
- Leon Bradlow, H., & Vanderwerf, C. A. (1951). Exchange reactions of a-halogenated pyridines. *Journal of Organic Chemistry*, 16(7), 1143–1152. https://doi.org/10.1021/JO50001A019/ASSET/JO50001A019.FP.PNG_V03
- Lewis, G. N. (1933). The biochemistry of water containing hydrogen isotope. *Journal of the American Chemical Society*, 55(8), 3503–3504. https://doi.org/10.1021/JA01335A509/ASSET/JA01335A509.FP.PNG_V03
- Lewis, G. N. (1934). THE BIOLOGY OF HEAVY WATER. *Science (New York, N.Y.)*, 79(2042), 151–153. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.79.2042.151>
- Li, E. C., Hu, G. Q., Zhu, Y. X., Zhang, H. H., Shen, K., Hang, X. C., Zhang, C., & Huang, W. (2019). Ag₂CO₃-Catalyzed H/D Exchange of Five-Membered Heteroarenes at Ambient Temperature. *Organic Letters*, 21(17), 6745–6749. https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.9B02369/SUPPL_FILE/OL9B02369_SI_001.PDF
- Li, X., & Franke, A. A. (2011). Improved LC-MS method for the determination of fatty acids in red blood cells by LC-orbitrap MS. *Analytical Chemistry*, 83(8), 3192–3198. https://doi.org/10.1021/AC103093W/SUPPL_FILE/AC103093W_SI_002.PDF
- Li, Y., Zheng, C., Jiang, Z. J., Tang, J., Tang, B., & Gao, Z. (2022a). Potassium tert-butoxide promoted regioselective deuteration of pyridines. *Chemical Communications*, 58(21), 3497–3500. <https://doi.org/10.1039/D1CC07128A>
- Li, Y., Zheng, C., Jiang, Z. J., Tang, J., Tang, B., & Gao, Z. (2022b). Potassium tert-butoxide promoted regioselective deuteration of pyridines. *Chemical Communications*, 58(21), 3497–3500. <https://doi.org/10.1039/D1CC07128A>
- Liu, C., Chen, Z., Su, C., Zhao, X., Gao, Q., Ning, G. H., Zhu, H., Tang, W., Leng, K., Fu, W., Tian, B., Peng, X., Li, J., Xu, Q. H., Zhou, W., & Loh, K. P. (2018). Controllable deuteration of halogenated compounds by photocatalytic D₂O splitting. *Nature Communications* 2017 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02551-8>
- Liu, M., Wei, F., Lv, X., Dong, X. yan, & Chen, H. (2018). Rapid and sensitive detection of free fatty acids in edible oils based on chemical derivatization coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 242, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2017.09.069>
- Looso, M., Borchardt, T., Krüger, M., & Braun, T. (2010). Advanced identification of proteins in uncharacterized proteomes by pulsed in vivo stable isotope labeling-based mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(6), 1157–1166. <https://doi.org/10.1074/MCP.M900426-MCP200>
- Looso, M., Michel, C. S., Konzer, A., Bruckskotten, M., Borchardt, T., Krüger, M., & Braun, T. (2012). Spiked-in pulsed in vivo labeling identifies a new member of the CCN family in regenerating newt hearts. *Journal of Proteome Research*, 11(9), 4693–4704. <https://doi.org/10.1021/PR300521P>
- Maccoll, A. (1974). Metastable ions, by R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Caprioli, G. R. Lester Elsevier, Amsterdam, 1973. pp. ix + 296. Dfi. 75-00, approx. £11-50, approx. \$28.90. *Organic Mass Spectrometry*, 9(1), 156–156. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210090122>

- Mai, V. H., Gadzhiev, O. B., Ignatov, S. K., & Nikonov, G. I. (2019). H/D exchange in N-heterocycles catalysed by an NHC-supported ruthenium complex. *Catalysis Science & Technology*, 9(13), 3398–3407. <https://doi.org/10.1039/C9CY00561G>
- Mann, M. (2014). Fifteen years of Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1188, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1142-4_1
- Mansour, M. P. (2005). Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C16-C28 polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)]. *Journal of Chromatography A*, 1097(1–2), 54–58. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.08.011>
- Mansour, M. P., Volkman, J. K., Holdsworth, D. G., Jackson, A. E., & Blackburn, S. I. (1999). Very-long-chain (C28) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. *Phytochemistry*, 50(4), 541–548. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00564-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00564-0)
- Martin, S. F., Munagapati, V. S., Salvo-Chirside, E., Kerr, L. E., & Le Bihan, T. (2012). Proteome turnover in the green alga *Ostreococcus tauri* by time course ¹⁵N metabolic labeling mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 476–486. <https://doi.org/10.1021/PR2009302>
