



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**Estudio sobre la determinación de la anandamida (AEA)**

***Autor: Víctor Colinas Romero***

***Tutor: Dr. Luis Mariano Debán Miguel (Área Química Analítica)***

***Tutor: Dr. Jesús Miguel Tejedor Muñoz***

***(Delegación del Gobierno en Castilla y León)***



El siguiente trabajo ha sido realizado por el alumno del Grado en Química de la Universidad de Valladolid VÍCTOR COLINAS ROMERO, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, con la colaboración del Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno en Castilla y León.

Quiero agradecer a los tutores que han dirigido mi trabajo, el Dr. LUIS MARIANO DEBÁN MIGUEL y el Dr. JESÚS MIGUEL TEJEDOR MUÑOZ, por haberme proporcionado los medios para la realización de este trabajo, así como por su apoyo y ayuda prestada para su realización.

De igual manera, quiero agradecer a los profesionales que me enseñaron y ayudaron durante mis prácticas de empresa en el Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno en Castilla y León, DOMICIANA DE LA FUENTE, ANA MORENO y JUAN PANTIGA, por su dedicación, por la formación y por el trato recibido.

Por último, mis agradecimientos a FRANCISCO DE LA ROSA y a ROSARIO GOMEZ por proporcionarme toda la ayuda y el material de laboratorio necesario para llevar a cabo este trabajo.



## **ÍNDICE**

<b>1. Resumen/ Summary .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Antecedentes Bibliográficos .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Técnicas utilizadas para la determinación de anandamida .....</b>	<b>14</b>
5.1. Técnicas de separación.....	14
5.2 Técnicas de detección.....	15
<b>6. Experimentación y resultados.....</b>	<b>16</b>
6.1. Equipos y reactivos .....	16
6.2. Procedimientos previos .....	17
6.3. Análisis por HPLC-UV/Vis .....	19
6.4. Análisis por HPLC-FL.....	21
6.5. Análisis por GC-MS.....	23
<b>7. Proyecto de puesta a punto de un método de determinación de AEA en muestras biológicas.....</b>	<b>27</b>
7.1 HPLC-MS.....	29
7.2. GC-MS .....	32
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>36</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>38</b>
<b>10. Anexo .....</b>	<b>41</b>
10.1. Espectros UV-Visible .....	43
10.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia - UV/VIS (HPLC-UV/Vis).....	45
10.3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia – fluorescencia (HPLC-FL) .....	57
10.4. Cromatografía de gases – detector ionización de llama (CG-FID).....	69

## **RESUMEN /ABSTRACT**

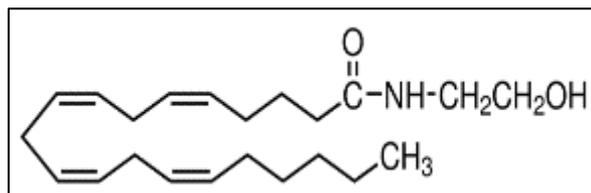
En el siguiente trabajo se ha realizado un estudio sobre la determinación de la anandamida o araquidonoiletanolamida (AEA) mediante cromatografía de líquidos (HPLC) con detector ultravioleta/visible (UV/Vis) y con detector de fluorescencia (FL), así como por cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID). Para terminar, debido a las dificultades que se han encontrado a lo largo del estudio, se ha realizado también un proyecto sobre puesta a punto de un método validado para la determinación de AEA en muestras biológicas, analizando el procedimiento a seguir y sus costes.

In the following work, we have carried out a study about the determination of anandamide or arachidonylethanolamide (AEA) by liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet / visible detector (UV / Vis) and with a fluorescence detector (FL), as well as with gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID). Finally, due to the difficulties that have been encountered throughout the study, we also carried out a project about the development of a validated method for the determination of AEA in biological samples, analyzing the procedure and its costs.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Anandamida (AEA)**

El descubrimiento del sistema cannabinoide endógeno ha marcado el inicio de diferentes estudios sobre su estructura y funciones, ya que interviene en múltiples vías metabólicas regulando la fisiología celular. Entre los componentes de este sistema se encuentran los ligandos endógenos o endocannabinoides, de entre los cuales destaca la anandamida o araquidonoiletanolamida (AEA), primer cannabinoide endógeno aislado y estudiado:



Estructura química de la AEA (Sigma – Aldrich)

El nombre de anandamida deriva de la palabra sánscrita “ananda”, que significa portador de paz y felicidad interna, y del término químico “amida”. Fue aislado y caracterizado mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear en 1992 por el químico checo Lumir Ondřej Hanuš y el farmacéutico estadounidense William Anthony Devane [1].

La anandamida es un neurotransmisor endocannabinoide, que se incluye dentro de un tipo de lípidos bioactivos conocidos como amidas de ácidos grasos (AAG), y produce efectos similares a los del  $\Delta^9$ -THC o  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, compuesto psicotrópico presente en el cannabis, aunque presenta una estructura química muy distinta. La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), incluye a la AEA dentro del grupo de los eicosanoides, grupo de lípidos derivados del ácido araquidónico y otros ácidos grasos esenciales (AGE) [2].

El descubrimiento de la AEA, así como la caracterización del sistema endocannabinoide, comienza con la búsqueda de los principios activos responsables de los efectos psicoactivos del cannabis. Esto provocó el descubrimiento por Mechoulam y Gaoni [3] en los años 60 de uno de ellos, un derivado del benzopireno, denominado  $\Delta^9$ -THC. Mas tarde se han ido descubriendo diferentes compuestos con actividad similar al THC, los cuales constituyen la familia de los conocidos como cannabinoides.

Al igual que en el caso de los opioides, el aislamiento del THC, molécula con efectos sobre la actividad de nuestro cerebro, orientó la búsqueda hacia los receptores sobre los que actúa dicha sustancia.

En el año 1990 se describe la estructura de un receptor, vinculado a proteínas G, específico para cannabinoides, denominado receptor CB<sub>1</sub> [4]. Este receptor es el más abundante y se extiende por el sistema nervioso central (SNC). Tres años después, 1993, se consiguió describir la existencia de un segundo receptor, el llamado receptor CB<sub>2</sub>, de distribución especialmente extendida en los tejidos del sistema inmunitario [5].

Descubiertos y descritos los receptores específicos para los cannabinoides [6], solo fue cuestión de tiempo el descubrimiento de sus ligandos endógenos, denominados endocannabinoides. Su aislamiento fue difícil, debido a su estructura química y sus características sintéticas, pero en 1992, después de la descripción del receptor CB<sub>1</sub>, se aisló una sustancia lipofílica de características funcionales similares al THC: la etanolamida del ácido araquidónico, también llamada anandamida (AEA).

Desde entonces, se han descrito múltiples moléculas que comparten una estructura básica común (un radical lipídico, habitualmente derivado del ácido araquidónico, y un grupo polar), con efecto sobre los receptores cannabinoides, estando todos ellos clasificados por la UNODC [2].

Finalmente, la secuenciación de los receptores y la identificación de los ligandos endógenos permitió el diseño de antagonistas específicos de los receptores CB, lo que posibilitó acelerar los estudios sobre el papel fisiológico y terapéutico de los cannabinoides, como el descubrimiento de nuevos receptores con los que interactuarían los cannabinoides, como los vanilloides (VR1), los cuales participan en la señalización del dolor [7].

En cuanto al Sistema Endocannabinoide o Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE), se trata de un complejo sistema endógeno de señalización que se encuentra ampliamente extendido en el organismo de mamíferos, interviniendo en diversas rutas metabólicas. Está formado por los receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos o endocannabinoides, las enzimas responsables de la síntesis e inactivación de estos ligandos, las vías de señalización intracelular reguladas por los endocannabinoides y por los sistemas de transporte [Pág. web<sup>1</sup>].

