

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 825**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

H01J 49/00 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2017 E 17178182 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3422005**

54 Título: **Determinación de enriquecimientos de trazadores de glucosa mediante espectrometría de masas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2021

73 Titular/es:
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ (100.0%)
Auenbruggerplatz 2
8036 Graz, AT

72 Inventor/es:
REGITNIG, WERNER;
KÖFELER, HARALD;
TRÖTZMÜLLER, MARTIN y
TRIEBL, ALEXANDER

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 806 825 T3

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

DESCRIPCIÓN

Determinación de enriquecimientos de trazadores de glucosa mediante espectrometría de masas

5 Sector de la invención

La presente invención, se refiere a un procedimiento para determinar los niveles de enriquecimiento de por lo menos dos trazadores de una sustancia objetivizada como diana, la cual incluye glucosa, mediante la utilización de espectrometría de masas. De una forma adicional, la presente invención se refiere a un conjunto de moléculas para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, la cual, de una forma particular, incluye glucosa y, de una forma adicional, ésta se refiere, así mismo, a un sistema para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana la cual incluye el conjunto de moléculas.

15 Antecedentes

Las técnicas de rastreo mediante múltiples trazadores para investigar los flujos de glucosa en la totalidad del cuerpo, implican, generalmente la administración de varios trazadores de glucosa al sujeto del estudio y la posterior determinación de los enriquecimientos de trazadores en la muestra de sangre. En muchos estudios clínicos, en los cuales se aplican estas técnicas, se utilizan isotópómeros de glucosa marcados, estables, como trazadores (tal como, por ejemplo, los [6,6-²H₂] glucosa, [1-¹³C₁] glucosa, [U-¹³C₆] glucosa) y, el análisis de los enriquecimientos de trazadores isotópicos estables en plasma sanguíneo se lleva a cabo mediante espectrómetros de masas cuadrupolo (Q-MS). De una forma típica, este analizador de masas de baja resolución, se acopla a sistemas de separación por cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) y se utiliza para medir las intensidades relativas de los iones seleccionados los cuales se derivan de las moléculas de glucosa no marcadas (trazas) y los trazadores de glucosa. A partir de las intensidades relativas de iones observadas, se procede entonces a estimar los enriquecimientos de trazadores, generalmente expresados como factores de relación de trazador con respecto a trazador (TTR - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a tracer-to tracer] -). Debido al origen natural de isótopos más pesados en los iones supervisados y controlados (por ejemplo, siendo ~1,1% de los carbonos átomos de ¹³C), las variantes isotópicas más pesadas de iones derivados de las trazas, se encontrarán presentes en el analizador de masas y pueden llevar a cabo contribuciones significativas a la señal iónica en los canales de masa designados para los trazadores de glucosa. Así, por lo tanto, previamente a calcular los valores de TTR a partir de los datos relativos de intensidad de iones, es necesario corregir los datos brutos de MS para las contribuciones de intensidad que surgen de las variantes isotópicas naturales de los iones supervisados y controlados (monitorizados). Desafortunadamente, la corrección de los datos de intensidad de iones para estas interferencias, se convierte en considerablemente más complicada cuando se usan dos o más trazadores de glucosa a la vez y cuando se produce el reciclaje de uno o más de los trazadores de glucosa adoptados durante los experimentos.

Toffolo et al., Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 21, 31- 45 (2008), describen los flujos de glucosa evaluados mediante un procedimiento de triple trazador, en el que tres trazadores estables marcados isotópicamente los cuales contienen sustituciones ¹³C ó ²H ([6, 6-²H₂] glucosa, [1-¹³C₁] glucosa, [U-¹³C₆] glucosa), se administraron a seres humanos y, las muestras de sangre, se analizaron mediante GC-Q-MS (cromatografía de gases – masas – [de sus siglas en idioma inglés] -) que tenía una baja resolución. Aquí, los enriquecimientos de trazadores se estimaron a partir de datos de intensidad de iones relativos obtenidos mediante análisis de masas de los derivados de pentaacetato de isótopos de glucosa, mediante el uso del modo de ionización química positivo y monitoreo (control) selectivo de iones a unos factores de relación de masa con respecto a carga (m / z) de 331 (M + 0 ion), 332 (M + 1 ion), 333 (M + 2 ion), y 337 (M + 6 ion), correspondiente a trazas, de moléculas de glucosa [1-¹³C₁] -, [6,6-²H₂] - y [U-¹³C₆], respectivamente. Debido al alto número de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en los iones monitoreados (C₁₄H₁₉O₉), las contribuciones de intensidad de señal en los canales M + 1 y M + 2 a partir de variantes isotópicas de iones que derivan de las moléculas trazas son de ~13,2 % y ~2,5 %, respectivamente. Así, por lo tanto, en este caso, isotopólogos de traza, se superponen de una forma significativa con ambos, los trazadores de glucosa [1-¹³C₁] -, y [6,6-²H₂]. De una forma adicional, un ~12,4 % de los iones derivados del trazador de glucosa [1-¹³C₁] aparece en el canal M + 2 y, así, por lo tanto, interfiere en gran medida con la medición de la intensidad de los iones M + 2 derivados del trazador de [6, 6-²H₂] glucosa. De una forma adicional, en este estudio anterior, el reciclaje del trazador de [U-¹³C₆] glucosa infundido, se produjo vía la gluconeogénesis, generando cantidades significativas de isotopólogos de glucosa con masas de M + 1, M + 2 y M + 3. Así, por lo tanto, no, fue necesario determinar también las contribuciones de intensidad de señal en los canales M + 1 y M + 2 que surgen de los isótopos de glucosa reciclados. Esto se realizó mediante un control adicional de los iones M + 3 y asumiendo el hecho de que, durante el reciclaje del trazador, se generaron cantidades iguales de isotopólogos de glucosa M + 1, M + 2 y M + 3. Con objeto de corregir los datos de intensidad de iones para todas las interferencias mencionadas anteriormente, arriba, los autores tuvieron que resolver un sistema bastante complicado de ecuaciones algebraicas, mediante la utilización de cálculo matricial.

La utilización de complejos procedimientos para corregir los datos de intensidad de iones, aumenta el riesgo de introducir errores sistemáticos (o imprecisiones) en las determinaciones de enriquecimiento del trazador y también genera incertezas adicionales (es decir, errores aleatorios o imprecisiones) que contribuyen a la propagación en los

resultados finales del enriquecimiento de los trazadores. De una forma general, la cantidad de estas imprecisiones adicionales, depende de la magnitud y el número de correcciones aplicadas a los datos de intensidad de iones.

Con objeto de reducir la complejidad de corregir los datos de intensidad iónica relativa en la aplicación de los procedimientos de triple trazador, los estudios anteriores han utilizado un trazador radiactivo (tal como, por ejemplo, la [6-³H₁] glucosa) en lugar de uno de los tres trazadores marcados de forma estable, el cual, no obstante, conllevaba el riesgo de exponer el sujeto del estudio a un peligro de radiación.

Basu et al., American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism 248: E55 - E69, 2003, describe la determinación de los flujos de glucosa posprandiales mediante la utilización de un procedimiento de triple trazador, en el que se procede a administrar un trazador de glucosa radiactivo ([6-³H₁]glucosa) y dos trazadores de glucosa marcados, estables, los cuales contienen sustituciones ¹C- ó ²H ([1-¹³C₁]-glucosa y [6,6-²H₂]-glucosa) a seres humanos. Aquí, el enriquecimiento del trazador radioactivo en la sangre muestreada (tomada como muestra) se evaluó mediante la utilización de un recuento de centelleo líquido y el de los trazadores marcados estables se determinó a partir de los respectivos datos de intensidad de iones obtenidos mediante análisis GC-Q-MS de los derivados de metiloxima pentatrimetilsililo de isotopólogos de glucosa, mediante la utilización del modo de impacto de electrones y la supervisión selectiva de iones a m / z de 160, 161, 319, y 321, que corresponden a trazas, trazas de moléculas de [1-¹³C₁] glucosa, y [6,6-²H₂]-glucosa, respectivamente. Debido a la alta sensibilidad analítica asociada con el recuento de centelleo líquido, trazador radioactivo se infundió a bajas velocidades y la cantidad de trazador radiactivo presente en el plasma sanguíneo estaba por debajo del nivel de detección del analizador de EM. Así, por lo tanto, no se produjo ninguna interferencia espectral entre trazador radioactivo y los trazadores de glucosa marcados, de forma estable, en el analizador de MS. Sin embargo, no obstante, en este procedimiento de triple trazador, la reducción lograda en la complejidad de la corrección de los respectivos datos de intensidad de iones tiene el precio de exponer a los sujetos del estudio a la radiación, y el peligro potencial de la exposición a la radiación, impide su uso en estudios en humanos los cuales involucren a grupos particulares de la población, tales como los niños o las mujeres embarazadas.

Una forma adicional de reducir la complejidad de corregir los respectivos datos de intensidad de iones en aplicaciones de triple trazador puede ser la consistente en el uso de trazadores de glucosa altamente sustituidos en lugar de trazadores de glucosa sustituidos individualmente (tales como, por ejemplo, [U-¹³C₆; 1,2,3,4, 5,6,6-²H₇] glucosa en lugar de [1-¹³C₁] glucosa). Así, de este modo, los iones derivados del trazador de glucosa altamente sustituido aparecen en canales de masa más alta y, así, por lo tanto, éstos pueden no interferir con la medición de la intensidad de los iones derivados de los trazadores con masas más bajas (tal como, por ejemplo, trazadores de [6,6-²H₂] glucosa). Sin embargo, no obstante, los costos significativamente más altos de los trazadores de glucosa altamente sustituidos pueden limitar su uso en estudios de trazadores triples.

Haidar et al., American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism 302: E1493 - E1501, 2012, dan a conocer un procedimiento de rastreo de trazas de isótopos triplemente estable para estimar los flujos de glucosa en todo el cuerpo, en el que, un trazador altamente sustituido, un trazador doblemente marcado con ²H y un trazador uniformemente marcado con ¹³C, de glucosa (es decir, [U-¹³C₆; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6-²H₇]-, [6,6-²H₂]- y [U-¹³C₆]- glucosa, respectivamente) se administraron a seres humanos. Aquí, los enriquecimientos de trazadores se estimaron a partir de los respectivos datos de intensidad de iones obtenidos mediante análisis GC-Q-MS (cromatografía de gases – masas, - [de sus siglas en idioma inglés] -) de los derivados de metiloxima pentatrimetilsililo de isotopólogos de glucosa mediante el uso del modo de impacto de electrones y monitoreo selectivo de iones a m / z de 319 (ion M + 0), 321 (M + 2 ion), 323 (+ 4 ion M), y 327 (M + 8 ion), correspondiente a trazas de moléculas de [6,6-²H₂]-, [U-¹³C₆]- y [U-¹³C₆; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6-²H₇]- glucosa, respectivamente. Así, de este modo, los iones derivados del trazador de glucosa altamente sustituidos aparecieron en el canal M + 8 y, así, por tanto, éstos no interfirieron con la medición de la intensidad de los iones M + 2 y m + 4 derivados de los trazadores de [6,6-²H₂]- y [U-¹³C₆]- glucosa con masas inferiores. Sin embargo, no obstante, puesto que los costos del trazador de glucosa altamente sustituido son significativamente más altos que los del trazador de glucosa marcado individualmente utilizado anteriormente, la reducción en la complejidad de corregir los respectivos datos de intensidad de iones logrados con este procedimiento debe equilibrarse con el mayor gasto del trazador de glucosa sustituido. De una forma adicional, al aplicar este procedimiento, se produjo el reciclaje del trazador de glucosa altamente sustituido, generando así, de este modo, unas cantidades significativas de isótopos de glucosa con masas de M + 5 y M + 4. Así, de este modo, tanto, los iones que surgen de estos isótopos, interfieren con las señales de intensidad en los canales de masa para el trazador de glucosa [U-¹³C₆], lo cual requiere correcciones adicionales en los datos de intensidad de MS bruta.

El documento de solicitud patente estadounidense US 2013 / 0 103 337 A1, describe un espectrómetro de masas de alta resolución y procedimientos para determinar la anatomía isotópica de moléculas orgánicas y volátiles, en donde se adquirió un espectro de masa de glucosa. Un espectrómetro de masas analizó la composición isotópica de un analito de una muestra de un paciente. La fragmentación de la glucosa, se analizó mediante la utilización de espectros de masas de baja resolución.

El documento solicitud de patente internacional WO 2007 / 031 717 A1, describe fracciones de marcadores de masa, capaces de dividirse en dos o más fragmentos, en donde, los marcadores de masa, se identifican mediante espectrometría de masas.

- 5 El documento de patente internacional WO 2007 / 106 816 A2 describe un sustrato para análisis espectrométrico de masas que incluye un monosacárido, de una forma particular D-glucosa.

10 ANDREAS BORN0 ET AL: "Glucose and glycerol concentrations and their tracer enrichment measurements using liquid chromatography tandem mass spectrometry", - Concentraciones de glucosa y glicerol y sus mediciones de enriquecimiento de trazadores mediante cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem", - JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY – (DIARIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS)., Vol. 49, n° 10, 29 de septiembre de 2014, 980 - 988 , describe la espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida para la cuantificación de glucosa, mediante el uso de patrones internos estables isotópicamente marcados, adecuados para estudios metabólicos in vivo.

15 El documento de patente internacional WO 2011 / 084 751 A1, describe procedimientos para medir la cantidad de glucagón en una muestra. De una forma más específica, se describen procedimientos de espectrometría de masas para detectar y cuantificar glucagón en una muestra.

20 El documento de patente internacional WO 2016 / 141 204 A1, describe procedimientos para determinar la cantidad de insulina en una muestra. Se proporcionan procedimientos de espectrometría de masas para detectar y cuantificar insulina y péptido C en una muestra biológica mediante la utilización de procedimientos de enriquecimiento y / o purificación junto con técnicas de espectrometría de masas en tándem o de alta resolución / alta precisión.

25 El documento de patente internacional WO 2014 / 105 858 A1, describe procedimientos para medir la cantidad de péptido C en una muestra. Los procedimientos de espectrometría de masas se describen para detectar y cuantificar el péptido C en una muestra, mediante la utilización de procedimientos de extracción en línea, conjuntamente con técnicas de espectrometría de masas en tándem o de alta resolución / alta precisión.

30 FREY ALEXANDER J ET AL: "LC-quadrupole / Orbitrap high-resolution mass spectrometry enables stable isotope-resolved simultaneous quantification and ¹³C-isotopic labeling of acyl-coenzyme A thioesters", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, - "La espectrometría de masas de alta resolución LC-cuadrupolo / Orbitrap permite la cuantificación simultánea resuelta por isótopos estables y el marcaje isotópico con ¹³C de tioésteres de acil-coenzima A", QUÍMICA ANALÍTICA Y BIOANALÍTICA, - vol. 408, no. 13, 11 de marzo de 2016, páginas 3651 – 3658, describe la espectrometría de masas de alta resolución por cromatografía líquida mediante el uso de monitoreo de reacción paralela para la cuantificación simultánea de tioésteres de acil-CoA por dilución de isótopos estables mediante el uso de un marcador de ¹³C₃¹⁵N₁.