- Mastrobuoni, G., Irgang, S., Pietzke, M., Aßmus, H. E., Wenzel, M., Schulze, W. X., & Kempa, S. (2012). Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genomics*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-215/FIGURES/7>
- Meckelmann, S. W., Hellhake, S., Steuck, M., Krohn, M., & Schebb, N. H. (2017). Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 130, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2017.02.003>
- Meija, J., & Mester, Z. (2008). Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Analytica Chimica Acta*, 607(2), 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.11.050>
- Mirgorodskaya, O. A., Körner, R., Kozmin, Y. P., & Roepstorff, P. (2012). Absolute quantitation of proteins by acid hydrolysis combined with amino acid detection by mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 828, 115–120. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-445-2_11
- Mochizuki, Y., Inagaki, S., Suzuki, M., Min, J. Z., Inoue, K., Todoroki, K., & Toyo’Oka, T. (2013). A novel derivatization reagent possessing a bromoquinolinium structure for biological carboxylic acids in HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 36(12), 1883–1889. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201300083>
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7–8), 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Morris, J. B., Wang, M. L., & Tonniss, B. D. (2021). Variability for oil, protein, lignan, tocopherol, and fatty acid concentrations in eight sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes. *Industrial Crops and Products*, 164, 113355. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113355>
- Mukaiyama, T. (1979). New Synthetic Reactions Based on the Onium Salts of Aza-Arenes [New synthetic methods (29)]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 18(10), 707–721. <https://doi.org/10.1002/ANIE.197907073>
- Münzenberg, G. (2013a). Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present. *International Journal of Mass Spectrometry*, 349–350(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2013.03.009>

- Münzenberg, G. (2013b). Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present. *International Journal of Mass Spectrometry*, 349–350(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.03.009>
- Murphy, R. C. (2014). Tandem Mass Spectrometry of Lipids. *Tandem Mass Spectrometry of Lipids*. <https://doi.org/10.1039/9781782626350>
- Narreddula, V. R., Boase, N. R., Ailuri, R., Marshall, D. L., Poad, B. L. J., Kelso, M. J., Trevitt, A. J., Mitchell, T. W., & Blanksby, S. J. (2019). Introduction of a Fixed-Charge, Photolabile Derivative for Enhanced Structural Elucidation of Fatty Acids. *Anal. Chem*, 91, 9901–9909. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01566>
- Nelson, C. J., Alexova, R., Jacoby, R. P., & Harvey Millar, A. (2014). Proteins with High Turnover Rate in Barley Leaves Estimated by Proteome Analysis Combined with in Planta Isotope Labeling. *Plant Physiology*, 166(1), 91–108. <https://doi.org/10.1104/PP.114.243014>
- Nier, A. O., Nier, & O., A. (1940). A Mass Spectrometer for Routine Isotope Abundance Measurements. *RSci*, 11(7), 212–216. <https://doi.org/10.1063/1.1751688>
- Nolte, H., Konzer, A., Ruhs, A., Jungblut, B., Braun, T., & Krüger, M. (2014). Global protein expression profiling of zebrafish organs based on in vivo incorporation of stable isotopes. *Journal of Proteome Research*, 13(4), 2162–2174. <https://doi.org/10.1021/PR5000335>
- Ogawa, S., Tomaru, K., Matsumoto, N., Watanabe, S., & Higashi, T. (2016). LC/ESI-MS/MS method for determination of salivary eicosapentaenoic acid concentration to arachidonic acid concentration ratio. *Biomedical Chromatography*, 30(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/BMC.3421>
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 1(5), 376–386. <https://doi.org/10.1074/MCP.M200025-MCP200>
- Ong, S. E., Kratchmarova, I., & Mann, M. (2003). Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteome Research*, 2(2), 173–181. <https://doi.org/10.1021/PR0255708>
- Osbond, J. M., Philpott, P. G., & Wickens, J. C. (1961). 542. Essential fatty acids. Part I. Synthesis of linoleic, γ -linolenic, arachidonic, and docosa-4,7,10,13,16-pentaenoic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 0, 2779–2787. <https://doi.org/10.1039/JR9610002779>