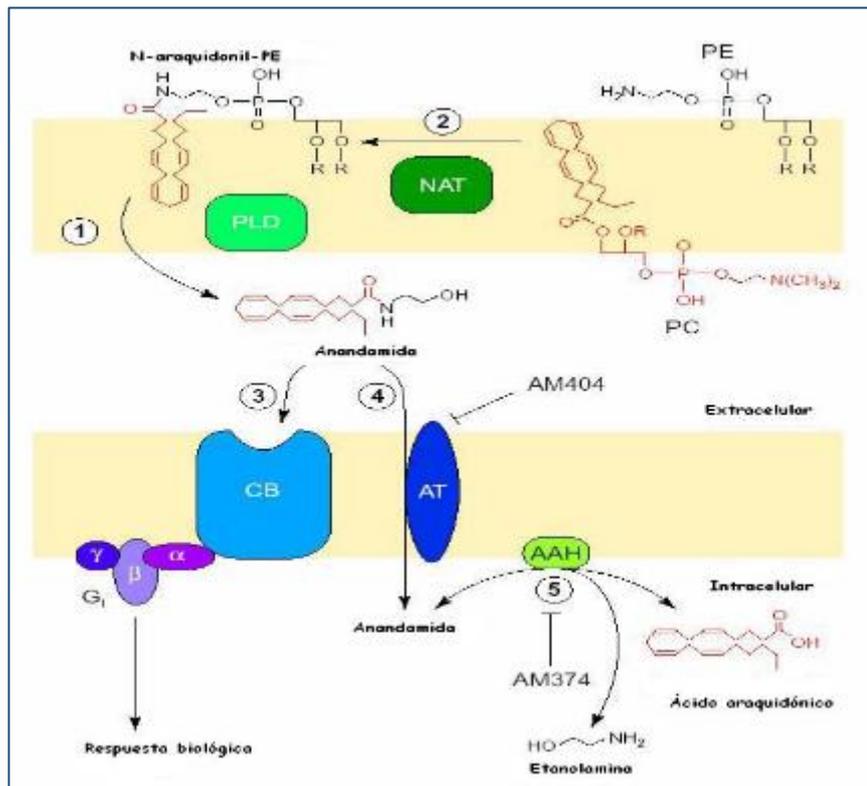
Los dos principales receptores del SCE son el receptor CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Estos receptores son proteínas transmembrana, capaces de transmitir una señal extracelular al interior de la célula. El receptor CB<sub>1</sub> se extiende principalmente en el sistema nervioso central (SNC), aunque también se encuentra en los pulmones, hígado o riñones. En cuanto al receptor CB<sub>2</sub>, se encuentra localizado en su mayoría en el sistema inmune.

La señalización endocannabinoide se encuentra integrada en las redes que modulan la fisiología general del organismo, por lo que regula distintos procesos como pueden ser el apetito, la sensación de dolor, el estado de ánimo, la memoria o el aprendizaje entre otros.

La AEA presenta una afinidad moderada por el receptor CB<sub>1</sub> en comparación con el Δ<sup>9</sup>-THC y presenta la mayoría de los efectos del Δ<sup>9</sup>-THC. En el organismo, se degrada rápidamente por la acción de las amidasas por lo que tiene una corta capacidad de acción. La anandamida se ha aislado tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en los tejidos periféricos de ratas y seres humanos. En el SNC hay concentraciones elevadas de anandamida en el hipocampo, el núcleo estriado y el cerebelo.

La densidad de receptores CB<sub>1</sub> también es elevada en estas áreas y ello hace pensar en un posible papel fisiológico de los cannabinoides endógenos en las funciones cerebrales controladas por las mismas, como las funciones motoras, cognitivas, del humor y la memoria. En el tálamo, aunque la densidad de los receptores CB<sub>1</sub> es baja, también se han detectado concentraciones elevadas de anandamida.

La anandamida se produce en las membranas y tejidos neuronales del cerebro. Para su síntesis, es necesaria la molécula precursora N-araquidonil fosfatidiletanolamida (NAPE). La NAPE se sintetiza a partir del ácido araquidónico (un AGE omega 6), sintetizado a partir del fosfolípido fosfatidilcolina (PC), el cual es una amina libre del fosfatiletanolamina (PE), a través de la acción de la encima N-acetiltransferasa.



Esquema de la síntesis, recaptación y degradación de la Anandamida [8]

- (1) Hidrólisis de NAPE por la PLD
- (2) Síntesis de AEA por una N-aciltransferasa.
- (3) Interacción con el receptor CB
- (4) Recaptación por el transportador de Anandamida (AT)
- (5) Degradación por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH)

La síntesis de anandamida se produce por la hidrólisis del precursor NAPE por efecto del enzima fosfolipasa D, la cual libera ácido fosfatídico y los correspondientes tipos de N-aciletanolaminas, una de las cuales es la anandamida. Esta síntesis se produce a demanda en el organismo, es decir, que al contrario de los neurotransmisores clásicos que se almacenan en vesículas, la anandamida es sintetizada “en el momento” en el que se va a liberar.

Los endocannabinoides no se almacenan en el interior de vesículas como ocurre con los neurotransmisores clásicos, probablemente por su naturaleza hidrófoba. Su almacenamiento se produce en forma de un precursor (fosfolípido de membrana) que es almacenado e hidrolizado posteriormente y se sintetiza cuando su acción es necesaria. Su solubilidad en lípidos les permitiría difundir libremente a través de las membranas y actuar como moduladores de diversas actividades biológicas.

La anandamida es metabolizada muy rápidamente por lo que la duración de su efecto es muy corta. La utilización de inhibidores de su degradación puede prolongar la duración de su efecto farmacológico.

Además de ser generada por nuestro organismo, la AEA se encuentra en distintos alimentos cuyo consumo abusivo puede provocar el aumento de la concentración de AEA en nuestro cuerpo. Actualmente se conoce su presencia en alimentos como el cacao, en especial en la cocoa o cacao fermentado, en el chocolate, en la trufa negra, en los erizos de mar y en diversos tipos de huevas desecadas de peces. Se cree que la anandamida es en parte responsable del placer experimentado al comer chocolate.

## **ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

En la bibliografía consultada se encuentran distintos métodos analíticos para el análisis cualitativo y cuantitativo de la anandamida. Entre los métodos más utilizados se encuentran los de cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) [9-10] y cromatografía de líquidos de alta eficacia con detector de masas (HPLC-MS) [11-15], aunque también se han utilizado otros detectores. [16-18].

En cuanto a la matriz sobre la que se realiza el análisis, la mayoría de los estudios sobre la determinación de AEA han sido realizados sobre tejido cerebral de roedores [9, 12, 14, 16] y sobre muestras humanas, como sangre o plasma [10, 11, 17], en hepatocitos [18], pelo [13], tejido cerebral [14], semen y leche materna [15].

La rápida degradación de la AEA implica una mayor complejidad en el tratamiento y análisis de las muestras, diferente al que se realiza habitualmente para la determinación de otros cannabinoides.

Giulio G. Muccioli y Nephi Stella [9] desarrollaron un método de GC-MS para detectar concentraciones nanomolares de AEA en cerebro de ratón. En su trabajo desarrollan un procedimiento de extracción en fase sólida de un solo paso, algo novedoso pues normalmente eran requeridos varios pasos, consiguiendo así un mayor rendimiento en la cuantificación de la AEA. Los resultados determinaron una concentración de 1,08 nmol / g de AEA al analizar 30 mg de tejido cerebral de ratón.

En relación con los estudios realizados sobre humanos, Alexander A. Zoerner y col. [10] desarrollaron un método de GC-MS/MS altamente específico para la determinación cuantitativa de AEA en plasma de humanos. Para ello se usan varios patrones de AEA deuterados y muestras de sangre humana. Los análisis fueron realizados por ionización química con un espectrómetro de masas. Este método permitió la determinación de anandamida en plasma en el rango de concentración de 4 nM.