40 La metodología de trazadores de isótopos se ha venido utilizado ampliamente para estudiar diversas funciones metabólicas en sujetos humanos. En ésta, las técnicas de trazadores dobles o triples, pueden haberse utilizado para investigar el metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo en sujetos humanos, en donde, el enriquecimiento de los trazadores de glucosa marcados de una manera estable puede haberse medido en las muestras de sangre mediante espectrometría de masas de baja resolución (LRMS). Generalmente, cuando se usa LRMS, el número de interferencias de la señal iónica puede aumentar rápidamente con el número de trazadores de glucosa marcados de forma estable presentes en la muestra. Así, por lo tanto, el número de trazadores de glucosa marcados de forma estable que pueden emplearse (cuantificarse) de una forma simultánea, puede haberse limitado a dos o tres, puesto que, en este caso, el esfuerzo computacional, así como la imprecisión estadística y la inexactitud o falta de precisión de la corrección para las interferencias de señales iónica, puede ya haberse incrementado a un extensión máxima aceptable.

50 Así, por lo tanto, puede existir una necesidad en cuanto al hecho de poder disponer de un procedimiento para determinar el enriquecimiento de por lo menos dos trazadores, de por lo menos una substancia objetivada como diana, incluida la glucosa, en el que, el procedimiento en cuestión, evite las interferencias de la señal iónica y permita determinar los enriquecimientos del trazador, con unas altas precisión y exactitud, así como también con 55 bajos costos computacionales.

60 De una forma adicional, en estudios previos en los que se aplicaban múltiples procedimientos de trazadores, las investigaciones sobre el metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo, pueden no haberse realizado con todo detalle, ya que el número de trazadores de glucosa marcados de una forma estable, empleados de una forma simultánea, puede haberse limitado a dos o tres.

65 Así, de este modo, también puede existir una necesidad en cuanto al hecho de poder disponer de un procedimiento para determinar el enriquecimiento de los trazadores de glucosa, el cual permita determinar con precisión y exactitud, más de tres trazadores de glucosa marcados de manera estable, en una muestra de sangre, facilitando, con ello, investigaciones más detalladas sobre el metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo.

De una forma adicional, para reducir el número de interferencias de la señal iónica en la aplicación de los procedimientos anteriores de triple trazador, un trazador estable marcado individualmente puede haber sido reemplazado por un trazador de glucosa estable, altamente sustituido o radiactivo el cual, no obstante, puede haber conllevado unos costos más altos o el riesgo de exponer al sujeto de estudio a un peligro de radiación, respectivamente.

Así, por lo tanto, también puede existir la necesidad en cuanto al hecho de poder disponer de un procedimiento para determinar el enriquecimiento de trazadores de por lo menos una substancia objetivizada como diana, incluida la glucosa, el cual proporcione una mayor flexibilidad para elegir el tipo y el número de trazadores de glucosa marcados de manera estable que puedan emplearse de una forma simultánea, evitando así, de este modo, el uso de costosos trazadores estables, altamente sustituidos y / o de trazadores radiactivos.

Resumen de la invención

Las formas de presentación de la presente invención, reducen la complejidad en la conversión de la espectrometría de masas de intensidades de iones relativas medidas en enriquecimientos de trazadores, reduciendo así, de este modo, el esfuerzo computacional y mejorando la precisión y exactitud en la determinación de múltiples enriquecimientos de trazadores. De una forma adicional, las formas de presentación de la presente invención, proporcionan una mayor flexibilidad para elegir el tipo y el número de trazadores marcados de una forma estable que puedan emplearse de una forma simultánea, facilitando así, de este modo, investigaciones más detalladas sobre el metabolismo de todo el cuerpo y evitando el uso de trazadores radiactivos y / o de costosos trazadores estables altamente sustituidos.

En concordancia con una forma de presentación, se proporciona un procedimiento para determinar, en una muestra, los enriquecimientos de un primer trazador y por lo menos un segundo trazador, marcado de una forma estable, de por lo menos una sustancia objetivizada como diana, que incluye glucosa, teniendo, el primer trazador, y el segundo trazador, la misma estructura química, o similar, como sustancia objetivizada como diana, comprendiendo, el procedimiento: ionizar el primer trazador, el segundo trazador y la sustancia objetivizada como diana, de la muestra, de una forma particular, mediante ionización por electropulverización; medir las intensidades de iones derivados de la sustancia objetivizada como diana, de iones derivados del primer trazador y de iones derivados del segundo trazador, mediante la utilización de un analizador de masas de alta resolución, de una forma particular un analizador de masas Orbitrap; calcular un enriquecimiento del primer trazador a partir de un primer factor de relación de la intensidad de los iones derivados del primer trazador con respecto a la intensidad de los iones derivados de la sustancia objetivizada como diana, empleando una primera curva de calibración que es independiente de los niveles de enriquecimiento de cada uno de los por lo menos un segundo trazador; en el que el analizador de masas de alta resolución, funciona para resolver un pico de iones derivado de un trazador y que tiene una anchura $\Delta(m/z)$ a la mitad de la altura máxima del pico igual o menor que 1×10^{-2} , de una forma particular más pequeño que 5×10^{-3} , de una forma más particular, más pequeño que 3×10^{-3} .

Los enriquecimientos del primer y el por lo menos un segundo trazador marcado de una forma estable pueden referirse a, o definir, de una forma particular un factor de relación respectivo entre la cantidad o concentración o número de iones del trazador respectivo y el de la molécula objetivizada como diana.

El procedimiento puede no estar completamente relacionado con un procedimiento terapéutico o diagnóstico. En algunas formas de presentación, la muestra puede no originarse de ningún organismo vivo.

En otras formas de presentación, el procedimiento puede emplearse para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, de una forma particular, que incluye glucosa. En estas formas de presentación, el trazador y el por lo menos un trazador pueden haberse administrado a un organismo vivo en formas iguales o diferentes, tal como suministrando por lo menos uno de los trazadores a un torrente sanguíneo del organismo vivo y suministrando el por lo menos otro trazador al tracto digestivo del organismo vivo. La muestra puede originarse, en estas formas de presentación, a partir de sangre extraída del organismo vivo en diferentes momentos en el tiempo después de la administración.

El primer y el por lo menos un segundo trazador marcado de una forma estable de una sustancia objetivizada como diana pueden haberse sintetizado mediante el uso de procedimientos de sustitución isotópica o biosintética. En la sustitución isotópica, uno o más átomos en la molécula original (o sustancia objetivizada como diana) se sustituyen con un isótopo que no es el isótopo natural más abundante de ese átomo. Así, por lo tanto, el primer y el segundo trazador marcados de una forma estable, pueden contener cada uno de ellos exactamente una sustitución isotópica o pueden comprender más de una, tal como, por ejemplo dos, tres, cuatro o incluso más sustituciones isotópicas para el mismo o diferentes tipos de átomos. De una forma preferible, cada uno, el primer y el segundo trazador marcado establemente contienen sólo una sustitución isotópica (exactamente una vez) para un átomo particular. El primer trazador, puede tener, por ejemplo, una (o dos) sustituciones ^{13}C y, el segundo trazador pueden tener, por ejemplo, una (o dos) sustituciones ^2H . De una forma alternativa, el primer trazador puede, por ejemplo, incorporar (exactamente) una sustitución ^2H y el segundo trazador puede, por ejemplo, incorporar (exactamente) dos sustituciones ^2H . De una forma alternativa, el primer trazador puede tener, por ejemplo, (exactamente)

una sustitución ^{13}C y ninguna sustitución ^2H , y el segundo trazador puede tener una sustitución ^2H pero no una sustitución ^{13}C . Otras combinaciones, son también posibles.

5 Como contraste a la sustitución isotópica, el procedimiento de sustitución bioisotérica para la síntesis del primer y por lo menos un segundo trazador marcado estable puede implicar el reemplazo de uno o de más átomos en la
 10 substancia objetivizada como diana por uno o más átomos ajenos foráneos o porciones foráneas o alienas (tal como, por ejemplo, H reemplazado por F; OH reemplazado por H; H reemplazado por un grupo metilo; H reemplazado por un grupo fluoroalquilo). Los ejemplos para un primer y un segundo trazador marcado de una forma estable que incorpora una sustitución bioisotérica pueden ser los consistentes en la 3-O-metil-glucosa, la 2-desoxi-
 15 glucosa y la 2-desoxi-2-fluoro-glucosa. Así, por lo tanto, en el caso de la sustitución bioisotérica, la estructura química resultante y la composición elemental del trazador sintetizado pueden ser similares, pero no exactamente las mismas, que las de la substancia objetivizada como diana. Así, por lo tanto, el primer y el por lo menos un
 20 trazador marcado de una forma estable, sintetizado mediante el uso del procedimiento de sustitución bioisotérica, puede no exhibir el mismo comportamiento, sino únicamente un comportamiento similar al de la substancia objetivizada como diana. De una forma adicional, la especificación general de que los trazadores se encuentran "marcados de una forma estable" puede significar el hecho de que el marcador introducido en los trazadores no se
 25 descompone por una descomposición radiactiva sino que éste puede ser estable con el tiempo. Así, por lo tanto, ninguno de los trazadores marcados de una forma estable emite radiación.

30 De una forma particular, el por lo menos un trazador marcado de una forma estable, puede comprender dos trazadores marcados de una forma estable, de tal modo que, en total (exactamente o por lo menos) se usen tres trazadores marcados de una forma estable, en el procedimiento en concordancia con una forma de presentación de la presente invención. La totalidad de los trazadores, pueden tener la misma composición elemental o similar, que correspondiente a la substancia objetivizada como diana y tener la misma estructura química o similar, que la
 35 substancia objetivizada como diana, de tal forma que, la totalidad de los trazadores, puedan comportarse, biológicamente, de una forma idéntica o similar al comportamiento de la substancia objetivizada como diana.

40 La ionización de los trazadores y la substancia objetivizada como diana, puede comprender la formación de iones a partir del trazador y de las moléculas objetivizadas como diana o derivados de los mismos, mediante diversos mecanismos, incluida la adición de uno o más electrones o protones a las moléculas o la eliminación de uno o más electrones o protones de las moléculas. Así, de este modo, la substancia objetivizada como diana y las moléculas trazadoras o sus derivados, se transforman en iones cargados negativamente o positivamente. De una forma particular, los iones negativos con carga simple pueden formarse a partir de moléculas de uno cualquiera de entre el
 45 primer trazador, el segundo trazador y la substancia objetivizada como diana, si sólo se elimina un protón de cada una de las moléculas. Antes de la ionización, el primer trazador, el segundo trazador y la substancia objetivizada como diana, pueden haberse derivatizado, según necesidades. Los iones derivados de la substancia objetivizada como diana pueden comprender iones obtenidos ionizando la substancia objetivizada como diana en sí misma, la substancia objetivizada como diana derivatizada o uno de los fragmentos en los que se había dividido la substancia objetivizada como diana o la substancia objetivizada como diana derivatizada. De una forma similar, los iones
 50 derivados del primer trazador pueden comprender iones formados ionizando el primer trazador, un derivatizado del primer trazador o uno de los fragmentos en los que se había dividido el primer trazador o la derivatizado del trazador. Lo mismo se aplica a los iones derivados del segundo trazador. La ionización de los trazadores y de las sustancias objetivizadas como diana, o bien puede llevarse a cabo mediante una variedad de procedimientos, los cuales incluyen ionización de electrones, la ionización química, la fotoionización, el bombardeo rápido de iones, el
 55 bombardeo rápido de átomos, la desorción por láser, desorción / ionización láser asistida por matriz, la termoproyección pulverizada, la evaporación de iones a la presión atmosférica, la ionización química a la presión atmosférica y la ionización por electroproyección pulverizada (ES). De una forma particular, la técnica de ionización ES se puede usar para formar iones negativos con carga simple a partir del trazador neutro y las moléculas de la substancia objetivizada como diana, al eliminar exactamente un protón de cada una de las moléculas.

60 Después de haber procedido a ionizar el primer trazador, el segundo trazador y la substancia objetivizada como diana, los iones resultantes, se transfieren al analizador de masas de alta resolución en donde éstos se separan en concordancia con sus valores de masa a carga (m/z). El primer factor de relación de la intensidad de iones (o la primera intensidad de iones relativa) puede obtenerse dividiendo la intensidad observada de los iones derivados del primer trazador por la intensidad observada de los iones derivados de la substancia objetivizada como diana. La primera curva de calibración puede haber sido construida previamente mediante el uso de un conjunto de muestras de calibración con niveles de enriquecimiento conocidos del primer trazador.

65 Cuando la primera curva de calibración es independiente de los niveles de enriquecimiento de cada uno de los por lo menos un segundo trazador, esto significa que la primera curva de calibración no cambia cuando se cambia por lo menos un nivel de enriquecimiento del por lo menos un segundo trazador. La determinación del nivel de enriquecimiento del primer trazador, por lo tanto, puede no depender de ningún nivel de enriquecimiento del por lo menos un segundo trazador presente en la muestra. El primer trazador, puede asociarse inequívocamente con un pico de iones particular en un espectro de masas que no puede verse afectado por ningún nivel de enriquecimiento de ninguno de los por lo menos un segundo trazador. De una forma particular, el primer trazador y el por lo menos un segundo trazador (o de una forma particular una combinación de tres trazadores marcados de forma estable)

pueden seleccionarse de tal forma que, a cada uno de los trazadores, se le asocie un pico de iones particular, en el espectro de masas, en donde, los picos de iones, no se superpongan o solapen.

5 En los procedimientos convencionales, los niveles de enriquecimiento de un trazador, pueden haber dado como resultado un pico de iones que puede haberse solapado con otro pico de iones asociado con otro trazador de presentación. Así, por lo tanto, en estos procedimientos convencionales, un nivel de enriquecimiento de un trazador no puede determinarse a partir de un pico de iones asociado sin tener en cuenta los niveles de enriquecimiento del otro trazador cuyo pico de iones en el espectro de masas se superponga con el pico de iones del trazador considerado. Así, por lo tanto, en los procedimientos convencionales, también una curva de calibración de un
10 trazador particular depende de los niveles de enriquecimiento de otros trazadores que tienen picos de iones superpuestos con el trazador considerado.