- Picard, G., Lebert, D., Louwagie, M., Adrait, A., Huillet, C., Vandenesch, F., Bruley, C., Garin, J., Jaquinod, M., & Brun, V. (2012). PSAQTM standards for accurate MS-based quantification of proteins: From the concept to biomedical applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(10). <https://doi.org/10.1002/jms.3106>
- Ping, L., Zhang, H., Zhai, L., Dammer, E. B., Duong, D. M., Li, N., Yan, Z., Wu, J., & Xu, P. (2013). Quantitative proteomics reveals significant changes in cell shape and an energy shift after IPTG induction via an optimized SILAC approach for Escherichia coli. *Journal of Proteome Research*, 12(12), 5978–5988. <https://doi.org/10.1021/PR400775W>
- Platt, G. M. H., Aguiar, P. M., Athavan, G., Bray, J. T. W., Scott, N. W. J., Fairlamb, I. J. S., & Perutz, R. N. (2023). Opening a Pandora's Flask on a Prototype Catalytic Direct Arylation Reaction of Pentafluorobenzene: The Ag₂CO₃/Pd(OAc)₂/PPh₃ System. *Organometallics*, 42(17), 2378–2394. <https://doi.org/10.1021/ACS.ORGANOMET.3C00309> https://doi.org/10.1021/ACS.ORGANOMET.3C00309/ASSET/IMAGES/LARGE/OM3C00309_0018.JPEG
- Qi, W., Wang, Y., Cao, Y., Cao, Y., Guan, Q., Sun, T., Zhang, L., & Guo, Y. (2020). Simultaneous Analysis of Fatty Alcohols, Fatty Aldehydes, and Sterols in Thyroid Tissues by Electrospray Ionization-Ion Mobility-Mass Spectrometry Based on Charge Derivatization. *Analytical Chemistry*, 92(13), 8644–8648.

- https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C01292/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0C01292_0004.JPG
- Qian, W. J., Petritis, B. O., Nicora, C. D., & Smith, R. D. (2011). Trypsin-catalyzed oxygen-18 labeling for quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 753, 43–54. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-148-2_3
- Qiao, X. Q., Zhou, Y., Hou, C. Y., Zhang, X. D., Yang, K. G., Zhang, L. H., & Zhang, Y. K. (2013). 1-(3-Aminopropyl)-3-butylimidazolium bromide for carboxyl group derivatization: Potential applications in high sensitivity peptide identification by mass spectrometry. *Science China Life Sciences*, 56(3), 240–245. <https://doi.org/10.1007/S11427-013-4446-8>
- Quehenberger, O., Armando, A. M., & Dennis, E. A. (2011). High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 648–656. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2011.07.006>
- Raphael, R. A., & Sondheimer, F. (1950). 25. The synthesis of long-chain aliphatic acids from acetylenic compounds. Part II. The synthesis of a geometrical isomer of pellitorine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 0, 120–122. <https://doi.org/10.1039/JR9500000120>
- Rittenberg, D., & Foster, G. L. (1940). A NEW PROCEDURE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS BY ISOTOPE DILUTION, WITH APPLICATION TO THE DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND FATTY ACIDS. *Journal of Biological Chemistry*, 133(3), 737–744. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)73304-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73304-8)
- Robinson, P. J. (Peter J., & Holbrook, K. A. (Kenneth A.). (1972). *Unimolecular reactions*. 371.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., & Pappin, D. J. (2004a). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(12), 1154–1169. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., & Pappin, D. J. (2004b). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 3(12), 1154–1169. <https://doi.org/10.1074/MCP.M400129-MCP200>
- Saha, S. K., Hayes, J., Moane, S., & Murray, P. (2013). Tagging of biomolecules with deuterated water (D₂O) in commercially important microalgae. *Biotechnology Letters*, 35(7), 1067–1072. <https://doi.org/10.1007/S10529-013-1176-8>
- Salamanca, V., & Albéniz, A. C. (2020). Deuterium Exchange between Arenes and Deuterated Solvents in the Absence of a Transition Metal: Synthesis of D-Labeled Fluoroarenes. *European Journal of Organic Chemistry*, 2020(22), 3206–3212. <https://doi.org/10.1002/EJOC.202000284>
- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., & Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77(2–3), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3)