En otro trabajo dirigido por Alexander A. Zoerner [11], se desarrolló y validó un método de UPLC-MS/MS (*Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*), con ionización por electrospray en MS, para cuantificar distintos endocannabinoides, entre ellos la AEA, en plasma humano. El método UPLC-MS / MS fue validado de forma cruzada con el método anteriormente mencionado de GC-MS / MS [10] previamente validado para AEA en plasma humano.

Daniel J. Liput y col. [12] desarrollaron un método de HPLC- MS para la cuantificación de AEA y otros ácidos grasos en tejido cerebral de roedores. Los analitos se detectaron usando ionización por electrospray en modo ion positivo monitorizado en un espectrómetro de masas cuadrupolar. Mediante este método se obtuvo una alta tasa de recuperación de AEA y como resultado un límite de cuantificación de 1.4 ng/ mL.

En otro estudio realizado por Christopher Mwanza y col. **[13]** se estableció un método para la determinación simultánea de distintos cannabinoides endógenos, entre los que se encuentra la AEA, y glucocorticoides en muestras de pelo humano. Los análisis fueron realizados con HPLC asociado a espectrometría de masas en tándem con ionización química en modo ion positivo a temperatura ambiente. (HPLC-APCI-MS/MS). La respuesta fue lineal para un rango de 3.0 a 250 pg/mg de AEA, mientras que el límite de detección fue de 1.5 pg/mg para el AEA.

También se ha conseguido determinar la concentración de AEA en distintas regiones del cerebro humano, como se observa en el estudio realizado por Christian C. Felder y col. **[14]**. Mediante un método de LC-MS/MS se determinaron concentraciones desde 25 pmol/g en el cerebelo hasta 148 pmol/g en el hipocampo.

En fluidos humanos, en concreto semen y leche materna, también se ha conseguido determinar la concentración de AEA mediante un método de HPLC-MS desarrollado por Herbert Schuel y col. **[15]**, obteniéndose unas concentraciones de  $12.1 \pm 2.1$  nM en el semen y de  $5.1 \pm 2.1$  nM en leche materna.

Otro método de determinación de AEA en el cerebro de ratas fue desarrollado por Yoshiko Arai y col. **[16]** basado en una pre-columna de derivatización de fluorescencia seguido de columna acoplada de HPLC. El límite de detección fue de 10 femtomol y se determinó una concentración de AEA en el cerebro de rata de  $3.37 \pm 0.73$  pmol/g.

Schmidt A. y col **[17]** validaron y aplicaron un método para la determinación de anandamida en plasma humano mediante una extracción líquido-líquido en fase inversa, HPLC y detección por fluorescencia. Los resultados fueron lineales para concentraciones entre 1 y 15 ng/ml y el límite de detección fue de 1 ng/ml.

En cuanto al uso de un detector de UV/Vis, Boris Yagen y Sumner Burstein **[18]** pusieron a punto un método de HPLC-UV para la determinación de AEA, la cual fue sintetizada para el estudio a partir de ácido araquidónico y etanolamina. Posteriormente, se aplicó este método para la determinación de AEA en tejido hepático. La respuesta fue lineal para un rango de concentraciones de AEA de 1 a 10 nmol, mientras que el límite de detección fue de 15 pmol.

## **OBJETIVOS**

Se ha realizado un estudio para tratar de llevar a cabo la determinación de anandamida mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y de líquidos con detector ultravioleta visible (HPLC-UV) y de fluorescencia (HPLC-FL) con el fin, dadas las características del compuesto, de:

1. Estudiar métodos de determinación alternativos a los de GC-MS y HPLC-MS.
2. Evaluar las dificultades que presenta el tratamiento y manipulación de este compuesto.
3. Realizar un breve estudio sobre las necesidades que implicaría poner a punto un procedimiento que llevara implícito un estudio sobre muestras biológicas.

## **TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANANDAMIDA**

### **Técnicas de separación**

#### **Cromatografía (de líquidos y de gases)**

Según define la IUPAC, la Cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve.

En nuestro caso, hemos utilizado dos modalidades de esta técnica: La cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos, más concretamente, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). La principal diferencia entre ambas técnicas es la fase móvil, en el primer caso es un gas, mientras que en el segundo es un líquido.

**La cromatografía de gases (GC)** se trata de un método físico de separación por elución en el que la fase móvil es un gas. La muestra que analizar se introduce en un vial, el cual será inyectado en sistema cromatográfico. Al entrar en el sistema, la muestra se volatiliza y se introduce a la columna arrastrada por el gas portador. En la columna se produce la separación de los distintos analitos según su interacción con la fase estacionaria, los cuales saldrán de ésta separados y llegarán a un detector. En el detector se produce una señal característica de cada analito que se registra y refleja en el cromatograma obtenido, permitiendo su cualificación y cuantificación.

**La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)** es un método físico de separación por elución en el que la fase móvil es un líquido. La muestra se inyecta en el sistema cromatográfico y mediante un sistema de bombeo pasa a la columna, donde los analitos se separan dependiendo de su afinidad por los componentes de la fase móvil y el sólido de la fase estacionaria en la columna. Estos analitos eluyen a distinta velocidad y en consecuencia llegando a diferentes tiempos al detector, produciendo una señal característica para cada uno de los analitos, la cual se registra y visualiza en un cromatograma, permitiendo un análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra.

## **Técnicas de detección**

### **1. Espectrofotometría de absorción molecular UV/Vis**

Esta técnica, se basa en la medición de la absorción de radiación ultravioleta y visible por parte de los analitos de nuestra muestra. Es un método de detección que, como en nuestro caso, es utilizado junto a la técnica de separación.

### **2. Espectrometría de fluorescencia (FL)**

Esta técnica, también llamada fluorometría o espectrofluorometría, se basa en la absorción de radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, por los componentes de una muestra. Parte de la radiación absorbida es emitida, a tiempos no superiores a  $10^{-6}$ s, a longitud de onda mayor. Como en el caso anterior es un método de detección que vamos a aplicar unido a una técnica de separación

### **3. Detector de ionización de llama (FID)**

Consiste en un quemador de hidrógeno/oxígeno al cual llega el gas portador con el analito procedente del cromatógrafo y se mezclan con hidrógeno. El gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica que produce una llama a elevada temperatura. A estas temperaturas, la mayoría de los compuestos orgánicos se ionizan y generan una diferencia de potencial entre el quemador y un electrodo colector situado encima de la llama. Esta diferencia de potencial es amplificada y registrada permitiendo la detección de los compuestos de una muestra.

## **EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS**

### Equipos

<b><i>Espectrómetro UV-Vis</i></b>	
<b>Equipo</b>	HEWLETT PACKARD AGILENT 8453
<b>Medio</b>	Neutro
<b>Cubeta</b>	Cuarzo y vidrio
<b>Lámparas</b>	Deuterio y wolframio (Tungsteno)

<b><i>Espectrofotómetro de Fluorescencia</i></b>	
<b>Equipo</b>	HITACHI F- 3000
<b>Medio</b>	Neutro
<b>Cubeta</b>	Cuarzo
<b>Lámpara</b>	Xenón

<b><i>Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia</i></b>	
<b>Equipo</b>	Agilent 1200
<b>Columna</b>	Columna KROMAPHASE C18 5 x 150 mm x 4.6 mm
<b>Fase móvil</b>	Agua, Acetonitrilo, Metanol y Ácido acético

<b><i>Cromatógrafo de gases</i></b>	
<b>Equipo</b>	Agilent Technologies 6890N
<b>Columna</b>	GC Columna Capilar BP x 1.6 m x 0.53 mm x 2.650 m
<b>Gas portador</b>	Nitrógeno

### Reactivos

- Anandamida (AEA): 5 mg de pureza  $\geq 97\%$ , en forma de sólido aceitoso adquirido en la casa Sigma – Aldrich.
- Etanol Absoluto 99,8 %, PanReac AppliChem.
- Acetonitrilo 99,9 %, PanReac.
- Acetona  $\geq 99,9\%$ , Sigma – Aldrich.
- Hexano 96%, Scharlau.
- Agua desionizada.