El analizador de masas de alta resolución, puede funcionar a una potencia de resolución de masas (o resolución de masas) lo suficientemente alta como para resolver un pico de iones derivado de un trazador y que tenga una anchura $\Delta (m / z)$ a la mitad de la altura máxima del pico, menor que 1×10^{-2} , de una forma particular, menor que 5×10^{-3} o incluso menor que 3×10^{-3} . Este poder de resolución de masas (o resolución de masas) puede aplicarse en un rango de m / z de comprendido entre unos valores que van de 179 a 185 pero que puede extenderse aún más, tal como, por ejemplo, en un rango de m / z comprendido dentro de unos valores que van de 100 a 300, ó incluso en un rango comprendido dentro de unos valores que van de 50 a 500. La resolución de masa requerida, puede lograrse mediante diversos tipos de analizadores de masa, incluidos los espectrómetros de masas de ciclotrón iónico de transformación de Fourier, de tiempo de vuelo y Orbitrap. El poder de resolución de masa (o resolución de masa), R , puede relacionarse con un único pico bien resuelto de un ion de interés y puede definirse como $R = (m / z) / \Delta (m / z)$, en donde, (m / z) es el valor de la masa a carga del ion de interés y $\Delta (m / z)$ es la anchura de este pico de iones a la mitad de la altura máxima del pico. Procediendo a seleccionar de una forma adecuada el primer, el segundo (y de una forma particular también un tercer) trazador marcado de una forma estable, los cuales se pueden resolver con el analizador de masas de alta resolución, se puede proporcionar un procedimiento simple para determinar los enriquecimientos de los trazadores, al mismo tiempo que se reduce la complejidad en la conversión de los factores de relación de la intensidad de iones medidas por espectrometría de masas a enriquecimientos de los trazadores y, de una forma particular, también se reducen los costos computacionales y se mejora la precisión y exactitud de la determinación del enriquecimiento. De una forma adicional, se puede proporcionar una mayor flexibilidad para elegir el tipo y el número de trazadores marcados de una forma estable que pueden emplearse de una forma simultánea, facilitando así, de este modo, investigaciones más detalladas sobre el metabolismo de todo el cuerpo y evitando el uso de trazadores radiactivos y de costosos trazadores altamente sustituidos de una forma estable.

35 La totalidad de los trazadores marcados de una forma estable, pueden tener, de una forma particular, la misma masa nominal. La masa nominal puede definirse como la masa molecular redondeada a la precisión de 1 Da. Así, por ejemplo, la masa nominal de la forma ionizada, desprotonada, de glucosa, es de 179 Da. Así, por ejemplo, la masa nominal de la forma ionizada, desprotonada, del primer trazador y del segundo trazador de glucosa, puede ser de 180 Da ó de 181 Da, en formas ejemplares de presentación.

40 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, calcular un nivel de enriquecimiento del segundo trazador a partir de un segundo factor de relación de la intensidad de los iones derivados del trazador a la intensidad de los iones derivados de la substancia objetivizada como diana, empleando una segunda curva de calibración, siendo independiente del nivel de enriquecimiento del primer trazador.
45

Así, por lo tanto, la determinación del nivel de enriquecimiento del segundo trazador también puede ser independiente del nivel de enriquecimiento del primer trazador y, de una forma adicional, para la construcción (previa) de la segunda curva de calibración, pudiendo no ser necesario el conocimiento de cualquier nivel de enriquecimiento del primer trazador presente en la muestra de calibración. De una forma general, los trazadores pueden seleccionarse de tal forma que para la construcción (previa) de una curva de calibración para un trazador particular, el conocimiento de cualquier nivel de enriquecimiento de cualquier otro trazador presente en la muestra de calibración no sea necesario, simplificando así, de este modo, la construcción de las curvas de calibración.

55 El enriquecimiento del primer trazador y del segundo trazador puede determinarse de una forma independiente, el uno con respecto al otro, ya que el pico de iones en el espectro de masas asociado con el primer trazador y el pico de iones asociado con el segundo trazador se pueden distinguir completamente entre sí mediante la utilización de un analizador de masas de alta resolución. Así, de este modo, no se deben aplicar correcciones por interferencias a las intensidades de los picos de iones, lo cual reduce el esfuerzo computacional y la mejora de la precisión y de la exactitud en la determinación de los enriquecimientos de trazadores.
60

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, el poder de resolución de masa (o resolución de masa), definido a $180 m / z$, es igual o mayor que 75 000 cuando un trazador ^{13}C -, ^2H - y / ó ^{18}O - de glucosa, marcado, se encuentra presente en la muestra, y es igual o mayor que 200 000 cuando un trazador marcado de glucosa 17 también se encuentra presente en la muestra. Si el analizador de masas de alta resolución funciona con un poder de resolución de masa de, por ejemplo, 180 000 a un valor de masa a carga (m / z) de 180,

un pico único compuesto de iones a 180 m/z y que tiene una anchura $\Delta (\text{m/z})$ de 1×10^{-3} a la mitad de la altura máxima del pico, puede resolverse bien, en los espectros de masas adquiridos. El poder de resolución, puede incluso ser mayor, de una forma particular, de 200 000 ó entre 200 000 y 250 000 cuando uno de los primeros o segundos trazadores contiene una ^{17}O -sustitución. Así, de este modo, se puede asegurar el hecho de que todos los picos de iones que surgen de los trazadores marcados de una forma estable dentro de la muestra, pueden ser completamente distinguibles entre sí.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, una separación o por lo menos una separación parcial de sustancias no deseadas, las cuales, de una forma particular, tienen una misma composición elemental que la de la sustancia objetivizada como diana, pero una estructura química diferente, contenida en una muestra cruda, mediante cromatografía, de una forma particular una cromatografía líquida, para obtener la muestra. Así, por ejemplo, de una forma adicional a la glucosa como sustancia objetivizada como diana, la muestra cruda también puede contener sustancias no deseadas, tales como la fructosa y / o la manosa y / o la galactosa, que pueden tener una composición elemental igual o similar a la de la glucosa pero con una estructura química diferente. Así, por lo tanto, las sustancias no deseadas pueden comprender uno o más sacáridos, los cuales, a menos que se separen, interferirían con la determinación de los enriquecimientos de los trazadores de glucosa. Procediendo a separar o separar parcialmente las sustancias no deseada, el procedimiento se puede mejorar de una forma adicional.

El sistema cromatográfico puede comprender, por ejemplo, una columna de cromatografía líquida Ultra Performance (UPLC – [de sus siglas, en idioma inglés] -) y la muestra se puede fraccionar mediante el uso de una elución isocrática con una mezcla de acetonitrilo - agua la cual contenga una solución de hidróxido de amonio como aditivo. El sistema de cromatografía líquida puede conectarse a un espectrómetro de masas Orbitrap a través de una interfaz de ionización ES, el cual funciona, de una forma particular, en modo de ionización negativa.

La ionización por ES (electrospray ó proyección pulverizada) se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un voltaje de fuente de 3 a 4 kV y a una temperatura del calentador de fuente comprendida dentro de un rango que va de 200 a 300 °C, de una forma particular, a una temperatura de alrededor de 250 °C. El analizador de masas Orbitrap, puede funcionar, por ejemplo, a una resolución comprendida dentro de un rango situado entre 20 000 y 250 000 con una ventana de exploración de m/z de 100 - 350 y estableciendo el control automático de ganancia en un valor de 10^5 iones, para entrar en el analizador de masas.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, un primer valor de masa de la masa del primer trazador, difiere de un segundo valor de masa de la masa del trazador entre 1 mDa y 50 mDa, de una forma particular entre 2 mDa y 10 mD, de una forma más particular entre 3 mDa y 6 mDa. Aunque la primera masa y la segunda masa se desvían solo en una cantidad muy pequeña de, por ejemplo, entre 3 mDa y 6 mDa, los picos iónicos correspondientes en un espectro de masas, se pueden resolver mediante la utilización de la espectrometría de masas de alta resolución. Así, por lo tanto, ahora también son aplicables (combinaciones de) trazadores, que convencionalmente no podrían usarse, ofreciendo así, de este modo, una mayor flexibilidad para elegir el tipo y el número de trazadores marcados de una forma estable, los cuales pueden aplicarse de una forma simultánea. Esto a su vez, puede facilitar unas investigaciones más detalladas en el metabolismo total de cuerpo, y evitar el uso de trazadores radioactivos y / o de los costosos trazadores estables altamente sustituidos.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, la primera curva de calibración es representable mediante una primera función matemática la cual relaciona los niveles de enriquecimiento (conocidos) del primer trazador con los valores de los primeros factores de relación de intensidades de iones, obtenidos mediante el análisis de las muestras de calibración. Debido a su independencia de los niveles de enriquecimiento del segundo trazador, la primera función matemática puede ser univariada y puede comprender uno o más términos lineales y / o no lineales con parámetros ajustables. Para obtener la primera función matemática, los parámetros de los términos lineales y / o no lineales pueden ajustarse para adaptarse de una forma íntima a los primeros datos de intensidad de iones relativos obtenidos del análisis de las muestras de calibración. El ajuste de los parámetros se puede realizar mediante el uso de varios procedimientos de regresión que incluyen técnicas de mínimos cuadrados lineales y / o no lineales. El ajuste obtenido de la primera función matemática a los datos de calibración obtenidos puede representarse en un gráfico, mediante la utilización de una coordenada para los valores de enriquecimiento y la otra para los correspondientes valores de los factores de relación de intensidad de iones.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, la primera curva de calibración es completamente independiente del nivel de enriquecimiento de uno cualquiera del por lo menos un segundo trazador, en donde, el primer trazador, contiene una sustitución ^{13}C y el por lo menos un segundo trazador, contiene por lo menos una de entre: una sustitución ^2H y / ó ^{17}O y / ó ^{18}O ó en donde, el primer trazador, contiene una sustitución ^2H y el por lo menos un segundo trazador, contiene por lo menos una de entre: una sustitución ^{13}C y / ó ^{17}O - y / ó ^{18}O -sustitución ó en donde el primer trazador, contiene una sustitución ^{17}O y el por lo menos un segundo trazador contiene por lo menos una de entre: una sustitución ^{13}C - y / ó ^2H - y / ó ^{18}O , o en donde el primer trazador contiene una sustitución ^{18}O y el por lo menos un segundo trazador contiene por lo menos una de entre : una sustitución ^{13}C - y / ó ^2H - y / ó ^{17}O , en donde el primer trazador y el segundo trazador tienen, de una forma particular, la misma masa nominal. Así, por lo tanto, para estas combinaciones del primer trazador y el segundo trazador, la primera curva de

calibración puede ser independiente de los niveles de enriquecimiento del segundo trazador. Así, por lo tanto, en la representación matemática de la primera curva de calibración, no es necesario tener en cuenta los niveles de enriquecimiento y los correspondientes factores de relación de intensidad de iones del segundo trazador.

5 Completamente independiente, puede significar el hecho de que, debido a la resolución elegida del espectrómetro de masas y los tipos de trazadores elegidos, la primera curva de calibración y los parámetros de su representación matemática son independientes de los niveles de enriquecimiento de cualquiera de los por lo menos un segundo trazador.

10 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, la primera curva de calibración es prácticamente independiente del enriquecimiento de cualesquiera de por lo menos un segundo trazador, en donde, una diferencia de masa nominal entre el primer trazador y el segundo trazador es de por lo menos 1 Da, en donde, el primer trazador contiene una sustitución ^2H y el por lo menos un segundo trazador contiene otra sustitución de ^2H , ó en donde, el primer trazador contiene una sustitución ^{17}O y el por lo menos un segundo trazador contiene otra sustitución ^{17}O , ó en donde, el primer trazador contiene una sustitución ^{18}O y el por lo menos un segundo trazador contiene otra sustitución ^{18}O . Así, por lo tanto, para estas combinaciones del primer trazador y el segundo trazador, la primera curva de calibración puede ser prácticamente independiente de los niveles de enriquecimiento del segundo trazador y, por lo tanto, en su representación matemática, los niveles de enriquecimiento y las proporciones de intensidad de los correspondientes iones del segundo trazador. No es necesario tenerla en cuenta.

20 Prácticamente independiente, puede significar el hecho de que, debido a la aparición natural de isótopos más pesados en los iones que surgen del segundo trazador elegido, la primera curva de calibración sólo puede depender de un pequeño porcentaje, tal como un porcentaje comprendido entre un 0 y un 1 % del por lo menos un segundo trazador. Así, por ejemplo, si el primer y el segundo trazador se eligen para ser una molécula doble y doblemente marcada con ^2H , respectivamente, entonces, la probabilidad de la ocurrencia natural de un isótopo ^2H adicional, en el segundo trazador marcado con ^2H , puede ser muy bajo (tal como, por ejemplo, de un 0,1 %). Así, por lo tanto, los iones que surgen de este segundo trazador pueden hacer una contribución insignificante a la señal de iones en el canal de masa designado para el primer trazador. Por lo tanto, en esta combinación de primer y segundo trazador, la primera curva de calibración y los parámetros de su representación matemática, pueden considerarse como siendo prácticamente independientes de los niveles de enriquecimiento del segundo trazador.

25 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, el primer trazador comprende una primera sustitución isotópica que incluye una de una sustitución ^2H , ^{17}O , ^{18}O , ^{13}C , en la que se obtiene una primera función matemática que representa la primera curva de calibración mediante los siguientes pasos, si no hay otro trazador que contenga la primera sustitución isotópica en la muestra, o si la diferencia de masa nominal entre los trazadores que contienen la primera sustitución isotópica es de por lo menos 1 Da ó 2 Da, si la primera sustitución isotópica es de una sustitución ^{13}C : analizar las de muestras de calibración que contienen los primeros niveles de enriquecimiento conocidos del primer trazador mediante la utilización del analizador de masas de alta resolución para obtener los primeros factores de relación de calibración; ajustar una función matemática a los primeros niveles de enriquecimiento conocidos y los primeros factores de relaciones de calibración asociadas, en donde, la función matemática, es lineal, o ésta tiene la siguiente forma:

$$45 \quad \text{TTR} = a + b \text{RI} + c \text{d}^{\text{RI}}$$

en donde, e a, b, c y d, son parámetros de ajuste, TTR es el enriquecimiento del trazador (expresado como factor de relación trazador - traza), y RI es el factor de relación de intensidad de iones o la intensidad de iones relativa (calculada como la intensidad de los iones derivados del trazador dividido por la intensidad de los iones derivados de la traza, es decir, la substancia objetivizada como diana).

50 Para la calibración, se pueden usar varios patrones estándar de calibración, los cuales varían, por ejemplo, en los niveles de enriquecimiento del trazador dentro de un rango que va de un 0 % a un 15 %. Para preparar estos patrones estándar, se pueden pesar las cantidades apropiadas de los trazadores elegidos en un vial. A esto se le puede añadir un alícuoto de un lote de plasma sanguíneo, para obtener una solución madre de plasma con un valor de TTR de, por ejemplo, un 50 %. Los patrones estándar de calibración que cubren los valores de TTR de, por ejemplo, un 0 a un 15 %, se pueden preparar procediendo a realizar diluciones volumétricas de la solución madre de plasma mediante el uso del lote de plasma sanguíneo. Posteriormente, los patrones estándar de calibración pueden dividirse en alícuotos en volúmenes iguales, y tres alícuotos de cada patrón estándar pueden purificarse y analizarse. Para calcular la cantidad de trazadores añadidos al vial utilizado para preparar la solución madre de plasma, la concentración de la substancia objetivizada como diana en el plasma sanguíneo agrupado puede medirse previamente. En caso de que la substancia objetivizada como diana sea glucosa, las concentraciones de glucosa pueden medirse mediante el uso de un analizador basado en glucosa-oxidasa calibrado con una solución estándar particular de glucosa. Después del análisis de espectrometría de masas de los patrones de calibración, los valores

de intensidad de iones relativos obtenidos se pueden representar mediante gráficos, comparándolos con los niveles de enriquecimiento de trazadores conocidos.