- Scheiner, M., Sink, A., Hoffmann, M., Vrigneau, C., Endres, E., Carles, A., Sotriffer, C., Maurice, T., & Decker, M. (2022). Photoswitchable Pseudoirreversible Butyrylcholinesterase Inhibitors Allow Optical Control of Inhibition in Vitro and Enable Restoration of Cognition in an Alzheimer’s Disease Mouse Model upon Irradiation. *Journal of the American Chemical Society*, 144(7), 3279–3284. <https://doi.org/10.1021/JACS.1C13492>
- Schmidt, A., Kellermann, J., & Lottspeich, F. (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics*, 5(1), 4–15. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200400873>

- Schnölzer, M., Jedrzejewski, P., & Lehmann, W. D. (1996). Protease-catalyzed incorporation of ¹⁸O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*, 17(5), 945–953. <https://doi.org/10.1002/ELPS.1150170517>
- Schoenheimer, R., & Rittenberg, D. (1938). The application of isotopes to the study of intermediary metabolism. *Science*, 87(2254), 221–226. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.87.2254.221/ASSET/8AAFC157-741F-458F-A0B2-EAE76CFAF83F/ASSETS/SCIENCE.87.2254.221.FP.PNG>
- Setner, B., Rudowska, M., Klem, E., Cebrat, M., & Szewczuk, Z. (2014). Peptides derivatized with bicyclic quaternary ammonium ionization tags. Sequencing via tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(10), 995–1001. <https://doi.org/10.1002/JMS.3410>
- Sheng, F. F., Li, E. C., Bai, J. W., Wang, C. X., Hu, G. Q., Liu, K. H., Sun, Z. Y., Shen, K., & Zhang, H. H. (2022). Silver salt enabled H/D exchange at the β-position of thiophene rings: synthesis of fully deuterated thiophene derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 20(6), 1176–1180. <https://doi.org/10.1039/D1OB02285G>
- Somasundaram, P., Koudelka, T., Linke, D., & Tholey, A. (2016). C-Terminal Charge-Reversal Derivatization and Parallel Use of Multiple Proteases Facilitates Identification of Protein C-Termini by C-Terminomics. *Journal of Proteome Research*, 15(4), 1369–1378. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.6B00146/SUPPL_FILE/PR6B00146_SI_004.XLSX
- Sprinson, D. B., & Rittenberg, D. (1951). Nature of the Activation Process in Enzymatic Reactions. *Nature* 1951 167:4247, 167(4247), 484–484. <https://doi.org/10.1038/167484a0>
- Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J., & Gevaert, K. (2004). Global differential non-gel proteomics by quantitative and stable labeling of tryptic peptides with oxygen-18. *Journal of Proteome Research*, 3(4), 786–791. <https://doi.org/10.1021/PR049956P/ASSET/IMAGES/MEDIUM/PR049956PN00001.GIF>
- Stoffel, W. (1965). Chemical synthesis of H³- and C¹⁴-labeled polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 42(7), 583–587. <https://doi.org/10.1007/BF02541294/METRICS>
- Stolp, L. J., & Kodali, D. R. (2022). Naturally occurring high-oleic oils: Avocado, macadamia, and olive oils. *High Oleic Oils: Development, Properties, and Uses*, 7–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822912-5.00003-4>
- Strife, R. J., & Murphy, R. C. (1984). Stable isotope labelled 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid: analysis by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine*, 13(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0262-1746\(84\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0262-1746(84)90095-7)
- Stults, J. T., Lai, J., McCune, S., & Wetzel, R. (1993). Simplification of High-Energy Collision Spectra of Peptides by Amino-Terminal Derivatization. *Analytical Chemistry*, 65(13), 1703–1708. https://doi.org/10.1021/AC00061A012/ASSET/AC00061A012.FP.PNG_V03
- Sun, D., Meng, X., Ren, T., Fawcett, J. P., Wang, H., & Gu, J. (2018). Establishment of a Charge Reversal Derivatization Strategy to Improve the Ionization Efficiency of Limaprost and Investigation of the Fragmentation Patterns of Limaprost Derivatives Via Exclusive Neutral Loss and Survival Yield Method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(7), 1365–1375. https://doi.org/10.1007/S13361-018-1924-Z/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JS8B05855_0003.GIF
- Sury, M. D., Chen, J. X., & Selbach, M. (2010). The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(10), 2173–2183. <https://doi.org/10.1074/MCP.M110.000323>
- Tang, J., Kong, J., Xu, H., Jiang, Z. J., She, Y., Bai, J., Tang, B., Chen, J., Gao, Z., & Gao, K. (2023). Multideuteration of Nitroaromatics by Silver-Catalyzed Hydrogen-Isotope Exchange. *Journal*

- of *Organic Chemistry*, 88(3), 1560–1567.