## **PROCEDIMIENTOS PREVIOS**

### **Preparación de patrones**

La muestra original de anandamida consistía en 5 mg de AEA de una pureza  $\geq 97\%$ , en forma de sólido aceitoso amarillento. Con esta muestra se preparó una disolución madre de 500 ppm en etanol, disolviendo los 5 mg de AEA en 10 ml de etanol.

A partir de esta disolución se realizaron todas las demás con las que se ha trabajado, tomando alícuotas de esta disolución y enrasando al volumen adecuado.

Se preparan patrones de AEA en etanol de concentración decreciente a partir de la de 500 ppm, de las siguientes concentraciones (ppm): 50, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.05

Se prepararon también disoluciones de referencia en otros disolventes para evaluar el comportamiento, estabilidad y capacidad de respuesta de nuestro analito en distintos medios. Los disolventes elegidos fueron hexano, acetona y acetonitrilo. La preparación se realizó de la misma manera para cada disolvente mencionado, partiendo de la disolución madre de 500 ppm de AEA en etanol, preparando disoluciones de concentración decreciente. Se obtuvieron *patrones* de las siguientes concentraciones para cada disolvente (ppm): 100, 20, 4, 0.8, 0.16.

### **Estudio de la capacidad de absorción por espectroscopia UV/Vis**

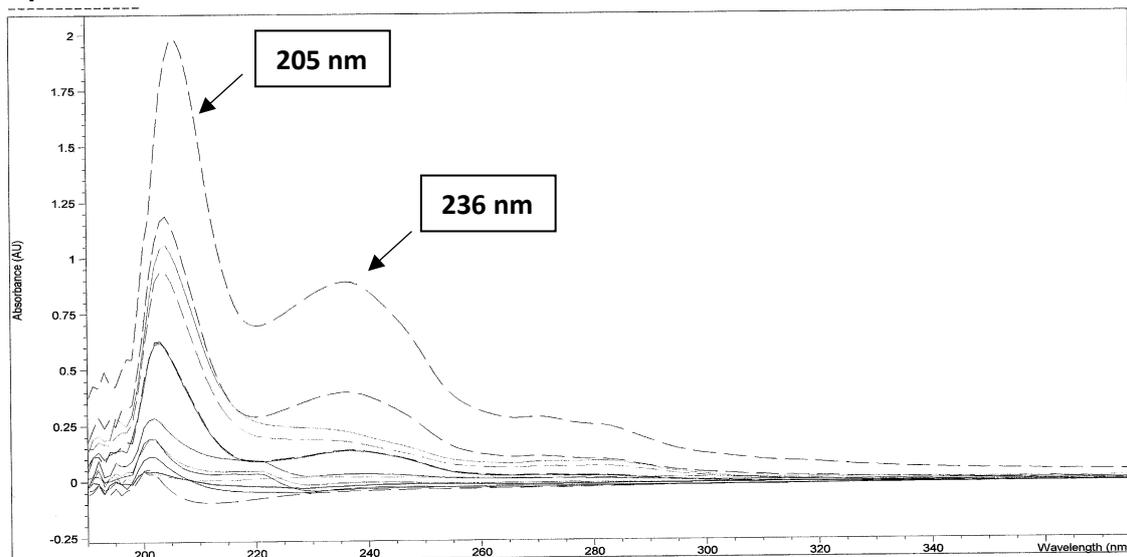
Se ha realizado un estudio para determinar la longitud de onda óptima de absorción de la AEA en los distintos disolventes y así obtener las condiciones idóneas de medida por HPLC-UV.

Para ello se toman los distintos patrones de cada disolvente y se realizan inicialmente barridos entre 200 y 800 nm frente a los blancos correspondientes.

En los espectros obtenidos, se observan dos bandas. Una de ellas con máximo a 205 nm y la otra a 236 nm. La primera banda presentaría mayores problemas para trabajar ya que a esa longitud de onda son un gran número de compuestos los que absorben. Por lo tanto y con el fin de mejorar en selectividad, se ha seleccionado la longitud de onda de 236 nm para posteriores análisis.

A continuación, se muestra el espectro obtenido en etanol (**Fig. 1**) y los espectros correspondientes a los demás disolventes se presentan en el anexo (**Espectros 1-3**). Las bandas de absorción obtenidas se producen a las mismas longitudes de onda en todos los disolventes utilizados.

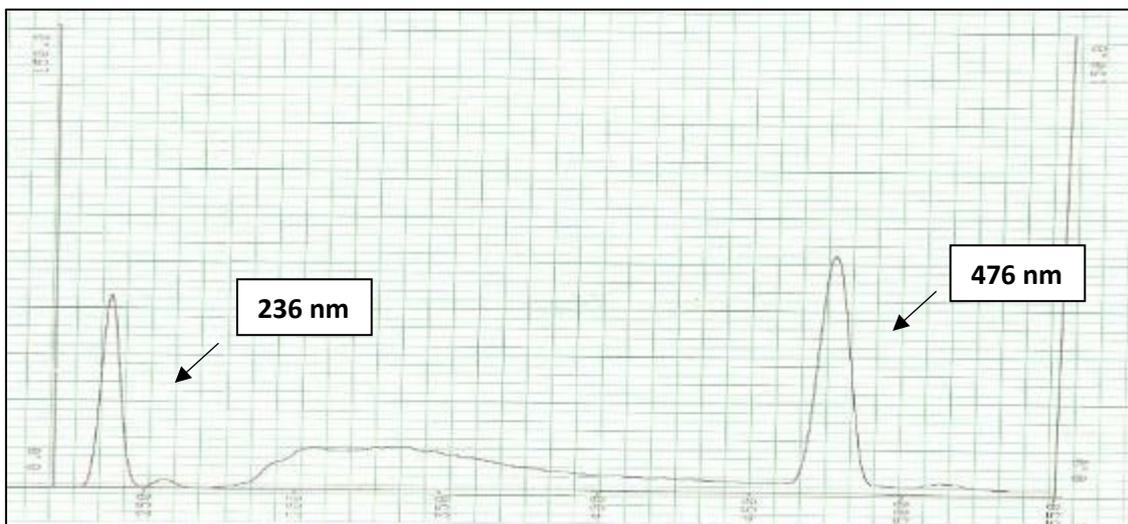
### Espectro UV Etanol



**Fig. 1.-** Espectro correspondiente a disoluciones de AEA en etanol de concentraciones 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50

### Estudio por espectroscopía de fluorescencia

Mediante esta técnica se han realizado barridos para determinar las longitudes de onda de emisión y de excitación de la AEA en los distintos disolventes. Del espectro obtenido, se ha podido concluir que, para una longitud de onda de excitación de 236 nm, la longitud de onda de emisión es de 476 nm. **(Fig.2)**



**Fig. 2:** Espectro de fluorescencia para 0.5 ppm de AEA en etanol

## ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO CON DETECTOR UV/VIS (HPLC-UV/VIS)

### *Estudio de la fase móvil*

En primer lugar, se ha fijado la longitud de onda para el análisis a 236 nm, determinada en los ensayos previos por espectroscopia UV-visible.