5 En general, se puede observar una relación lineal entre los niveles de enriquecimiento (conocidos) y las intensidades de iones relativas medidas para el rango de enriquecimientos de trazadores cubiertos por los patrones estándar de calibración. No obstante, a reducidos niveles de enriquecimiento (tales como, por ejemplo, por debajo de un nivel del 1%) de algunos trazadores, puede producirse una desviación de la linealidad. Para tener en cuenta esta desviación, se puede utilizar una función no lineal para ajustar los datos de calibración. Se descubrió el hecho de que la función lineal-exponencial definida anteriormente, que combina una función lineal con una función de disminución exponencial, es adecuada para ajustar los datos de calibración que exhiben no linealidad a reducidos o bajos niveles de enriquecimiento de un trazador.

15 Para ajustar la función exponencial lineal a los datos de calibración de un trazador el cual exhibe una no linealidad a unos reducidos niveles de enriquecimiento, los valores de enriquecimiento (conocidos) del trazador en las muestras de calibración (valores de TTR) pueden retroceder en los valores de intensidad de iones relativos medidos (Valores de RI) procediendo a ajustar los parámetros de ajuste a, b, c y d para minimizar la suma de las diferencias cuadradas ponderadas entre los valores de TTR conocidos del trazador, en las muestras de calibración y los valores calculados de TTR calculados. La suma (S) en cuestión, puede expresarse como:

20
$$S = \sum w_i (ttr_i - TTR_i)^2, i = 1, \dots, N$$

en donde w_i es el factor de ponderación y el subíndice i indica el número de la muestra de calibración. Para tener en cuenta las incertidumbres de medición en RI, en dicho procedimiento de regresión, se puede proceder a aplicar una ponderación de varianza efectiva inversa en la cual, el cálculo de w_i se basa en una transformación de la varianza determinada experimentalmente en RI_i (σ_{RIi}^2) en una varianza efectiva en TTR_i (σ_{EVI}^2). Para calcular el valor de w_i , se puede utilizar la siguiente fórmula, derivada de la aplicación de las reglas de propagación de errores a la función exponencial lineal:

30
$$w_i = 1/\sigma_{EVI}^2 = 1/[(b + c d^{RIi} \ln(d))^2 \sigma_{RIi}^2]$$

Se puede utilizar una técnica de mínimos cuadrados no lineales, tal como la consistente en el procedimiento de Levenberg - Marquardt, el cual incorpora una ponderación de varianza efectiva inversa para llevar a cabo el procedimiento de regresión descrito.

35 Mediante el uso de la función exponencial lineal, se obtuvo una descripción apropiada de los datos de calibración de trazadores los cuales exhiben no linealidad a bajos o reducidos niveles de enriquecimiento y, así, por lo tanto, fue posible una determinación fiable de los niveles de enriquecimiento del trazador en muestras de plasma sanguíneo con enriquecimientos desconocidos. Para describir los datos de calibración de trazadores que exhiben linealidad en todo el rango de enriquecimiento, se puede utilizar una función lineal (es decir, los términos que contienen intercepción, a, y pendiente, b, en la función exponencial lineal). De una forma adicional, también se puede utilizar una función lineal, para describir únicamente la parte de los puntos de datos de calibración la cual exhibe linealidad. En este caso, los puntos de datos de calibración que muestran una falta de linealidad, pueden excluirse y, la función lineal, puede ajustarse únicamente a los puntos de datos restantes.

45 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, el procedimiento comprende, de una forma adicional, el resolver, en un espectro de masas, un primer pico de iones causado por el primer trazador, a partir de un segundo pico de iones causado por el segundo trazador; derivando el nivel de enriquecimiento del primer trazador basado en el primer pico de iones y el pico de iones causado por la sustancia objetivizada como diana; derivando el nivel de enriquecimiento de la segunda molécula trazadora basado en el segundo pico de iones y el pico de iones causado por la sustancia objetivizada como diana.

El primer pico de iones puede no solaparse con el segundo pico de iones, por ejemplo, en el sentido de que, un valle entre el primer pico y el segundo pico es inferior a un 10 % del máximo del primer pico y el segundo pico.

55 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, la sustancia objetivizada como diana, incluye por lo menos una molécula objetivizada como diana adicional, comprendiendo, el procedimiento en cuestión: ionizar un primer trazador adicional de la molécula objetivizada como diana adicional e ionizar la molécula objetivizada como diana adicional de la muestra; medir las intensidades de iones derivados de la molécula objetivizada como diana adicional y de los iones derivados del primer trazador adicional, mediante la utilización del analizador de masas de alta resolución; calcular un nivel de enriquecimiento del primer trazador adicional, a partir de un primer factor de relación adicional de la intensidad de los iones derivados del primer trazador adicional, a la intensidad de los iones derivados de la molécula objetivizada como diana adicional, empleando una primera curva de calibración adicional que es independiente de un nivel de enriquecimiento de cualquier otro trazador de la molécula objetivizada como diana adicional.

65

La por lo menos una molécula objetivizada como diana adicional, puede comprender una o más moléculas objetivizadas como diana adicionales. De una forma adicional, puede encontrarse presente por lo menos un trazador adicional, en la muestra y, los niveles de enriquecimiento de todos los tres de la sustancia objetivizada como diana, así como de todos los trazadores adicionales de las moléculas objetivizadas como diana adicionales se pueden
5 determinar mediante la utilización de la espectrometría de masas de alta resolución. De una forma particular, el primer trazador, el por lo menos un segundo trazador, el primer trazador adicional y el por lo menos un segundo trazador adicional, pueden seleccionarse de tal forma que, sus picos de iones resultantes, en el espectro de masas, no se solapen esencialmente. Así, de este modo, se puede determinar, en una muestra, el nivel de enriquecimiento de los trazadores de múltiples sustancias objetivizadas como diana diferentes.

10 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, la sustancia objetivizada como diana y / o la molécula objetivizada como diana adicional, comprende, o se trata de uno de entre: un hidrato de carbono, de una forma particular, un monosacárido, un disacárido, un oligosacárido, un polisacárido, de una forma particular fructosa, manosa, galactosa, o almidón; un derivado de hidrato de carbono, de una forma particular metil- glucosa,
15 desoxi- glucosa, desoxifluoroglucosa o monoacetona glucosa; un alcohol de azúcar, de una forma particular manitol, sorbitol o glicerol; un cuerpo de cetona, de una forma particular beta-hidroxibutirato; un lípido, de una forma particular un ácido graso, un glicerolípido, un glicerofosfolípido, un esfingolípido, un lípido de esteroil; un alcohol; agua. Así, de este modo, el enriquecimiento de trazadores de una gran variedad de sustancias objetivizadas como diana, o moléculas objetivizadas como diana adicionales, se puede determinar, en una muestra, mediante el uso de
20 la presente invención.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, se procede a añadir un trazador de la sustancia objetivizada como diana, de una forma particular, glucosa, y / o un trazador de la molécula objetivizada como diana adicional, como patrón estándar interno a la muestra y, tomando el nivel de enriquecimiento obtenido del
25 trazador y la cantidad (conocida) de trazador, añadida, puede entonces calcularse la concentración de la sustancia objetivizada como diana, de una forma particular la glucosa no marcada y / o la concentración de la molécula objetivizada como diana adicional en la muestra. Así, de este modo, de una forma adicional a la determinación de enriquecimiento de múltiples trazadores de la sustancia objetivizada como diana y / o la molécula objetivizada como diana adicional, se puede determinar, en una muestra, la concentración de la sustancia objetivizada como
30 diana y / o la molécula objetivizada como diana adicional, mediante el uso de la presente invención.

En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, un determinado número de iones derivados de los trazadores y que entran en el analizador de masas se mantienen por debajo del umbral de coalescencia aumentando / ajustando la ventana de exploración de masas a un rango m/z de 179 a 186 ó de 100 a
35 350, y / o bajando el control automático de ganancia a un valor comprendido entre 10^4 y 10^6 ó entre 10^3 y 10^4 .

Así, de este modo, las nubes de iones que surgen de los trazadores con valores cercanos de m/z , pueden no acoplarse (o haber experimentado una coalescencia), cuando éstas se encuentran presentes de una forma simultánea en el analizador de masas de alta resolución. De una forma particular, se puede garantizar el hecho de
40 que sólo se encuentre presente un número total definido de iones en un rango de masa objetivizado como diana, en el analizador de masas, en un momento dado, en donde, este número total de iones, se selecciona de tal forma que, el número específico de iones en las nubes derivado de trazadores con valores m/z cercanos se mantenga por debajo de su umbral de coalescencia. El número total de iones que entran en el analizador de masas, puede controlarse ajustando la ventana de exploración de masas y / o el control automático de ganancia del analizador de
45 masas. Así, por ejemplo, con objeto de evitar la coalescencia, la anchura de la ventana de exploración de masas, puede aumentarse y / o el control automático de ganancia puede establecerse a valores más bajos. La coalescencia de las nubes de iones, daría como resultado la generación de un único pico de iones, en lugar de múltiples picos. Así, por lo tanto, las propiedades de alta resolución del analizador de masas, pueden perderse, cuando se produce la coalescencia.

50 En concordancia con una forma de presentación de la presente invención, una intensidad del pico de iones derivado de la sustancia objetivizada como diana, se mantiene por encima de un nivel umbral de $1,0 \times 10^7$ ó de $1,0 \times 10^8$ unidades arbitrarias, aumentando la cantidad de muestra inyectada en el cromatógrafo para un valor comprendido entre $1 \mu\text{l}$ y $3 \mu\text{l}$ ó entre $3 \mu\text{l}$ y $10 \mu\text{l}$, y / o disminuyendo la ventana de exploración de masas a un rango
55 de m/z de 100 a 350 ó de 179 a 186, y / o aumentando el control automático de ganancia a un valor comprendido entre 10^3 y 10^4 ó entre 10^4 y 10^6 .

Así, de este modo, se puede conseguir una alta precisión en la medición de la intensidad iónica relativa para un trazador de la sustancia objetivizada como diana. De una forma distinta, pueden obtenerse mediciones erróneas de
60 la intensidad relativa de iones para trazadores de la sustancia objetivizada como diana cuando la intensidad del pico de iones derivado de la sustancia objetivizada como diana cae por debajo de un cierto nivel umbral. Este nivel de umbral puede estar alrededor de $1,0 \times 10^7$, cuando se consideran las alturas máximas o alrededor de $1,0 \times 10^8$ unidades arbitrarias, cuando se consideran las intensidades de pico de iones integradas. De una forma particular, cuanto menor sea la intensidad pico de iones integrados de una sustancia objetivizada como diana por debajo del
65 nivel umbral, mayores serán los errores en las mediciones de intensidad de iones relativa. No obstante, se puede obtener una alta precisión en la medición de la intensidad, relativa, de iones, para un trazador, tan pronto como las

intensidades del pico de iones derivadas de la sustancia objetivizada como diana sean más altas que el valor umbral. La intensidad del pico de iones derivado de la sustancia objetivizada como diana, puede controlarse ajustando la anchura de la ventana de exploración de masas y / o el control automático de ganancia y / o la cantidad de muestra inyectada en el cromatógrafo. Así, por ejemplo, para aumentar la intensidad del pico de iones asociado con la sustancia objetivizada como diana, la cantidad de muestra inyectada en el cromatógrafo puede aumentarse y / o la anchura de la ventana de exploración de masas, puede disminuirse y / o el control automático de ganancia, puede establecerse en valores más altos. De una forma adicional, la intensidad del pico de iones asociado con la sustancia objetivizada como diana, también se puede controlar ajustando la cantidad de muestra utilizada en una posible etapa de purificación de muestra. Así, por ejemplo, para aumentar la intensidad del pico de iones, la cantidad de muestra tomada en un proceso de purificación de muestra, puede aumentarse a un valor comprendido entre 5 µl y 300 µl ó entre 300 µl y 500 µl.

Debería entenderse el hecho de que, las características, individualmente o en cualquier combinación, dadas a conocer, descritas o explicadas para un procedimiento para determinar los niveles de enriquecimiento de múltiples trazadores, también pueden ser aplicables, así mismo, a un conjunto de moléculas trazadoras, para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana y también pueden ser aplicables a un sistema para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, en concordancia con las formas de presentación de la presente invención y viceversa.

El procedimiento para determinar los enriquecimientos, puede utilizar un conjunto de moléculas para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana mediante espectroscopia de masas de alta resolución, comprendiendo, el conjunto en cuestión: por lo menos un primer y un segundo trazador, cada uno administrable a un organismo vivo, cada uno con una estructura química y una composición elemental de la sustancia objetivizada como diana y que tiene la misma masa nominal, en donde se seleccionan el primer y el segundo trazador para que puedan resolverse mediante el uso de espectroscopia de masas de alta resolución y su enriquecimiento sea cuantificable, en una muestra extraída del organismo vivo, de una forma particular, de un fluido corporal del organismo vivo.

El metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, puede comprender el anabolismo, el catabolismo, la producción, la utilización, la absorción, la eliminación, la excreción, la aparición, la desaparición, la eliminación, el transporte, la difusión, la internalización por convección, la fragmentación y / o derivatización de la sustancia objetivizada como diana.

El primer y segundo trazador, pueden seleccionarse para ser utilizables y para usarse dentro de un procedimiento para determinar los niveles de enriquecimiento de los trazadores en concordancia con una forma de presentación de la presente invención. De una forma particular, el conjunto puede comprender, de una forma adicional, por lo menos un tercer trazador, el cual también puede seleccionarse para ser utilizable y para usarse dentro de un procedimiento para determinar los niveles de enriquecimiento de los trazadores. La totalidad de los trazadores del conjunto, pueden tener la misma masa nominal. Así, de este modo, los costos de los trazadores pueden reducirse. De una forma particular, los trazadores, pueden contener cada uno de ellos, únicamente una sustitución isotópica. Así, de este modo, puede eliminarse la necesidad de utilizar trazadores costosos y sustituidos de forma múltiple. El conjunto, representa un conjunto particular seleccionado de entre moléculas, de tal forma que, cuando se introduce en un espectrómetro de masas de alta resolución, los picos iónicos correspondientes se pueden resolver el uno desde el otro. De una forma convencional, un conjunto de moléculas para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, puede haber comprendido trazadores que tengan una masa nominal diferente. La totalidad de los trazadores, en el conjunto, pueden usarse en un procedimiento para determinar los niveles de enriquecimiento respectivos de la totalidad de trazadores, en concordancia con una forma de presentación de la presente invención la cual se ha descrito anteriormente, arriba.