https://doi.org/10.1021/ACS.JOC.2C02618/SUPPL_FILE/JO2C02618_SI_001.PDF
- Thomas, Alan. Francis. (1971). *Deuterium Labeling in Organic Chemistry*. 518.
https://books.google.com/books/about/Deuterium_Labeling_in_Organic_Chemistry.html?id=fMgkAQAAIAAJ
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., & Hamon, C. (2003). Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8), 1895–1904.
<https://doi.org/10.1021/AC0262560>
- Thomson, J. F. (1960). Physiological effects of D20 in mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 84(16), 736–744. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1960.TB39105.X>
- Title, K. B.-(No, & 1962, undefined. (n.d.). Mass spectrometry: organic chemical applications. *Cir.Nii.Ac.Jp*. Retrieved August 5, 2023, from <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282271713351424>
- Tlahuext-Aca, A., & Hartwig, J. F. (2021). Site-Selective Silver-Catalyzed C-H Bond Deuteration of Five-Membered Aromatic Heterocycles and Pharmaceuticals. *ACS Catalysis*, 11(3), 1119–1127.
https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.0C04917/SUPPL_FILE/CS0C04917_SI_002.CIF
- Torde, R. G., Therrien, A. J., Shortreed, M. R., Smith, L. M., & Lamos, S. M. (2013). Multiplexed Analysis of Cage and Cage Free Chicken Egg Fatty Acids Using Stable Isotope Labeling and Mass Spectrometry. *Molecules* 2013, Vol. 18, Pages 14977-14988, 18(12), 14977–14988.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES181214977>
- Triebl, A., & Wenk, M. R. (2018). Analytical Considerations of Stable Isotope Labelling in Lipidomics. *Biomolecules* 2018, Vol. 8, Page 151, 8(4), 151. <https://doi.org/10.3390/BIOM8040151>
- Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* 2016 11:12, 11(12), 2301–2319.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
- Urban, P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079).
<https://doi.org/10.1098/RSTA.2015.0382>
- Ushkov, A. V., & Grushin, V. V. (2011). Rational catalysis design on the basis of mechanistic understanding: Highly efficient Pd-catalyzed cyanation of aryl bromides with NaCN in recyclable solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 133(28), 10999–11005.
https://doi.org/10.1021/JA2042035/SUPPL_FILE/JA2042035_SI_001.PDF
- Ussing, H. H. (1939). Analysis of Protein by Means of Deuterium-Containing Amino-Acids. *Nature* 1939 144:3658, 144(3658), 977–977. <https://doi.org/10.1038/144977a0>
- Van Pelt, C. K., Huang, M. C., Tschanz, C. L., & Brenna, J. T. (1999). An octaene fatty acid, 4,7,10,13,16,19,22,25-octacosaoctanoic acid (28:8n-3), found in marine oils. *Journal of Lipid Research*, 40(8), 1501–1505. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)33393-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)33393-9)
- Veith, H. J. (1979). K. Levsen: Fundamental Aspects of Organic Mass Spectrometry. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1978. XIII, 312 Seiten, Preis: DM88.-. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*, 83(1), 91–91. <https://doi.org/10.1002/BBPC.19790830120>
- Villanueva, J., Carrascal, M., & Abian, J. (2014). Isotope dilution mass spectrometry for absolute quantification in proteomics: concepts and strategies. *Journal of Proteomics*, 96, 184–199.