Se han estudiado fases móviles en régimen isocrático de diferente composición en sus componentes, seleccionándose tres fases móviles para realizar el análisis:

**Fase móvil 1:** 60 % Acetona, 30 % H<sub>2</sub>O, 10 % MeOH

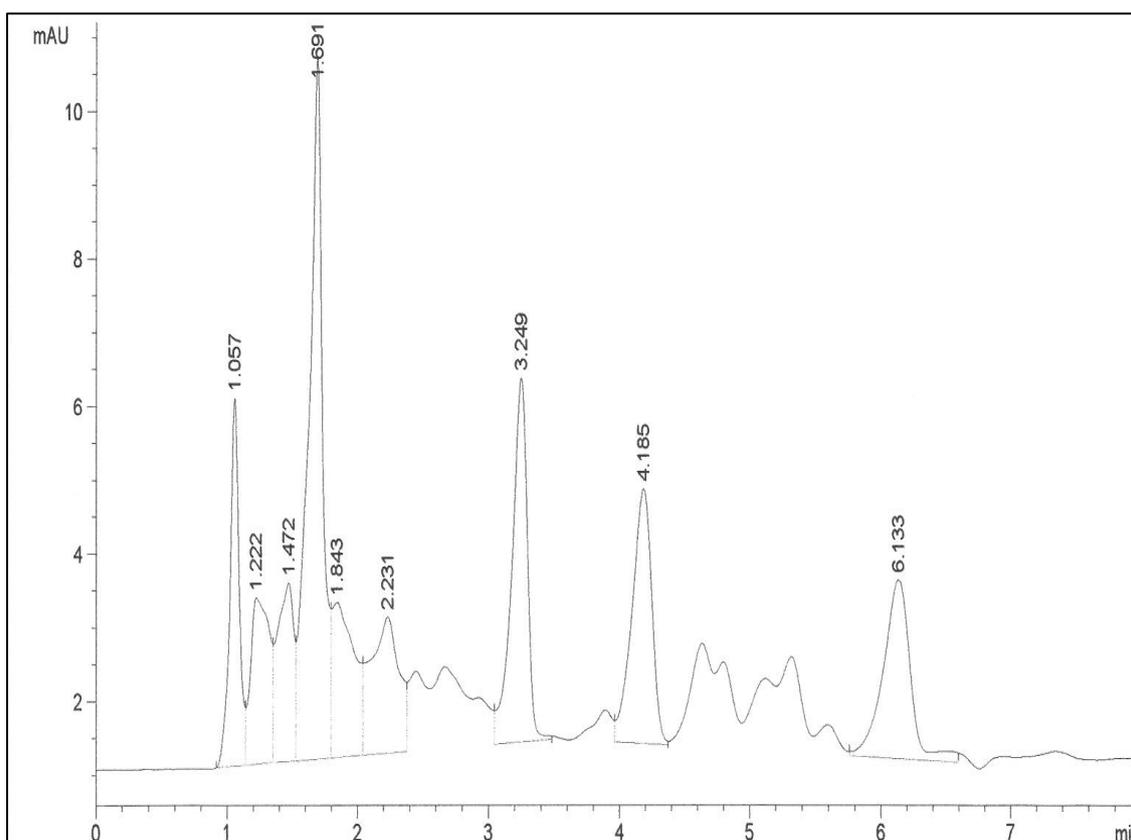
**Fase móvil 2:** 10 % MeOH, 10 % Acetonitrilo, 10 % Ácido Acético, 70 % H<sub>2</sub>O

**Fase móvil 3:** 50 % H<sub>2</sub>O, 10 % MeOH, 30 % Acetonitrilo, 10 % Ácido Acético

Los mejores resultados se obtienen utilizando la fase móvil 1, la cual es la más utilizada en la bibliografía consultada, obteniéndose los cromatogramas más representativos.

### **Resultados**

De los cromatogramas obtenidos (**Fig.3**) y (**Anexo Cromatogramas 1-9**), se pueden extraer las siguientes conclusiones:



**Fig. 3:** 0.5 ppm de AEA en etanol con Fase móvil 1.

- Parece ser que se produce una rápida degradación, derivada de diversos factores, que pueden estar asociados a la composición de las fases móviles o a la modificación de la temperatura desde su almacenaje (4°C) hasta su llegada al detector, provocando la aparición de numerosos picos en los cromatogramas obtenidos.
- Al carecer de detector de masas, no nos ha sido posible la identificación de estos compuestos de degradación por lo que no podríamos determinar con precisión que picos se corresponden a cada compuesto.
- Debido a los distintos equilibrios establecidos para la degradación de anandamida, los cromatogramas son poco reproducibles por lo que los picos obtenidos no nos proporcionan resultados concluyentes.

Por tanto, los ensayos que hemos realizados por HPLC-UV/Vis nos llevan a la conclusión de que dicha técnica con detector de UV/Vis no sería la más adecuada.

## ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC-FL)

### *Estudio de la fase móvil*

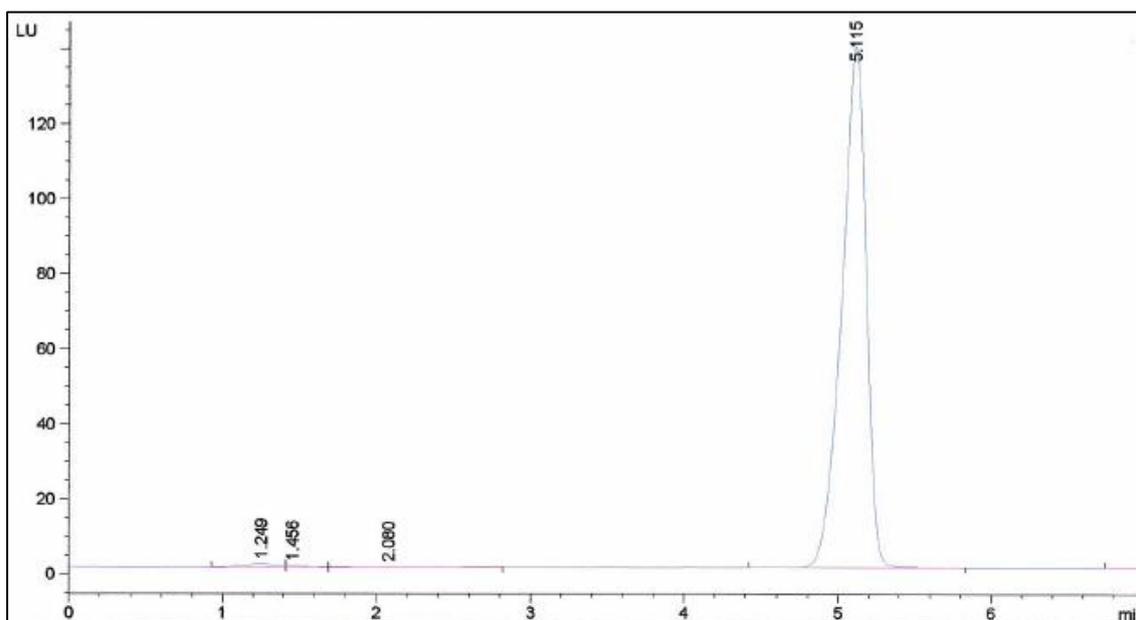
Los ensayos realizados mediante esta técnica han sido realizados fijando la longitud de onda de emisión a 476 nm y la longitud de onda de excitación a 236 nm. La fase móvil utilizada en régimen isocrático fue la que, en apariencia, nos proporcionó cromatogramas más reproducibles con el detector de UV/Vis:

**30 % H<sub>2</sub>O, 60 % Acetonitrilo, 10 % MeOH.**

Se utilizan dos disolventes como medio: etanol y acetonitrilo. Los demás disolventes, hexano y acetona, no han sido utilizados ya que presentan incompatibilidades con la columna.