El procedimiento para determinar los enriquecimientos, puede llevarse a cabo mediante el uso de un sistema para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, mediante espectroscopia de masas de alta resolución, comprendiendo, el sistema en cuestión: un conjunto de por lo menos dos trazadores en concordancia con las descripciones anteriores; y un aparato de espectroscopía de masas de alta resolución configurado para resolver entre sí, los por lo menos dos trazadores, el sistema, de una forma particular, adicionalmente: un cromatógrafo adaptado para separar parcialmente los constituyentes de la muestra en fracciones de constituyentes que son suministrables al aparato de espectroscopia de masas, de alta resolución.

Descripción resumida de los dibujos

La Figura 1, ilustra, de una forma esquemática, un sistema para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, en concordancia con una forma de presentación de la presente invención;

La Figura 2, ilustra un ejemplo de un perfil de elución de un cromatógrafo de líquidos utilizado en formas de presentación de la presente invención;

65

Las Figuras. 3A y B, ilustran espectros de masas ejemplares considerados en formas de presentación de la presente invención;

Las Figuras 4A, B, C, 5A, B, C y 6A, B, C, ilustran ejemplos de curvas de calibración, tal como se usan en formas de presentación en concordancia con la presente invención; y

Las Figuras 7A, B y C, ilustran ejemplos de procedimientos estadísticos para la validación del procedimiento considerado en formas de presentación de la presente invención.

10 Descripción detallada de formas de presentación

El sistema 1 para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, de una forma particular glucosa, ilustrado de una forma esquemática en la Figura 1, comprende un conjunto, en concordancia con una forma de presentación de la presente invención, de por lo menos dos trazadores de la sustancia objetivizada como diana, los cuales se encuentran contenidos en una muestra 3. De una forma adicional, el sistema 1, comprende un cromatógrafo de líquidos 5, al que se aplica la muestra 3. El sistema 1, comprende, de una forma adicional, un aparato de espectrometría de masas de alta resolución, 7, al que se suministran o cargan una o más fracciones derivadas mediante el uso del cromatógrafo 5.

El cromatógrafo de líquidos 5, comprende una columna de amida BEH de cromatografía líquida de ultra rendimiento (columna de amida UPLC BEH), la cual se encuentra equipada con un filtro en línea de columna. Para la determinación del enriquecimiento de trazadores de glucosa (una sustancia objetivizada como diana a modo de ejemplo), se inyecta un volumen de muestra de 4 l de la muestra 3 y, la elución isocrática se lleva a cabo con acetonitrilo / H₂O (8 : 2; v / v - [volumen con respecto a volumen] -) que contiene un porcentaje del 0,1 %, en volumen, de solución de hidróxido de amonio, como aditivo, a una velocidad de flujo de 150 µl / min, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos.

El aparato de espectrometría de masas, 7, es un espectrómetro de masas Orbitrap que se encuentra conectado al cromatógrafo de líquidos 5, a través de una interfaz de ionización, por electropulverización calentada. Para la determinación del enriquecimiento de trazadores de la sustancia objetivizada como diana ejemplar (es decir, glucosa), la interfaz de ionización por electropulverización calentada, se opera en el modo de ionización negativa, mediante el uso de los siguientes parámetros de electropulverización: voltaje de fuente, 3,8 kV; una temperatura de la fuente de calentamiento, de 250 °C; unidades arbitrarias 30, 12, y 1, de gas de envoltura, auxiliar y de barrido, y de barrido, respectivamente; temperatura capilar, 300 °C. Así, de este modo, el analizador de masas Orbitrap, 7, funciona en modo de exploración completa con una resolución objetivizada como diana de 100 000 con una ventana de exploración de m / z 100 - 350. El control automático de ganancia, se encuentra configurado para permitir que 10⁵ iones entren en el analizador de masas. Mediante el uso de la pérdida de agua de glucosa monoisotópica (m / z 161,0455) como masa de bloqueo, los iones desprotonados de glucosa y sorbitol / manitol, se controlan a los valores de masa a carga tal como se indica en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación. La integración de los picos de iones observados, se realiza lleva a cabo mediante la utilización de una herramienta de software informático.

Tabla 1.

Trazadores de glucosa, así como abundancia natural y masa exacta de isotopólogos estables de glucosa

Trazadores de glucosa

Nº	Tipo	Isotopólogos de glucosa ^a	Abundancia natural (%) ^b	Masa nominal (Da)	Masa exacta (Da) M	[M + H] ⁻	Diferencia de masa (mDa) ^c
50	1	¹² C ₆ ¹ H ₁₂ ¹⁶ O ₆	100,00000	180	180,06339	179,05611	
		¹³ C ₁ ¹² C ₅ ¹ H ₁₂ ¹⁶ O ₆	6,48944	181	181,06674	180,05947	2,922
		¹² C ₆ ¹ H ₁₂ ¹⁷ O ₁ ¹⁶ O ₅	0,22856	181	181,06761	180,06033	2,060
	2	¹² C ₆ ² H ₁ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₆	0,13802	181	181,06966	180,06239	0,000
		¹² C ₆ ¹ H ₁₂ ¹⁸ O ₁ ¹⁶ O ₅	1,23300	182	182,06763	181,06036	8,308
55	3	¹³ C ₂ ¹² C ₄ ¹ H ₁₂ ¹⁶ O ₆	0,17547	182	182,07010	181,06282	5,844
		¹³ C ₁ ¹² C ₅ ¹ H ₁₂ ¹⁷ O ₁ ¹⁶ O ₅	0,01483	182	182,07096	181,06368	4,982
		¹² C ₆ ¹ H ₁₂ ¹⁷ O ₂ ¹⁶ O ₄	0,00022	182	182,07182	181,06455	4,119
		¹³ C ₁ ¹² C ₅ ² H ₁ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₆	0,00896	182	182,07302	181,06574	2,922
60		¹² C ₆ ² H ₁ ¹ H ₁₁ ¹⁷ O ₁ ¹⁶ O ₅	0,00032	182	182,07388	181,06661	2,060

Continuación Tabla 1

Nº	Tipo	Isotopólogos de glucosa ^a	Abundancia natural (%) ^b	Masa nominal (Da)	Masa exacta (Da) M	[M + H] ⁻	Diferencia de masa (mDa) ^c
65	4	¹² C ₆ ² H ₂ ¹ H ₁₀ ¹⁶ O ₆	0,00009	182	182,07594	181,06867	0,000
		¹² C ₆ ¹ H ₁₄ ¹⁶ O ₂ ¹⁶ O ₆ ^d	<u>n. a.</u>		182,07904	181,07176	3,097

5 [U- $^{13}\text{C}_6$]glucosa $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ <0,00001 186 186,08352 185,07624

Los isotopólogos utilizados como trazadores están subrayados. ^b Relativo a la glucosa monoisotópica. ^c Diferencia con respecto a la masa de iones de [$^{12}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$] ó [$^{12}\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$]. ^d Sorbitol monoisotópico y manitol

5

La aplicación de la muestra 3, la cual contiene por lo menos dos trazadores de la sustancia objetivizada como diana, da como resultado un perfil de elución 9, a partir del cual, se pueden transferir fracciones individuales al aparato de espectrometría de masas, 7. Para una o más fracciones que se eluyen, desde el cromatógrafo 5, el aparato de espectrometría de masas de alta resolución, 7, determina un espectro de masas, 11, en el que los constituyentes ionizados de la respectiva fracción, se separan, en concordancia con sus valores de masa a carga.

10

La Figura 2, ilustra un ejemplo del perfil de elución 9 obtenido después de inyectar 5 µg / ml de glucosa, manosa y galactosa, así como 100 µg / ml de glucosa, en el cromatógrafo 5. Así, por consiguiente, la abscisa 13, indica el tiempo en minutos, mientras que, la ordenada 15 denota la intensidad de las fracciones que eluyen de la columna contenida en el cromatógrafo 5. El perfil de elución 9, comprende una serie de picos 17, 19, 21 y 23. De una forma particular, el pico 17, corresponde a fructosa, el pico 19, corresponde a manosa, el pico 21, corresponde a glucosa y, el pico 23, corresponde a galactosa. La fructosa, la manosa y la galactosa, tienen la misma composición elemental y masa que la glucosa (hexosas) y, así, por lo tanto, éstas no pueden separarse entre sí, mediante la utilización de únicamente el aparato de espectrometría de masas 7. Tal como puede apreciarse a raíz de la Figura 2, la fructosa y la manosa se resuelven completamente a partir de la glucosa, pero la glucosa y la galactosa se resuelven sólo parcialmente en la columna. Sin embargo, puesto que la galactosa puede encontrarse presente con mayor frecuencia, en concentraciones insignificantes o negligibles, en la muestra 3, la determinación de los enriquecimientos de trazadores de glucosa, no puede verse afectada por una separación incompleta de glucosa y galactosa.

15

20

25

Así, de este modo, las fracciones que contienen el pico 21, se cargan, a continuación, en el aparato de espectrometría de masas 7, para determinar los niveles de por lo menos un primer y un segundo trazador, contenidos en la muestra 3. De una forma adicional a los isotopólogos de glucosa de origen natural (es decir, isotopólogos de la sustancia objetivizada como diana a título de ejemplo), la muestra 3, también puede contener trazadores de glucosa, tal como, por ejemplo, los enumerados en la Tabla 1, en combinaciones particulares de los mismos. Puesto que las propiedades químicas de los trazadores enumerados, son las mismas que las de los isotopólogos de glucosa, los trazadores, también se encuentran comprendidos en el pico 21. Las fracciones que contienen el pico 21, se transfieren al aparato de espectrometría de masas 7, para determinar enriquecimientos de por lo menos un primer y un segundo trazador contenidos en la muestra 3.

30

35

Los trazadores enumerados en la Tabla 1 y marcados, tal como desde el trazador número 1 hasta el trazador número 5, pueden encontrarse presentes en la muestra, en combinaciones particulares de los mismos. Tal como puede verse, estos trazadores, contienen por lo menos una sustitución por ^{13}C ó ^2H en posiciones específicas del carbono. El trazador 1 contiene, una sustitución por ^{13}C , en la primera posición del carbono, mientras que el trazador 2, contiene exactamente una sustitución por ^2H , en la primera posición del carbono. De una forma adicional, el trazador 3, contiene dos sustituciones por ^{13}C , una en la primera y otra en la sexta posición del carbono, y el trazador 4, contiene dos sustituciones por ^2H , ambas en la sexta posición del carbono. Finalmente, el trazador 5 contiene sustituciones por ^{13}C , en las seis posiciones del carbono, de la molécula trazadora.

40

45

Tal como se puede extraer de la Tabla 1, el isotopólogo natural más abundante de glucosa (sin marcar), tiene una masa nominal de 180 Da. Los isotopólogos más abundantes del trazador 1 y 2 tienen una masa nominal de 181, los isotopólogos más abundantes del trazador 3 y 4 tienen una masa nominal de 182 Da y el isotopólogo más abundante del trazador 5 tiene una masa nominal de 186 Da. A pesar del hecho de que, los isotopólogos de los trazadores 1 y 2 tienen la misma masa nominal, pueden resolverse mediante la utilización del aparato de espectrometría de masas de alta resolución, 7. Este mismo criterio, se aplica a los isotopólogos de los trazadores 3 y 4.

50

Las figs. 3A y 3B, muestran espectros de masas de iones negativos de alta resolución 11a y 11b, adquiridos mediante la utilización del analizador de masas Orbitrap Velos 7, ilustrado en la Figura 1. Así, de este modo, las ordenadas 25 indican la intensidad relativa de iones, mientras que, las abscisas 27, indican los valores de masa a carga (m / z).

55

El espectro de masas 11a, ilustrado en la Fig. 3A, se registró a partir de una muestra de plasma sanguíneo humano, en blanco, que contenía niveles naturalmente abundantes de isótopos de glucosa, mientras que el espectro de masas 11b, que se muestra en la Fig. 3B, se registró a partir de una muestra de sangre humana que contenía el trazador 2, 3, 4 y 5, a unos niveles de enriquecimiento del 2 %. Las inserciones en las figs. 3A y 3B, muestran vistas ampliadas de los rangos de m / z que contienen los picos de iones que surgen de los isótopos de la glucosa natural y de los trazadores 2, 3, 4 y 5. También se muestra, así mismo, la composición isotópica y el valor m / z exacto de los picos individuales derivados de los isotopólogos de la glucosa natural y los trazadores. Los espectros de masas 11a y 11b, se adquirieron con una resolución o poder de resolución superior a 175 000 (definido a m / z 180).

65

El pico de iones 29 en las Figs. 3A y B, surge del isotopólogo natural más abundante de glucosa. De una forma adicional, el pico de iones 31, que tiene una intensidad relativa de aproximadamente 6,45 %, surge del segundo isotopólogo de glucosa que contiene ^{13}C , que es el más abundante en la naturaleza (es decir, $^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_5^1\text{H}_{12}^{16}\text{O}_6$). Puesto que el trazador 1 contiene una sustitución ^{13}C (es decir, $[1-^{13}\text{C}]$ glucosa), los iones que surgen del isótopo más abundante del trazador 1, tendrán exactamente el mismo valor m/z que los iones del pico 31 y, así, por lo tanto, contribuirán a este pico de iones. El pico de iones 33 en el espectro de masas 11b, surge del isótopo más abundante del trazador 2 marcado con ^2H , individualmente. Tal como se puede ver, los iones de este pico y los iones del pico 31, que pueden surgir del trazador 1 marcado con ^{13}C , individualmente y, el segundo isotopólogo natural de glucosa más abundante, se pueden distinguir el uno con respecto al otro.

Es importante destacar el hecho de que, esta distinción, se puede conseguir, a pesar de la muy pequeña diferencia de masa entre los iones del pico 31 y 33 (es decir, 2,922 mDa, véase la Tabla 1). Así, por lo tanto, los enriquecimientos del trazador 1 individual, marcado con ^{13}C y del segundo trazador individual 2 marcado con ^2H , se pueden determinar de una forma independiente el uno con respecto al otro, ya que los picos de iones asociados con estos trazadores (es decir, los picos 31 y 33) se pueden distinguir completamente entre sí, mediante la utilización del analizador de masas de alta resolución 7. De una forma adicional, el pico de iones 35, en los espectros de masas 11a, 11b surge del tercer isotopólogo de glucosa que contiene ^{18}O , que es el más abundante en la naturaleza (es decir, $^{12}\text{C}_6^1\text{H}_2^{18}\text{O}_1^{16}\text{O}_5$ con una abundancia natural de 1,23 %). El pico de iones 37, surge del isotopólogo más abundante del trazador 3, doblemente marcado con ^{13}C y del isotopólogo menos abundante en la naturaleza, que contiene ^{13}C , de glucosa (es decir, $^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_5^1\text{H}_{12}^{16}\text{O}_6$, con una abundancia natural de 0,18 %). El pico de iones 39, en el espectro de masas 11b, surge del isótopo más abundante del trazador 4, doblemente marcado con ^2H . De nuevo, los iones de este pico y los iones del pico 37 se pueden distinguir entre sí, a pesar de la muy pequeña diferencia de masa entre ellos (es decir, de 5,8 mDa, véase la Tabla 1). Así, por lo tanto, los enriquecimientos del trazador 3 doblemente marcado con ^{13}C y del trazador 4, doblemente marcado con ^2H , también se pueden determinar de una forma independiente, el uno con respecto al otro, ya que los picos de iones asociados con estos trazadores (es decir, los picos 37 y 39) se pueden distinguir completamente entre sí, mediante la utilización del aparato de espectrometría de masas de alta resolución 7. Finalmente, el pico de iones 41, en el espectro de masas 11b, surge del isotopólogo más abundante del trazador 5, que incorpora seis sustituciones por ^{13}C .