<https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2013.11.004>
- Wang, M., Han, R. H., & Han, X. (2013). Fatty acidomics: Global analysis of lipid species containing a carboxyl group with a charge-remote fragmentation-assisted approach. *Analytical Chemistry*, 85(19), 9312–9320. https://doi.org/10.1021/AC402078P/SUPPL_FILE/AC402078P_SI_001.PDF

- Wang, S. S., Wang, Y. J., Zhang, J., Sun, T. Q., & Guo, Y. L. (2019). Derivatization strategy for simultaneous molecular imaging of phospholipids and low-abundance free fatty acids in thyroid cancer tissue sections. *Analytical Chemistry*, 91(6), 4070–4076. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.8B05680>
- Washburn, M. P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schieltz, D. M., & Yates, J. R. (2002). Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1650–1657. <https://doi.org/10.1021/AC015704L>
- Wasslen, K. V., Tan, L. H., Manthorpe, J. M., & Smith, J. C. (2014). Trimethylation enhancement using diazomethane (TrEnDi): Rapid on-column quaternization of peptide amino groups via reaction with diazomethane significantly enhances sensitivity in mass spectrometry analyses via a fixed, permanent positive charge. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3291–3299. https://doi.org/10.1021/AC403349C/SUPPL_FILE/AC403349C_SI_001.PDF
- Werner, T., Becher, I., Sweetman, G., Doce, C., Savitski, M. M., & Bantscheff, M. (2012). High-resolution enabled TMT 8-plexing. *Analytical Chemistry*, 84(16), 7188–7194. <https://doi.org/10.1021/AC301553X>
- Werner, T., Sweetman, G., Savitski, M. F., Mathieson, T., Bantscheff, M., & Savitski, M. M. (2014). Ion coalescence of neutron encoded TMT 10-plex reporter ions. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3594–3601. <https://doi.org/10.1021/AC500140S>
- Westcott, J. Y., Clay, K. L., & Murphy, R. C. (1985). Preparation of oxygen-18-labeled lipoxigenase metabolites of arachidonic acid. *Biomedical Mass Spectrometry*, 12(12), 714–718. <https://doi.org/10.1002/BMS.1200121208>
- Wieser, M. E., & Brand, W. A. (1999). Isotope Ratio Studies Using Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 1072–1086. <https://doi.org/10.1006/RWSP.2000.0146>
- Xie, X., & Zubarev, R. A. (2014). Effects of Low-Level Deuterium Enrichment on Bacterial Growth. *PLoS ONE*, 9(7), 102071. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0102071>
- Xu, L., Hu, C., Liu, Y., Li, S., Vetter, W., Yin, H., & Wang, Y. (2020). Development of a sensitive and quantitative method for the identification of two major furan fatty acids in human plasma. *Journal of Lipid Research*, 61(4), 560–569. <https://doi.org/10.1194/JLR.D119000514>
- Xu, S. L., Wu, B. F., Orešič, M., Xie, Y., Yao, P., Wu, Z. Y., Lv, X., Chen, H., & Wei, F. (2020). Double Derivatization Strategy for High-Sensitivity and High-Coverage Localization of Double Bonds in Free Fatty Acids by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 92(9), 6446–6455. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.9B05588/SUPPL_FILE/AC9B05588_SI_001.PDF
- Yaglova, N. V., Timokhina, E. P., Obernikhin, S. S., & Yaglov, V. V. (2023). Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences 2023*, Vol. 24, Page 3107, 24(4), 3107. <https://doi.org/10.3390/IJMS24043107>
- Yang, H., Zarate, C., Palmer, W. N., Rivera, N., Hesk, D., & Chirik, P. J. (2018). Site-Selective Nickel-Catalyzed Hydrogen Isotope Exchange in N-Heterocycles and Its Application to the Tritiation of Pharmaceuticals. *ACS Catalysis*, 8(11), 10210–10218. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.8B03717/SUPPL_FILE/CS8B03717_SI_001.PDF
- Yang, J. (2016). Isotopes. *Deuterium*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811040-9.00001-1>
- Yang, K., Diltthey, B. G., & Gross, R. W. (2013). Identification and quantitation of fatty acid double bond positional isomers: A shotgun lipidomics approach using charge-switch derivatization. *Analytical Chemistry*, 85(20), 9742–9750. https://doi.org/10.1021/AC402104U/SUPPL_FILE/AC402104U_SI_001.PDF