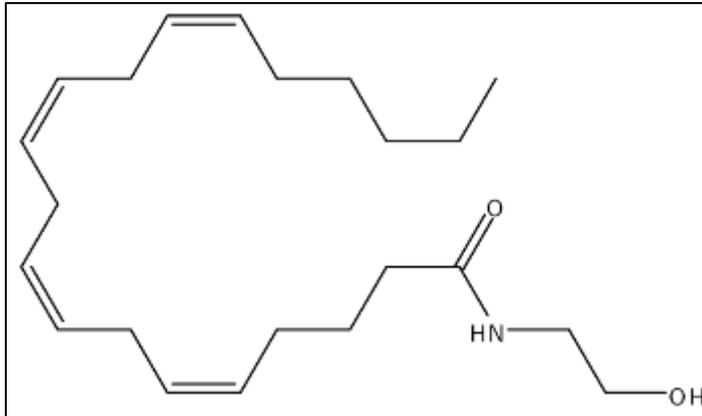
Las conclusiones aplicables a esta técnica en cuanto a la identificación se podrían asemejar a las indicadas anteriormente: el compuesto parece degradarse en otros productos, aunque como es lógico el número de picos es muy inferior al obtenido con detector UV/Vis pues posiblemente serán menores las especies fluorescentes que las que absorben en UV/Visible y en su caso de diferente intensidad en función de la longitud de onda de absorción.

A continuación, se presenta **Fig.4**, donde se presenta la respuesta a una muestra inicial de 5 ppm de AEA en etanol, obteniéndose un pico perfectamente desarrollado a 5 minutos. El resto de las experiencias se muestran en el apartado de Anexos (**Cromatogramas 10-18**).

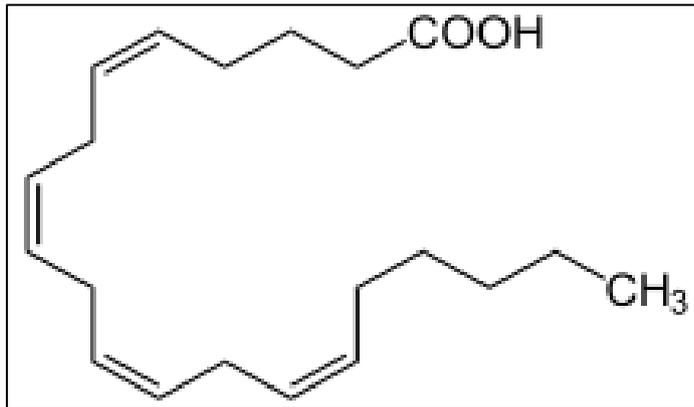


**Fig.4:** 5 ppm de AEA en etanol

Como conclusión diríamos que el método de HPLC con detector fluorimétrico es más adecuado por su carácter más selectivo. Sin embargo, dado que el proceso de degradación del AEA origina ácido araquidónico, de estructura muy similar a nuestro compuesto, el carácter fluorescente podría ser también debido a este compuesto.



**Anandamida**



**Ácido araquidónico**

## **ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR FID (CG-FID)**

Esta técnica es ampliamente utilizada en los laboratorios de análisis de estupefacientes, aunque en los estudios de investigación está más extendido el detector de espectrometría de masas ya que ofrece resultados que permiten la caracterización de la mayor parte de los compuestos presentes en la muestra.

### ***Preparación de patrones***

Las muestras que se introducirán en el equipo han sido preparadas de la misma forma que las utilizadas en HPLC-UV y HPLC-Fluorescencia. Se tomaron las distintas disoluciones y se llenaron viales opacos, los cuales se etiquetaron y fueron introduciéndose en el sistema.

### ***Estudio de las condiciones óptimas del sistema***

Una vez preparados los distintos viales, se procedió a realizar un estudio sobre las condiciones óptimas de operación para la determinación de AEA. Se han estudiado distintas temperaturas en inyector y horno, trabajando a diferentes rampas de temperatura.

Los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones que se muestran a continuación:

#### **Condiciones 1**

##### **Portal de inyección**

Temperatura del inyector: 275 °C

Volumen de inyección: 0.2 µl

##### **Horno**

Temperatura inicial: 100 °C

Temperatura final: 275 °C

Rampa de temperatura 1: 70°C/min

##### **Detector**

Temperatura del detector: 275 °C

#### **Condiciones 2**

##### **Portal de inyección**

Temperatura del inyector: 275 °C

Volumen de inyección: 0.2 µl

##### **Horno**

Temperatura inicial: 50 °C

Temperatura final: 275 °C

Rampa de temperatura: 10 °C/min

##### **Detector**

Temperatura del detector: 275 °C

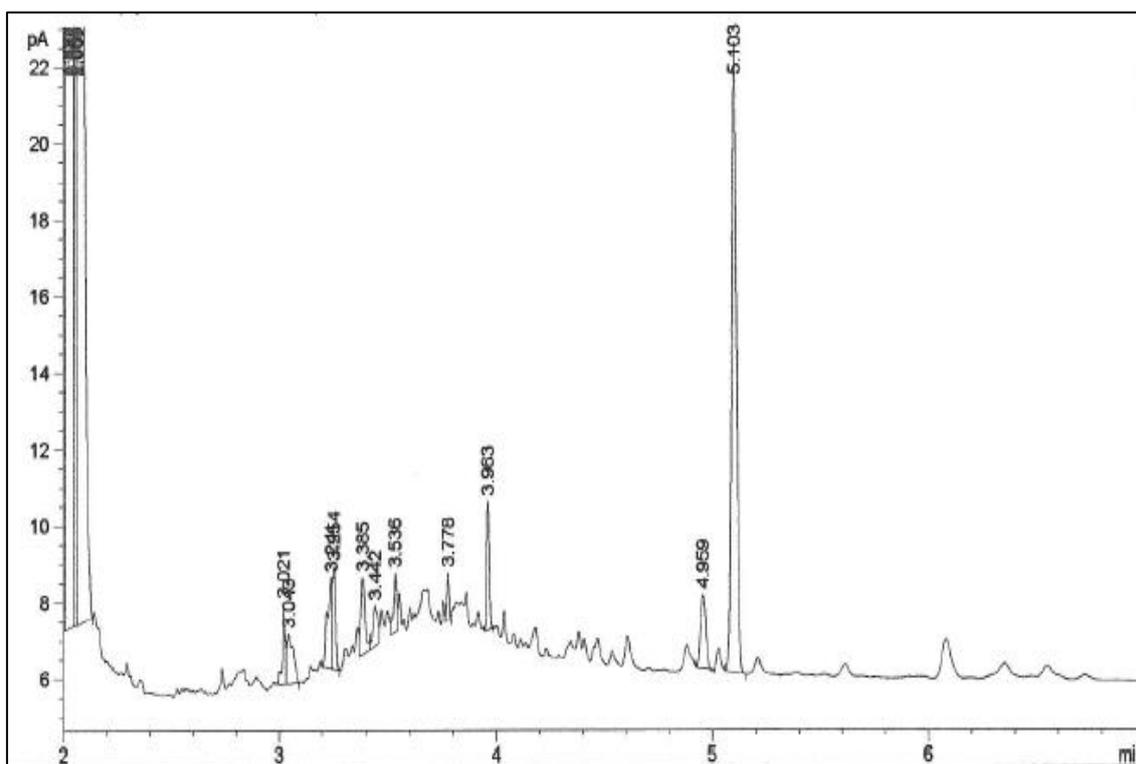
## Resultados

Los resultados obtenidos por CG-FID han sido más precisos que los obtenidos con HPLC ya que se han conseguido obtener cromatogramas más reproducibles, que muestran un pico más definido que posiblemente se correspondería con un producto de degradación de la AEA y que podría servir como referencia para un ensayo presuntivo.