En la muestra, pueden encontrarse presentes diferentes combinaciones de trazadores en concordancia con las formas de presentación de la presente invención. Así, por ejemplo, los trazadores 2, 4 y 5 pueden encontrarse presentes de una forma simultánea, en la muestra. Para esta combinación, a la cual se la denomina como combinación de triple trazador, 1, las curvas de calibración, se ilustran en las Fig. 4A, B y C. De una forma adicional, las curvas de calibración para otra combinación de trazador, a la cual se la denomina como combinación de triple trazador, 2 y que comprende el trazador 2, 4 y 3, se ilustran en las Figs. 5A, B y C. De una forma adicional, las curvas de calibración para una tercera combinación de trazador, a la cual se la denomina como combinación de triple trazador, 3 y que comprende el trazador 1, 4 y 5, se ilustran en las Figs. 6A, B y C.

En las Figs. 4A, B, C, 5A, B, C y 6A, B, C, las abscisas 43, denotan la intensidad relativa de iones (RI) o el factor de relación de intensidad iónica (calculado como la intensidad de los iones derivados del trazador respectivo dividida por la intensidad de los iones derivados de la traza, es decir, glucosa no etiquetada), mientras que las ordenadas 45, indican el enriquecimiento del trazador (expresado como el factor de relación trazador-traza, TTR). De una forma adicional, los círculos, rombos y triángulos que se muestran en los paneles de las Figs. 4 a 6 denotan los puntos de datos experimentales obtenidos del análisis de las muestras de calibración. De una forma adicional, también se muestran, así mismo, los parámetros de ajuste de la representación matemática de las curvas de calibración, las inserciones con vistas ampliadas de los ajustes de la curva en un rango de enriquecimiento del 0 al 2 %, y la incertidumbre en la determinación de TTR (expresada como la parte inferior unilateral e intervalos superiores de confianza del 95 %; IC del 95%), para el caso de que, para una muestra con enriquecimientos desconocidos, se utilice la media de los resultados de mediciones duplicadas de la intensidad relativa de iones.

Las figs. 4A, B y C, ilustran las curvas de calibración 47, 49, 51 obtenidas para el trazador 2, 4 y 5, respectivamente. De una forma adicional, las Figs. 5A, B y C, representan las curvas de calibración 53, 55, 57 obtenidas para el trazador 2, 4 y 3, respectivamente, y las figs. 6A, B y C, representan las curvas de calibración 59, 61 y 63, obtenidas para el trazador 1, 4 y 5, respectivamente.

Se puede apreciar bien, a partir de los puntos de datos de calibración (es decir, círculos, triángulos y diamantes) trazados en las figs. 4 a 6, el hecho de que, en todos los casos, existe una relación lineal entre los valores de TTR y RI para valores de TTR mayores de ~1 %. Sin embargo, no obstante, en el rango de TTR entre 0 y ~1 %, se producen desviaciones de la linealidad en todas las parcelas, excepto en una, la excepción, es la gráfica para el trazador 1 (es decir, $[1-^{13}\text{C}]$ glucosa en Fig. 6A). Así, por lo tanto, para obtener la curva de calibración 47, 49, 51, 53, 55, 57, 61 y 63, la función exponencial lineal definida anteriormente, arriba (es decir, $\text{TTR} = a + b \text{RI} + c \text{d}^{\text{RI}}$), se ajustó a los datos de calibración para el trazador respectivo 2, 4, 5, 2, 4, 3, 4 y 5, mientras que, para obtener la curva de calibración 59, los valores de los parámetros del componente exponencial de la función exponencial lineal, se establecieron en 0 y únicamente su componente lineal, se ajustó a los datos de calibración para el trazador 1. Las curvas de calibración 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 y 63, se encuentran, representadas, así, por lo tanto, mediante la función exponencial lineal definida anteriormente, arriba, conjuntamente con los valores de los parámetros de ajuste obtenidos, que se proporcionan en los paneles de las Figs. 4 a 6.

Los datos de calibración ilustrados en las figs. 4 a 6, se obtuvieron procediendo a analizar un conjunto de 12 patrones estándar que varían en los valores de TTR de un 0 a un 15 % (es decir, 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 15 %). Este conjunto de patrones estándar de calibración, se preparó para cada una de las tres combinaciones de triple trazador, tal como éstas se han descrito anteriormente, arriba. Para calcular los valores de RI (es decir, los valores de intensidad relativa), la intensidad del pico de iones que surge del trazador (tal como, por ejemplo, la intensidad del pico 33 para el trazador 2, en la Fig. 3B), se divide por la intensidad del pico de iones que surge de la traza (por ejemplo, la intensidad del pico 29 en la Fig. 3A ó en la Fig. 3B) Para ajustar la función exponencial lineal a los datos de calibración y obtener los valores numéricos de los parámetros de ajuste (desconocidos), se procedió a aplicar una técnica de mínimos cuadrados no lineales (es decir, procedimiento de Levenberg-Marquadt), que incorporaba la ponderación de la varianza efectiva inversa descrita anteriormente, arriba. Sin embargo, para llevar a cabo la ponderación de varianza efectiva inversa, tiene que conocerse la incertidumbre en la medición de RI (expresada como varianza, σ_{RI}^2 , o coeficiente de variación, CV). Así, por lo tanto, antes de proceder al ajuste de la curva, se procedió a determinar la incertidumbre en la medición de RI, de una forma experimental, analizando réplicas de muestras de plasma humano enriquecidas con cantidades conocidas de trazadores. Para preparar las réplicas, se procedió, en primer lugar, a producir una serie de 13 muestras de plasma humano que varían en los valores de TTR de 0 a 15 % (es decir, 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 %), para cada combinación de triple trazador, tal como se ha descrito anteriormente, arriba, para los patrones estándar de calibración. A continuación, cada muestra de plasma, se dividió en alícuotos, y se purificaron y analizaron 10 alícuotos de cada muestra. Las medidas de incertidumbre (σ_{RI}^2 , CV) se calcularon a partir de los valores de RI obtenidos. Los resultados de esta evaluación de incertidumbre, para los trazadores individuales, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Valores de incerteza obtenidos para mediciones de intensidad iónica relativa

Nivel TTR		CV para medir la intensidad relativa de iones (%) ^{ab}				
(%)	[1- ² H ₁] glucosa	[6,6- ² H ₂]glucosa	[1- ¹³ C ₁] glucosa	[1,6- ¹³ C ₂] glucosa	[U- ¹³ C ₆]glucosa	
15	2,1	1,5	1,9	1,5	2,1	
10	2,7	2,1	1,8	1,4	1,7	
8	2,3	1,9	2,1	1,4	1,8	
6	2,5	1,6	2,1	1,7	1,9	
4	3,8	2,9	1,2	3,4	2,0	
2	5,4	4,1	1,7	3,3	2,9	
35	1	12,1	8,1	1,3	7,5	5,9
	0,5	12,3	9,8	1,8	3,0	10,6
	0,4	11,5	11,0	1,7	7,5	13,6
	0,3	25,1	10,8	2,0	7,1	10,9
	0,2	23,1	19,6	2,1	8,0	30,3
40	0,1	34,7	34,9	2,1	18,2	35,0
	0	33,1	N/D	1,8	14,7	N/D

ⁿ CV ... coeficiente de variación definido como: desviación estándar / media x 100; ^b N / D ... no definido (CV no está definido si la media de la muestra es cero);

Con objeto de evaluar la incerteza asociada con la determinación de los parámetros de ajuste, se procedió a llevar a cabo una simulación de Monte Carlo. En esta simulación, se generaron 5000 conjuntos de datos sintéticos para cada conjunto de datos de calibración, procediendo a extraer de una forma aleatoria nuevos valores de RI de distribuciones gaussianas con las desviaciones estándar determinadas de una forma experimental (es decir, valores σ_{RI}^2 obtenidos para los 12 niveles de enriquecimiento de un conjunto) y ubicaciones (es decir, medias de los valores de IR triplicados observados en los 12 niveles de enriquecimiento de un conjunto). A continuación, se procedió a ajustar cada conjunto de datos sintéticos, con la función exponencial lineal y, los 5000 valores de esta forma obtenidos para cada parámetro de ajuste, se utilizaron para calcular las medidas de ubicación (media_{MC}) y la incerteza (SD_{MC}). Los resultados de la evaluación de la incertidumbre asociada con la determinación de los parámetros de ajuste se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de parámetros obtenidos al ajustar la función exponencial lineal a conjuntos de datos de calibración

Trazador de glucosa	Combinación triple (TC)	Parámetros de la función exponencial lineal (media _{MC} , SD _{MC}) ^{a,b}			
		a	b	c	d
[1- ² H ₁]glucosa	TC 1	0,702 (0,064)	0,969 (0,010)	-0,872 (0,068)	0,04656 (0,05307)
	TC 2	0,695 (0,038)	0,959 (0,009)	-0,842 (0,069)	0,05928 (0,02954)
[6,6- ² H ₂]glucosa	TC 1	0,545 (0,038)	1,002 (0,007)	-0,548 (0,038)	0,01062 (0,00755)
	TC 2	0,540 (0,020)	1,001 (0,005)	-0,545 (0,020)	0,01426 (0,00599)

	TC 3	0,541 (0,025)	0,993 (0,007)	-0,545 (0,025)	0,01244 (0,00643)
	[1- ¹³ C ₁]glucosa TC 3	-6,428 (0,083)	0,984 (0,010)		
	[1,6- ¹³ C ₂]glucosa TC 2	0,358 (0,024)	0,968 (0,006)	-0,515 (0,027)	0,01952 (0,00872)
5	[U- ¹³ C ₆]glucosa TC 1	0,344 (0,017)	0,949 (0,005)	-0,350 (0,017)	0,00099 (0,00125)
	TC 3	0,358 (0,016)	0,941 (0,006)	-0,365 (0,017)	0,00416 (0,00344)

^aSe muestran las medias y las desviaciones estándar de las distribuciones de frecuencia de los parámetros, obtenidas aplicando el procedimiento de Monte Carlo; ^bNo se encontraron diferencias significativas entre los valores de los parámetros obtenidos para los conjuntos de calibración con baja concentración de trazas (es decir, conjuntos preparados a partir del conjunto de plasma, 2; parte superior) y los obtenidos para los conjuntos de calibración con una alta concentración de trazas (es decir, conjuntos preparados a partir del conjunto de plasma 3; parte inferior);

Las Figs. 7A, B y C, ilustran procedimientos estadísticos adicionales para la validación del procedimiento considerado en las formas de presentación de la presente invención. Para comparar los valores de los parámetros de ajuste obtenidos para los conjuntos de calibración individuales, entre ellos (tal como, por ejemplo, los parámetros obtenidos para la combinación 1 de triple trazador con los obtenidos para la combinación 2 de triple trazador), se utilizó la estadística z ($z = \bar{\delta} / \sigma_{\delta}$), en donde, la media de la diferencia entre los parámetros obtenidos para la combinación 1 y 2, $\bar{\delta}$, así como la desviación estándar de esta diferencia, σ_{δ} , se calcularon a partir de los resultados de la simulación de Monte Carlo. Cualquier valor de z cuyo valor absoluto fuera menor que 1,96 tenía como resultado la aceptación de la hipótesis nula de que $\bar{\delta} = 0$. Un ejemplo representativo de la comparación de los parámetros de ajuste mediante el uso de estadística z , es el que se muestra en la Figura 7A.

Con objeto de evaluar los rangos lineales del procedimiento, se procedió a calcular el IC del 95 % (intervalo de confianza del 95 %) inferior y superior unilateral para ajustes de función exponencial lineal para cada trazador, determinando los valores de percentil 5 y 95, a partir de la distribución de frecuencia de los ajustes de curva de calibración 5000 obtenidos para cada trazador de una triple combinación. Estos valores de IC del 95 %, se compararon con los derivados de la distribución de frecuencia de los ajustes de curva obtenidos mediante el uso de únicamente la parte lineal de la función exponencial lineal (es decir, términos que contienen los parámetros a , y b). Se procedió, a continuación, a determinar el límite inferior del rango lineal de la determinación de enriquecimiento, para cada trazador, como el punto en donde, la banda de predicción inferior del 95 %, obtenida para los ajustes de la curva lineal, cruza la banda de predicción superior del 95 %, obtenida para los ajustes de la curva exponencial lineal. Un ejemplo representativo del rango lineal, es el que se representa en la Figura 7B. Los resultados de la evaluación de los rangos lineales de las curvas de calibración para los trazadores individuales, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Límites de detección y rangos lineales

Trazador de glucosa	Límite de detección (%)	Límite inferior del rango lineal (%)
[1- ² H ₁]glucosa	0,200	1,26
[6,6- ² H ₂]glucosa	0,037	0,99
[1- ¹³ C ₁]glucosa	0,310	0,00
[1,6- ¹³ C ₂]glucosa	0,071	0,87
[U- ¹³ C ₆]glucosa	0,040	0,63

Con objeto de evaluar la incerteza asociada con la determinación de TTR cuando ésta se basa en el uso de la media de los resultados de mediciones de IR duplicadas, se procedió a llevar a cabo una segunda simulación de Monte Carlo en la que se generaron 1000 nuevos valores de IR, para niveles de enriquecimiento del 0, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3,0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 % al extraer muestras aleatorias de distribuciones gaussianas centradas en ubicaciones iguales a las medias de los valores de IR observados y con desviaciones estándar iguales a los valores obtenidos σ_{RI} divididos por $\sqrt{2}$. A continuación de estas operaciones, se procedió a utilizar, para un conjunto de calibración dado, los valores de RI obtenidos y los correspondientes ajustes de la curva de calibración 5000 generados, tal como se ha descrito anteriormente, arriba, para calcular 5×10^6 valores TTR, para cada nivel de enriquecimiento. El CV y el IC del 95 %, inferior y superior unilateral para la determinación de TTR se calcularon a partir de la distribución de la frecuencia de los 5×10^6 valores de TTR obtenidos para cada nivel de enriquecimiento. Los resultados de la evaluación de la incertidumbre asociada con la determinación de TTR, para los trazadores individuales, se muestran en la Tabla 5 y en las Fig. 4 a 6.