- Yang, X., Ben, H., & Ragauskas, A. J. (2021). Recent Advances in the Synthesis of Deuterium-Labeled Compounds. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 10(10), 2473–2485. <https://doi.org/10.1002/AJOC.202100381>

- Young, R. S. E., Flakelar, C. L., Narreddula, V. R., Jekimovs, L. J., Menzel, J. P., Poad, B. L. J., & Blanksby, S. J. (2022). Identification of Carbon-Carbon Double Bond Stereochemistry in Unsaturated Fatty Acids by Charge-Remote Fragmentation of Fixed-Charge Derivatives. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03625>
- Yu, L., Liu, P., Wang, Y. L., Yu, Q. W., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2015). Profiling of aldehyde-containing compounds by stable isotope labelling-assisted mass spectrometry analysis. *Analyst*, 140(15), 5276–5286. <https://doi.org/10.1039/C5AN00657K>
- Zaia, J., & Biemann, K. (1995). Comparison of charged derivatives for high energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6(5), 428–436. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(95\)00018-9](https://doi.org/10.1016/1044-0305(95)00018-9)
- Zaikin, V. G., & Borisov, R. S. (2021). Options of the Main Derivatization Approaches for Analytical ESI and MALDI Mass Spectrometry. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1873100>, 52(6), 1287–1342. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1873100>
- Zarate, C., Yang, H., Bezdek, M. J., Hesk, D., & Chirik, P. J. (2019). Ni(I)-X Complexes Bearing a Bulky α -Diimine Ligand: Synthesis, Structure, and Superior Catalytic Performance in the Hydrogen Isotope Exchange in Pharmaceuticals. *Journal of the American Chemical Society*, 141(12), 5034–5044. https://doi.org/10.1021/JACS.9B00939/SUPPL_FILE/JA9B00939_SI_002.CIF
- Zhang, J., Yang, S., Wang, J., Xu, Y., Zhao, H., Lei, J., Zhou, Y., Chen, Y., Wu, L., Zhou, M., Li, Y., & Li, Y. (2021). Integrated LC-MS metabolomics with dual derivatization for quantification of FFAs in fecal samples of hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Lipid Research*, 62, 100143. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100143>
- Zhang, R., Sioma, C. S., Thompson, R. A., Xiong, L., & Regnier, F. E. (2002a). Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics. *Analytical Chemistry*, 74(15), 3662–3669. <https://doi.org/10.1021/AC025614W>
- Zhang, R., Sioma, C. S., Thompson, R. A., Xiong, L., & Regnier, F. E. (2002b). Controlling Deuterium Isotope Effects in Comparative Proteomics. *Analytical Chemistry*, 74(15), 3662–3669. <https://doi.org/10.1021/AC025614W>
- Zhang, R., Sioma, C. S., Wang, S., & Regnier, F. E. (2001). Fractionation of Isotopically Labeled Peptides in Quantitative Proteomics. *Analytical Chemistry*, 73(21), 5142–5149. <https://doi.org/10.1021/AC010583A>
- Zhu, Q. F., Hao, Y. H., Liu, M. Z., Yue, J., Ni, J., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2015). Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid by stable isotope probe labeling coupled with ultra high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1410, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.100>
- Zhu, Q. F., Zhang, Z., Liu, P., Zheng, S. J., Peng, K., Deng, Q. Y., Zheng, F., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2016). Analysis of liposoluble carboxylic acids metabolome in human serum by stable isotope labeling coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1460, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.017>
- Zinn, N., Hahn, B., Pipkorn, R., Schwarzer, D., & Lehmann, W. D. (2009). Phosphorus-based absolutely quantified standard peptides for quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, 8(10), 4870–4875. <https://doi.org/10.1021/PR900494M>
- Zinn, N., Winter, D., & Lehmann, W. D. (2010). Recombinant isotope labeled and selenium quantified proteins for absolute protein quantification. *Analytical Chemistry*, 82(6). <https://doi.org/10.1021/ac9025412>
- Zografos, A. L. (n.d.). *From biosynthesis to total synthesis : strategies and tactics for natural products*. Retrieved June 8, 2023, from <https://www.wiley.com/en-gb/From+Biosynthesis+to+Total+Synthesis%3A+Strategies+and+Tactics+for+Natural+Product+s-p-9781118751732>