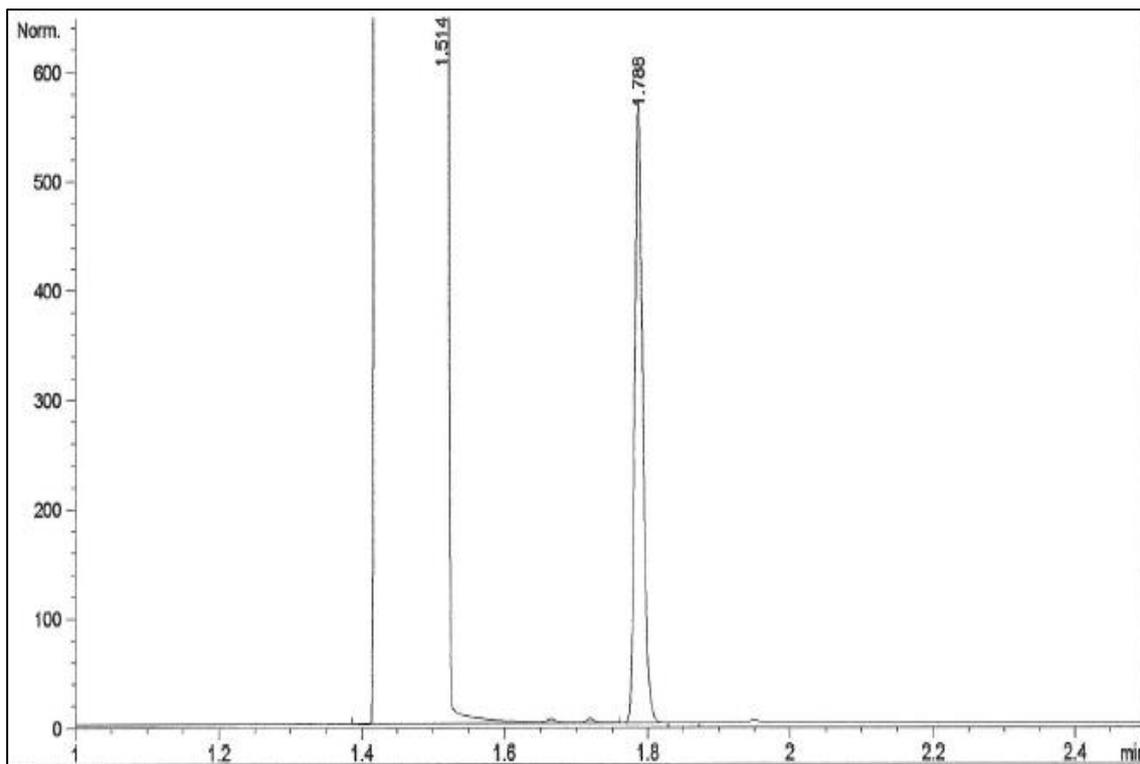
En este caso, se han realizado ensayos con todos los disolventes utilizados como medio: etanol, acetonitrilo, hexano y acetona.

Los resultados más reproducibles y precisos se han obtenido utilizando etanol y acetonitrilo como disolvente, ya que los demás nos originan mayores interferencias y menor reproducibilidad.

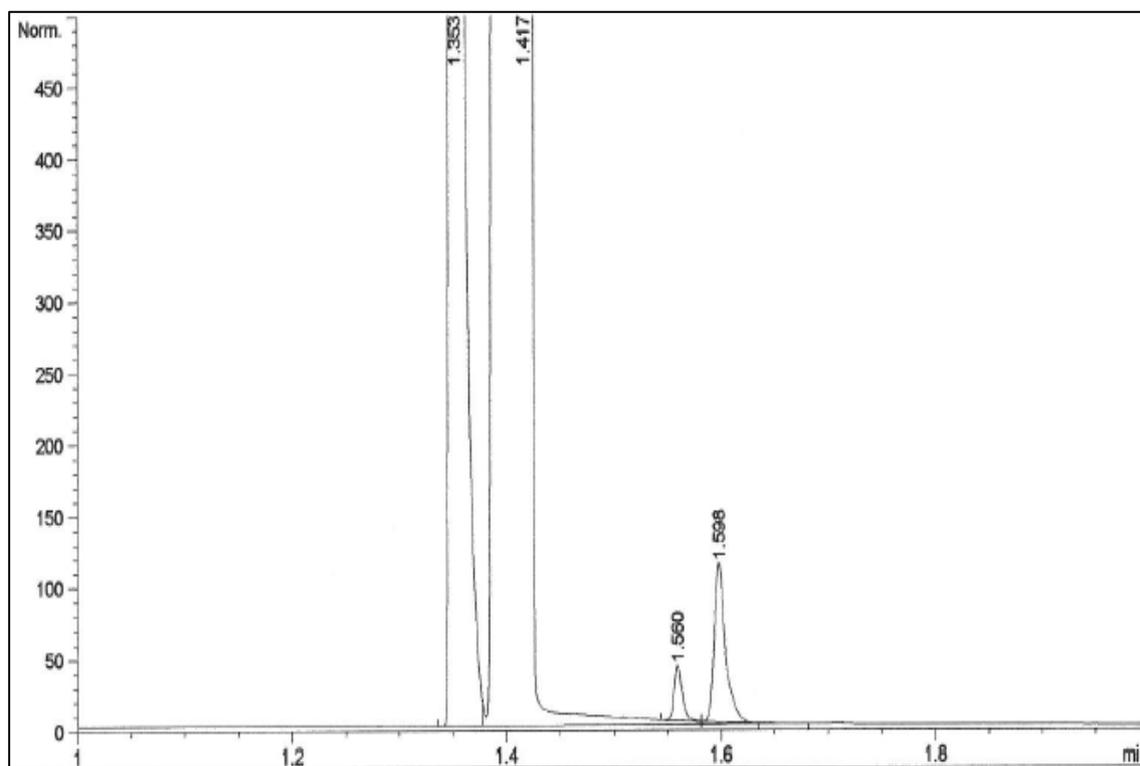
Los resultados se reflejan en las **Fig. 5,6,7**, y en el Anexo (**Cromatogramas 19-35**).



**Fig.5:** Resultados obtenidos para muestra de 0.5 ppm de AEA en etanol con *condiciones 1*



**Fig. 6:** Resultado obtenido para muestra de 50 ppm de AEA en etanol en *condiciones 2*



**Fig. 7:** Resultado obtenido para muestra de 20 ppm de AEA en acetonitrilo en *condiciones 2*

Se ha conseguido obtener picos que pueden indicarnos la presencia de AEA en distintos disolventes, aunque no han sido ensayos suficientemente consistentes como para establecer si se corresponde estrictamente con este compuesto o con alguno de sus productos de degradación.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestras experiencias, nos planteamos la realización de un estudio sobre un proyecto teórico, de puesta a punto de un método de determinación de AEA. En este proyecto se tendrán en cuenta los equipos y medios referidos en la bibliografía para muestras de tipo biológico debido a que es en este tipo de muestras donde la AEA parece se encuentra mayoritariamente y donde quizás es de mayor interés su determinación, dados los efectos de este cannabinoide.

## **PROYECTO DE PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE AEA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

El desarrollo de técnicas analíticas rápidas, precisas y reproducibles para supervisar y controlar los endocannabinoides y lípidos relacionados se trata de un proceso muy importante en los controles preclínicos y clínicos de los agentes que modulan el sistema endocannabinoide.

Como ya se ha comentado, debido al estudio que se ha realizado sobre la determinación de AEA y a la existencia de dificultades por la degradación del compuesto y la falta de medios para su correcta determinación y caracterización, se ha procedido a realizar el planteamiento de un breve proyecto para la determinación de AEA en tejidos biológicos.

Para ello, se han consultado algunos estudios bibliográficos sobre la determinación de AEA en este tipo de muestras y, de esta forma, evaluar lo que supondría poner a punto en un laboratorio el método en cuestión y validarlo, considerando a estos efectos los medios utilizados, instrumentales y reactivos, así como sus costes.