Tabla 5. Valores de incerteza obtenidos para la determinación de enriquecimientos de trazadores

Nivel de TTR (%)	CV para determinar el enriquecimiento de trazadores (%) ^{a,bcd}				
	[1- ² H ₁]glucosa	[6,6- ² H ₂]glucosa	[1- ¹³ C ₁]glucosa	[1,6- ¹³ C ₂]glucosa	[U- ¹³ C ₆]glucosa
15	1,6	1,1	2,1	1,1	1,5
10	2,0	1,4	2,2	1,1	1,2

ES 2 806 825 T3

	8	1,6	1,3	2,7	1,0	1,3
	6	1,7	1,0	3,0	1,3	1,3
	4	2,3	1,8	2,3	2,2	1,4
	2	3,0	2,3	5,0	2,2	1,8
5	1	6,8	3,7	7,8	4,2	3,2
	0,5	9,9	6,1	17,1	2,4	5,8
	0,4	10,6	7,3	22,5	5,8	8,2
	0,3	24,7	7,8	32,4	6,4	8,1
	0,2	<u>29,8</u>	13,5	50,1	9,4	20,2
10	0,1	71,4	<u>25,4</u>	93,4	<u>30,3</u>	<u>25,4</u>
	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

ⁿ CV ... coeficiente de variación definido como: desviación estándar / media x 100; ^b N/D ... no definido (CV no está definido si la media de la muestra es cero); ^c Calculado para el caso en el que la media de las mediciones duplicadas de RI se utilizan para la determinación de TTR; ^d Los CV para los niveles de enriquecimiento que son iguales o cercanos a los niveles LOD, están subrayados;

15

20 A partir de los valores de IC del 95% obtenidos, se calcularon los límites inferiores de detección (LOD – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a lower limits of detection] -) para cada trazador, empleando el procedimiento ilustrado gráficamente en la Figura 7C. Esto implica el dibujo de una línea horizontal desde el extremo inferior de la banda superior de predicción del 95 %, hasta la banda inferior de predicción del 95%, y la adición de una línea vertical en el punto en donde, la línea horizontal, cruza la banda de predicción inferior del 95%. El punto de intersección obtenido en la curva lineal-exponencial ajustada, se considera, entonces, como el LOD. Los resultados de la evaluación de la LOD para los trazadores individuales, se muestran en la Tabla 4.

25 Las muestras utilizadas en concordancia con las formas de presentación de la presente invención, no son necesariamente de origen humano.

30 En otras formas de presentación, la muestra deriva de sangre humana, de una forma particular, de plasma de sangre humana. En concordancia con estas formas de presentación, también se puede proporcionar un procedimiento para determinar el metabolismo de una sustancia objetivizada como diana, que incluye glucosa, por espectrometría de masas de alta resolución. Así, de este modo, el procedimiento en cuestión, puede comprender el administrar por lo menos una molécula trazadora a un organismo vivo, teniendo cada una de las por lo menos una molécula trazadora, una estructura química y una composición elemental de la sustancia objetivizada como diana. El procedimiento, puede comprender, de una forma adicional, extraer por lo menos una muestra de un fluido corporal del organismo vivo y analizar la por lo menos una muestra, mediante el uso de espectrometría de masas de alta resolución, para detectar un enriquecimiento de la por lo menos una molécula trazadora, en la muestra. De una forma particular, se puede haber administrado más de una molécula trazadora y, entonces, se puede analizar más de una molécula trazadora, para detectar el enriquecimiento respectivo. Una o más de las moléculas trazadoras, pueden haber sido suministradas al torrente sanguíneo del organismo vivo y una o más de las moléculas trazadoras, pueden haberse suministrado al tracto digestivo del organismo vivo. El enriquecimiento de una o más moléculas trazadoras, puede determinarse en función del transcurso de tiempo transcurrido después de administrar las respectivas moléculas objetivizadas como diana, al organismo vivo. Sin embargo, no obstante, el procedimiento para determinar los enriquecimientos de los trazadores, también se puede llevar a cabo sin que la muestra sea de origen humano.

45

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para determinar, en una muestra, los enriquecimientos de un primer y, por lo menos, un segundo trazador marcado de una forma estable, de por lo menos una substancia objetivizada como diana, la cual incluye glucosa, teniendo, el trazador y el segundo trazador, la misma estructura química o similar a la de la substancia objetivizada como diana, comprendiendo, el procedimiento:
- 5 ionizar el primer trazador, el segundo trazador y la substancia objetivizada como diana, de la muestra, de una forma particular, mediante ionización por electropulverización;
- 10 medir las intensidades de iones derivados de la substancia objetivizada como diana, de iones derivados del primer trazador y de iones derivados del segundo trazador, mediante la utilización de un analizador de masas de alta resolución, de una forma particular, un analizador de masas Orbitrap;
- 15 calcular un enriquecimiento del primer trazador, a partir de un primer factor de relación de la intensidad de los iones derivados del primer trazador, con respecto a la intensidad de los iones derivados de la substancia objetivizada como diana, empleando una primera curva de calibración, la cual es independiente de los enriquecimientos de cada uno de los por lo menos un segundo trazador,
- 20 en donde, el analizador de masas de alta resolución, se opera para resolver un pico de iones derivado de un trazador y que tiene una anchura Δ (m/z) a la mitad de la altura máxima del pico, igual o menor que 1×10^{-2} , de una forma particular, menor que 5×10^{-3} , de una forma adicionalmente particular, menor que 3×10^{-3} .
- 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, el cual comprende, de una forma adicional:
- 25 calcular un enriquecimiento del segundo trazador, a partir de un segundo factor de relación de la intensidad de los iones derivados del segundo trazador, con respecto a la intensidad de los iones derivados de la substancia objetivizada como diana, empleando una segunda curva de calibración, la cual es independiente del enriquecimiento del primer trazador.
- 3.- Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, el analizador de masas de alta resolución, se opera a un poder de resolución de masas igual o superior a 75000, cuando se encuentra presente un trazador de glucosa marcado con ^{13}C -, ^2H - y / ó ^{18}O , en la muestra, e igual o mayor que 200000, cuando también se encuentra presente un trazador de glucosa marcado con ^{17}O , en la muestra,
- 30 en donde, el poder de resolución de la masa, se calcula como el cociente del de valor m/z de 180 y la anchura del pico de iones a la mitad de la altura máxima del pico.
- 4.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende, de una forma adicional:
- 35 separar, por lo menos parcialmente, las sustancias no deseadas, las cuales, de una forma particular, tengan una misma composición elemental que la substancia objetivizada como diana, pero una estructura química diferente, contenida en una muestra cruda, procediendo a llevar a cabo una cromatografía, de una forma particular, una cromatografía líquida, para obtener la muestra.
- 40 5.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, un primer valor de masa, de la masa del primer trazador, difiere de un segundo valor de masa de la masa del segundo trazador, en un valor comprendido entre 1 mDa y 50 mDa, de una forma particular, comprendido entre 2 mDa y 10 mD, de una forma adicionalmente particular, comprendido entre 3 mDa y 6 mDa.
- 45 6.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, la primera curva de calibración es susceptible de poderse representar mediante una primera función matemática, la cual relaciona los valores de los primeros factores de relación de la calibración de intensidades iónicas, con respecto a los enriquecimientos del primer trazador.
- 50 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera curva de calibración es completamente independiente del enriquecimiento de uno cualquiera del por lo menos un segundo trazador, en donde, el primer trazador, contiene una sustitución por ^{13}C y el por lo menos un segundo trazador, comprende por lo menos una de entre: una sustitución por ^2H y / ó ^{17}O y / ó ^{18}O ó
- 55 en donde, el primer trazador contiene una sustitución por ^2H y, el por lo menos un segundo trazador, contiene por lo menos una de entre: una sustitución por ^{13}C - y / ó ^{17}O - y / ó ^{18}O -, ó,
- en donde el primer trazador contiene una sustitución por ^{17}O y, el por lo menos un segundo trazador, contiene por lo menos una de entre: una sustitución por ^{13}C y / ó ^2H y / ó ^{18}O , ó,
- 60 en donde, el primer trazador, contiene una sustitución por ^{18}O y, el por lo menos un segundo trazador, contiene por lo menos una de entre: una sustitución por ^{13}C y / ó ^2H y / ó ^{17}O ,
- en donde, el primer trazador y el segundo trazador tienen, de una forma particular, la misma masa nominal.
- 8.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, la primera curva de calibración, es prácticamente independiente del enriquecimiento de cualesquiera de los por lo menos un trazador, en donde, una diferencia de masa nominal entre el primer trazador y el segundo trazador es de por lo menos 1 Da,
- 65 en donde, el primer trazador, contiene una sustitución por ^2H y el por lo menos un segundo trazador, contiene otra sustitución por ^2H , ó

en donde, el primer trazador, contiene una sustitución por ^{17}O y, el por lo menos un segundo trazador, contiene otra sustitución por ^{17}O , ó
 donde, el primer trazador, contiene una sustitución por ^{18}O y, el por lo menos un segundo trazador, contiene otra sustitución por ^{18}O .

5 9.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, el primer trazador, contiene una primera sustitución isotópica, la cual incluye una de entre una sustitución por ^2H -, ^{17}O -, ^{18}O -, ^{13}C ,
 10 en donde, se obtiene una primera función matemática, la cual representa la primera curva de calibración, mediante las siguientes etapas, si no se encuentra presente otro trazador el cual contenga la primera sustitución, en la muestra, o si la diferencia de masa nominal, entre los trazadores los cuales contienen la primera sustitución isotópica, es de por lo menos 1 Da ó de 2 Da, si la primera sustitución isotópica, es una sustitución por ^{13}C :

15 analizar muestras de calibración las cuales contienen primeros enriquecimientos conocidos del primer trazador, mediante el uso del analizador de masas de alta resolución para obtener los primeros factores de relación de calibración;

ajustar una función matemática al primer enriquecimiento conocido y los primeras factores de relación de calibración, los cuales se encuentran asociados,

en donde la función matemática es lineal o tiene la siguiente forma:

$$20 \quad \text{TTR} = a + b \text{ si RI} + c \text{ d}^{\text{RI}}$$

en donde a, b, c y d, son parámetros de ajuste, TTR es el primer enriquecimiento y RI es el primer factor de relación de calibración.

25 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende, de una forma adicional:

resolver, en un espectro de masas, un primer pico de iones causado por el primer trazador, a partir de un segundo pico de iones causado por el segundo trazador;

30 derivar el enriquecimiento del primer trazador, basado en el primer pico de iones, y un pico de iones causado por la sustancia objetivizada como diana;

derivar el enriquecimiento de la segunda molécula trazadora, basada en el segundo pico de iones y el pico de iones causado por la sustancia objetivizada como diana.

35 11.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, la sustancia objetivizada como diana, incluye por lo menos una molécula objetivizada como diana adicional, comprendiendo el procedimiento:

ionizar un primer trazador adicional de la molécula objetivizada como diana e ionizar la molécula objetivizada como diana adicional de la muestra;

40 medir las intensidades de iones derivados de la molécula objetivizada como diana, adicional, y de iones derivados del primer trazador adicional mediante la utilización del analizador de masas de alta resolución;

45 calcular un enriquecimiento del primer trazador adicional a partir de un primer factor de relación adicional de la intensidad de los iones derivados del primer trazador adicional, con respecto a la intensidad de los iones derivados de la molécula objetivizada como diana, adicional, empleando una primera curva de calibración adicional que es independiente de un enriquecimiento de cualquier otro trazador de la molécula objetivizada como diana, adicional.

12.-. Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, la sustancia objetivizada como diana y / o la molécula objetivizada como diana, adicional, comprende o es una de entre:

50 un hidrato de carbono, de una forma particular un monosacárido, un disacárido, un oligosacárido, un polisacárido, de una forma particular fructosa, manosa, galactosa o almidón;

un derivado de hidrato de carbono, de una forma particular metil glucosa, desoxi glucosa, fluoro desoxi glucosa o monoacetona glucosa;

un alcohol de azúcar, de una forma particular, manitol, sorbitol ó glicerol;

55 un cuerpo de cetona, de una forma particular beta-hidroxibutirato;

un lípido, de una forma particular, un ácido graso, un glicerolípido, un glicerofosfolípido, un esfingolípido, un lípido esterol;

un alcohol

agua.

60 13.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, se añade un trazador de la sustancia objetivizada como diana, de una forma particular, glucosa, y / o un trazador de la molécula objetivizada como diana, adicional, como un patrón estándar interno a la muestra y, tomando el nivel de enriquecimiento del trazador resultante y se calcula la cantidad conocida de un trazador añadido, la concentración de la sustancia objetivizada como diana, de una forma particular glucosa no marcada, y / o la concentración de la molécula
 65 objetivizada como diana, adicional, en la muestra.

14.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, un determinado número de iones derivados de los trazadores y que entran en el analizador de masas, se mantienen por debajo del umbral de coalescencia, aumentando / ajustando la ventana de exploración de masas a un rango m/z de 179 a 186 ó de 100 a 350 y / o bajar el control automático de ganancia a un valor comprendido entre 10^4 y 10^6 ó entre 10^3 y 10^4 .

5 15.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, la intensidad del pico de iones derivado de la sustancia objetivizada como diana, se mantiene por encima de un nivel umbral de $1,0 \times 10^7$ ó de $1,0 \times 10^8$ unidades arbitrarias, aumentando la cantidad de muestra inyectada en el cromatógrafo, a un valor comprendido entre 1 y 3 μl ó entre 3 y 10 μl , y / o disminuyendo la ventana de exploración de masa, a un rango m/z de 100 a 350 ó de 179 a 186, y / o aumentando el control automático de ganancia a un valor comprendido entre 10^3 y 10^4 ó entre 10^4 y 10^6 .

10

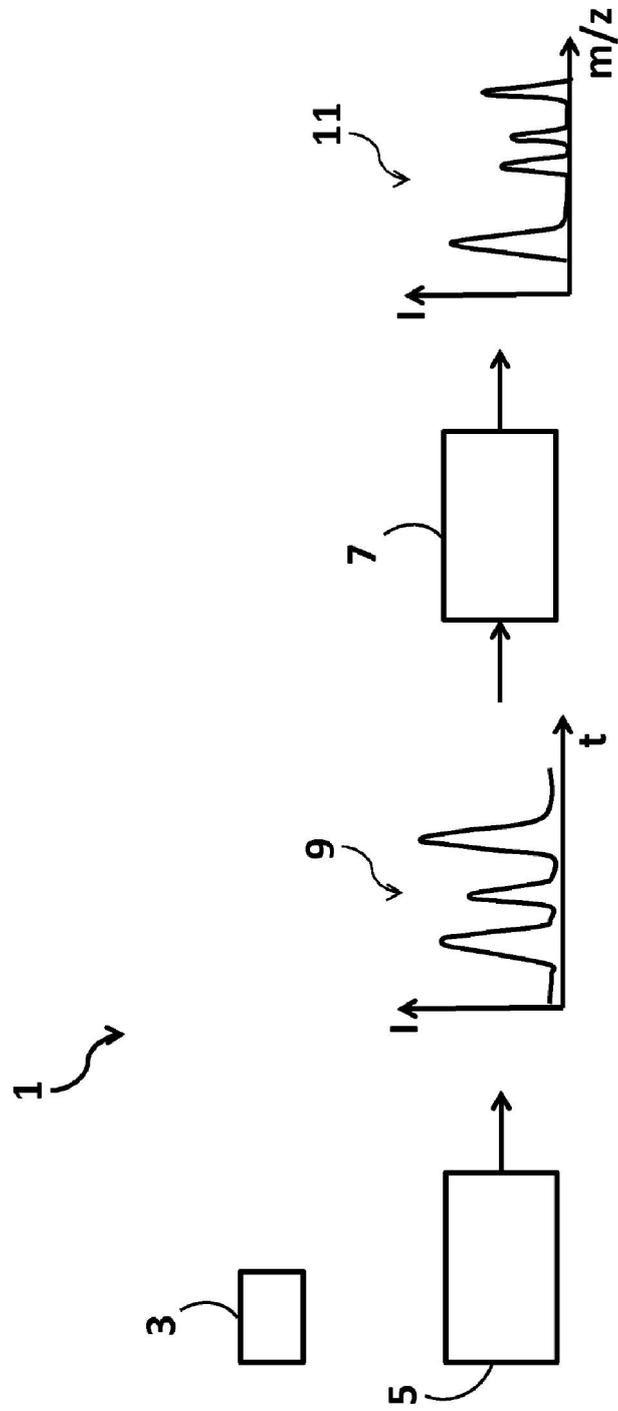


Fig. 1

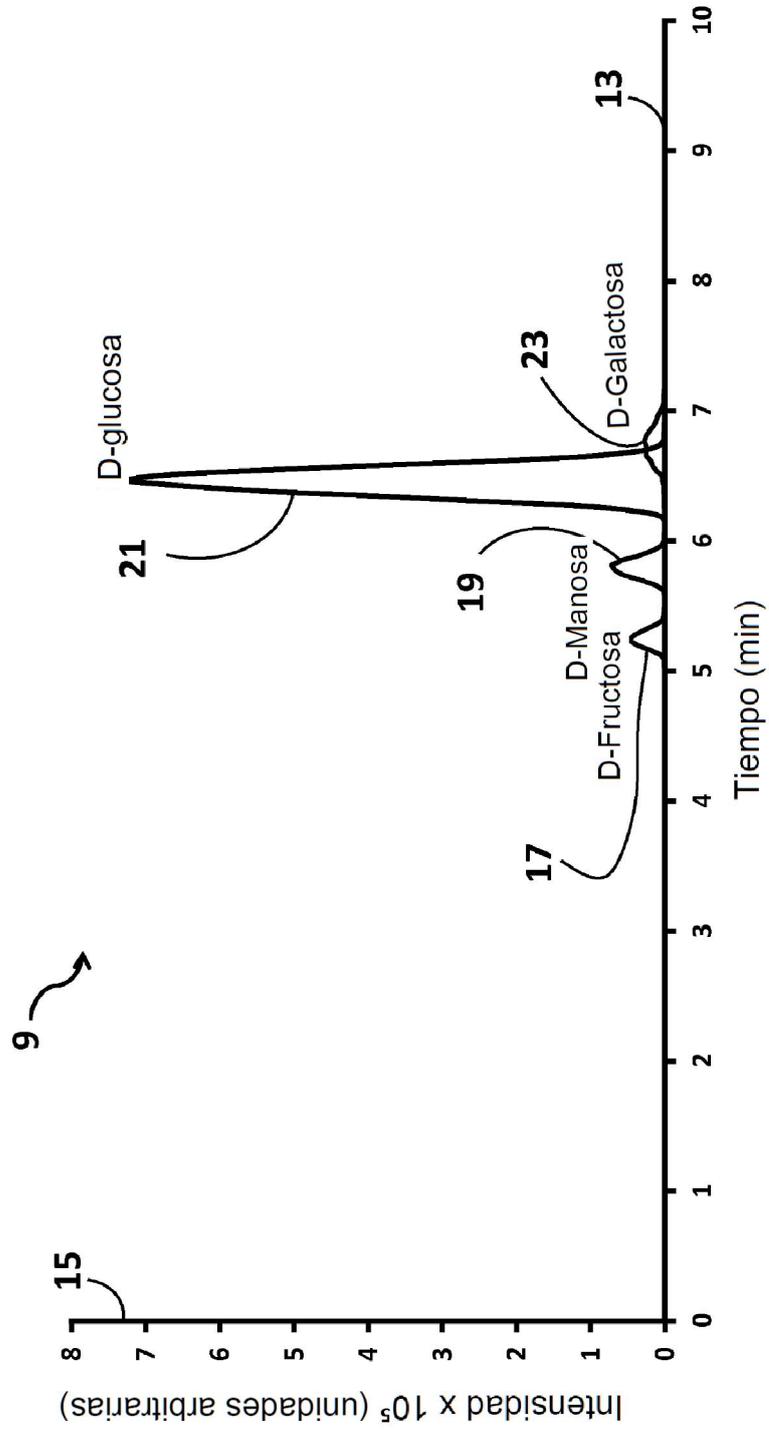


Fig. 2

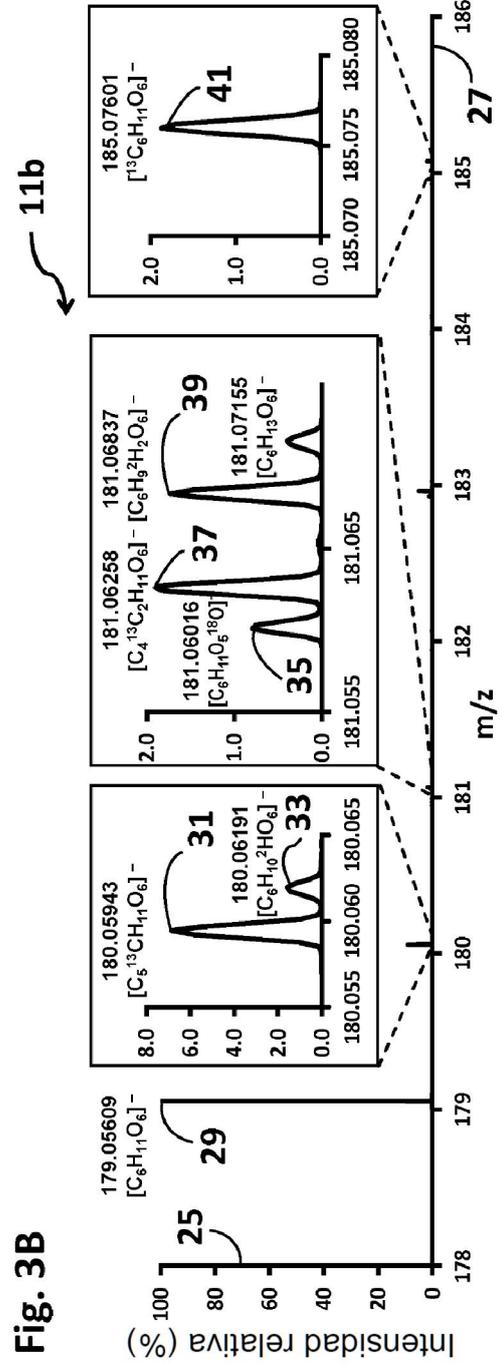
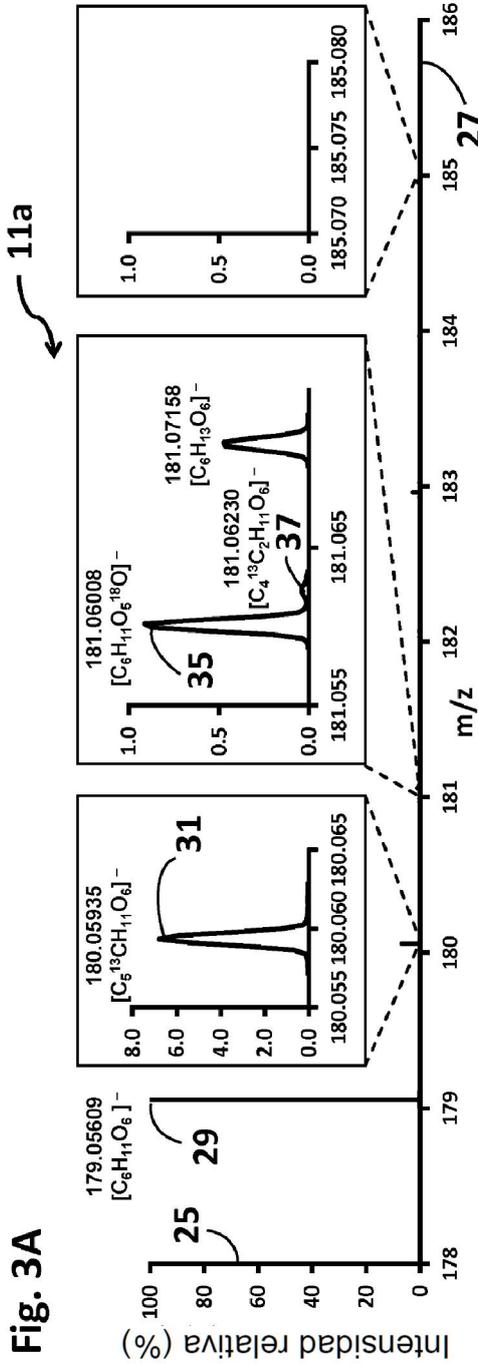


Fig. 4 Combinación de triple trazador, 1

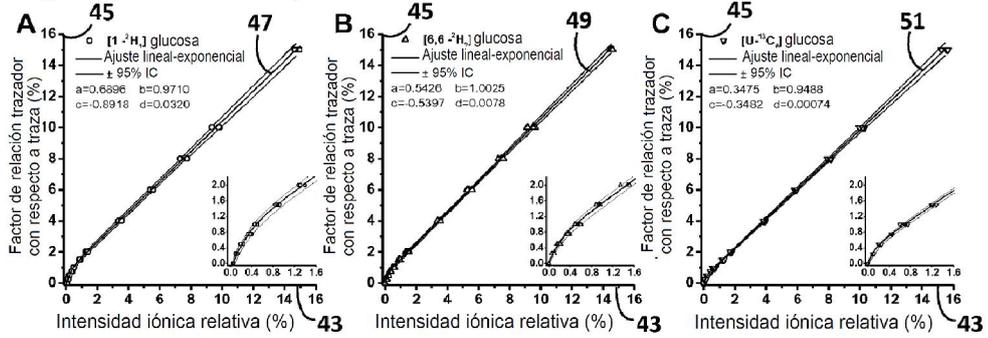


Fig. 5 Combinación de triple trazador, 2

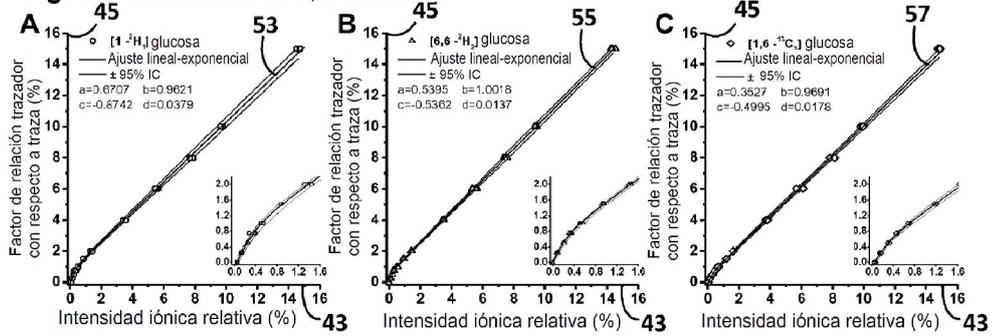
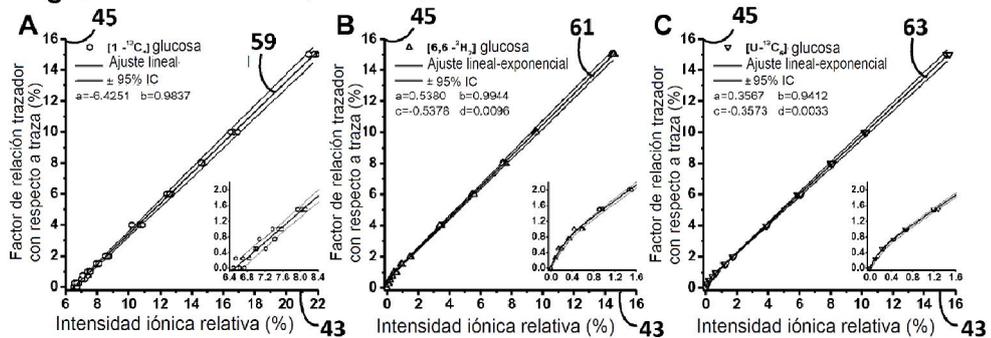


Fig. 6 Combinación de triple trazador, 3



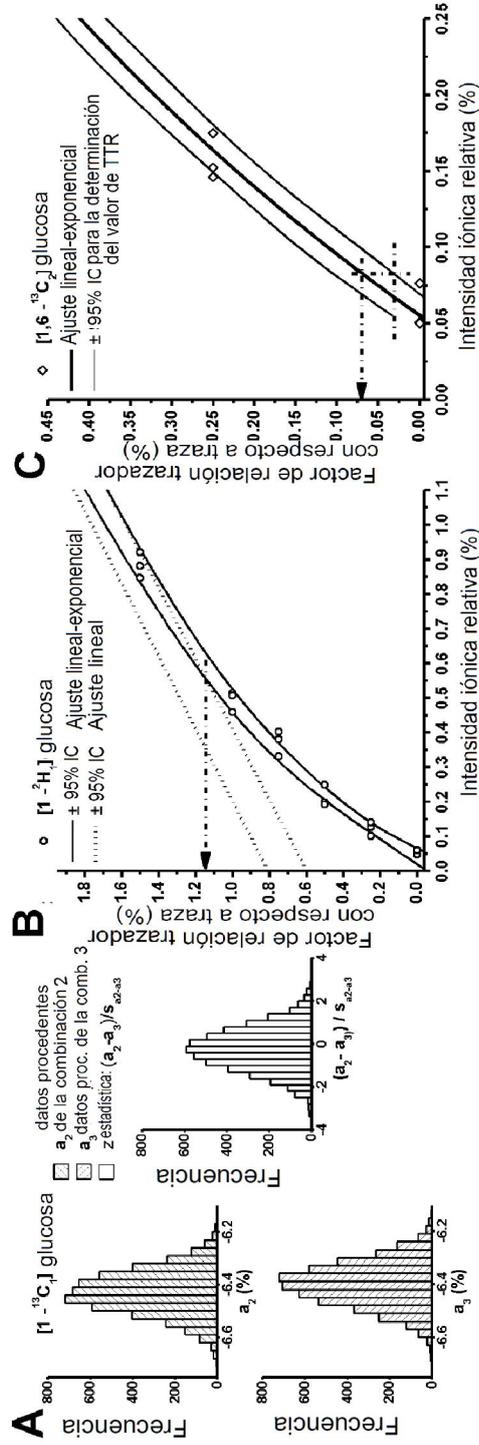


Fig. 7