En concreto, se han tenido en cuenta dos métodos basados en dos trabajos independientes correspondientes a Giulio G. Muccioli [9] y Daniel J. Liput. [12], utilizándose en cada uno de ellos, las técnicas de separación cromatográfica siguientes:

- Cromatografía de gases + Espectrometría de masas (CG-MS) [9]
- Cromatografía de líquidos de alta eficacia + Espectrometría de masas de ionización por electrospray (HPLC-MS) [12]

La **espectrometría de masas** se trata de una técnica de análisis que permite determinar con precisión la composición de compuestos químicos, así como de isótopos, mediante la separación de los núcleos atómicos según su relación masa-carga ( $m/z$ ). Se distinguen distintas etapas en la determinación de masas, como son la generación de fragmentos moleculares y átomos en fase gaseosa, la ionización de estos, la separación en función de su relación  $m/z$  y la detección de los iones.

El cuadrupolo se trata de un analizador de masas, el cual separa los iones por su relación  $m/z$ . Consiste en cuatro barras metálicas cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Los iones son acelerados entre las barras y la mayor parte de ellos inciden en estas, siendo solo los que tienen un determinado valor de  $m/z$  los que llegan al detector.

Con estos métodos, en principio, se podrían solucionar los problemas y dificultades encontradas durante nuestro estudio experimental ya que se podría lograr una determinación más precisa y eficaz. Sin embargo, el coste operacional aumentaría en gran medida debido al uso de equipos más sofisticados y la inclusión de etapas previas de extracción y purificación de la AEA.

Ambos estudios bibliográficos de referencia han orientado el estudio a la determinación en cerebro de ratones, al igual que en nuestro proyecto, incidiendo en este planteamiento por las siguientes razones:

- a) Debido a que la AEA es de síntesis endógena en el organismo, conviene su estudio en el tejido cerebral ya que es ahí donde su determinación podría utilizarse con fines de interés biológico y sanitario.
- b) El estudio se realizaría sobre ratones, ya que permite un manejo y obtención de muestra más sencillo que con otros mamíferos, además de permitir la posibilidad de administrarles inhibidores de AEA, lo cual facilitaría un estudio biológico sobre la acción inhibidora de dicho compuesto y sus posibles aplicaciones.
- c) Los resultados y el método una vez validado se podrían extrapolar, con las debidas matizaciones, a tejidos humanos.

## HPLC-MS

En primer lugar, se hace referencia a la puesta a punto de un método por **HPLC-MS** para la determinación de AEA y lípidos relacionados en tejido cerebral de ratones, que permite una exactitud y precisión aceptable, además de una buena reproducibilidad.

El estudio [12] describe, para una cantidad mínima de tejido cerebral (50 mg), el primer método validado para cuantificar una combinación de analitos entre los que se encuentra el AEA. Se inicia con un procedimiento de extracción de proteínas seguido de su determinación por cromatografía de líquidos con detector de masas de un cuadrupolo.

Este procedimiento de determinación se divide en una primera fase de **extracción** de la AEA del tejido cerebral para pasar a la introducción de la muestra al sistema HPLC-MS. El procedimiento inicialmente consiste en un **método de precipitación de proteínas**:

El tejido cerebral se homogeniza con una disolución salina en un tubo de microcentrifuga introducido en un baño de ultrasonidos, para después tomar 100 µl de esta muestra homogeneizada que se llevan a un nuevo tubo de micro centrifuga al que se añade 1 ml de acetonitrilo.

Las muestras se agitaron y centrifugaron, recogiendo los extractos de acetonitrilo y evaporando el disolvente en atmosfera de N<sub>2</sub>. El residuo seco se vuelve a disolver en 100 µl de acetonitrilo, para insertarlos en el automuestreador y proceder a su determinación por HPLC-MS.

Una de las ventajas que presenta el análisis por HPLC es que no es necesaria una etapa de derivatización, lo cual permite un ahorro de tiempo y costes en pasos previos al análisis. Además de esto, los sistemas LC-MS presentan una sensibilidad del rango de fmol y en muchos casos podrían ofrecer una mayor sensibilidad que CG-MS para la medida de endocannabinoides y lípidos relacionados.

Los sistemas MS-MS presentan ventajas frente a los sistemas MS para la medida de endocannabinoides y compuestos relacionados, como un incremento de la selectividad y de las señales respecto al ruido de fondo (sensibilidad). Sin embargo, los sistemas de un único cuadrupolo pueden ser la única opción disponible para muchos laboratorios, debido a que la utilización de más de un cuadrupolo u otros sistemas acoplados aumentaría en exceso el coste de un método que ya de por sí es bastante caro. Por ello, el desarrollo de métodos con un sistema con un único cuadrupolo es valioso y se ajusta a lo necesario.

Otro factor determinante son las posibles interacciones entre la matriz biológica y los analitos, las cuales se deben tomar en consideración al desarrollar métodos analíticos. Estas interacciones pueden provocar interferencias en la señal y errores de cuantificación, por lo que debe ser especialmente importante la realización de una extracción eficaz.

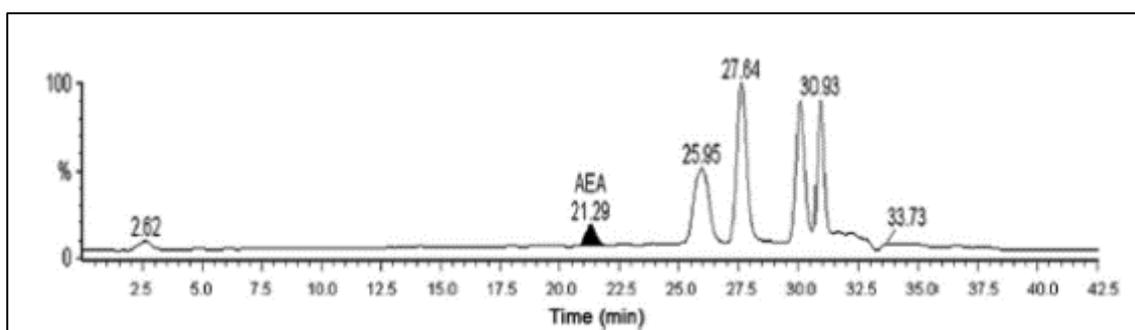
Como fase móvil para HPLC, los autores, utilizaron dos fases distintas:

**Fase móvil A**, formada por una mezcla en metanol de acetato amónico (1 mM) y ácido acético (0.1 %) (v/v).

**Fase móvil B**, formada por una mezcla en agua de metanol (5%), acetato amónico (1 mM) y ácido acético (0.1 %) (v/v).

En cuanto a los resultados obtenidos en este estudio, se fijó la detección para la AEA en una fracción  $m/z$  de 348.28  $[M+H]^+$ , correspondiente al ion precursor, con un tiempo de permanencia de 0.3. El tiempo de retención que presentó la AEA fue de 21.29 min. y el límite de detección obtenido fue de 1,4 ng/ml para la AEA.

Los resultados se muestran en la **Figura 7**:



**Figura 7:** Tiempo de retención de la AEA para un cromatograma representativo de HPLC-MS [12].

A continuación, en la **Tabla 1**, se expone un balance de lo que podrían ser los costes mínimos asociados a la puesta a punto de un método de determinación de AEA en condiciones similares a las descritas anteriormente:

**Tabla 1:**

<b>HPLC-MS</b>			
	<b>Precio (€) /unidad</b>	<b>Unidades</b>	<b>Precio (€)</b>
<b>REACTIVOS</b>			
Metanol para HPLC ≥ 99.9 % (2.5 L)	53,00 €	1	
Acetonitrilo HPLC ≥ 99.9 % (2.5 L)	234,00 €	1	
Ácido Acético ≥ 99.5 % (2.5 L)	141,00 €	1	
Acetato amónico ≥ 99.9 % (250 g)	39,40 €	1	
Etanol para HPLC ≥ 99.8 % (2.5 L)	343,50 €	1	
Patrón AEA ≥ 97 % 5 mg	103,00 €		
		Total Reactivos	913,90 €
<b>MATERIAL FUNGIBLE</b>			
Viales Vidrio (100 unidades)	43,75 €		
Vasos de precipitados 250 ml	8,85 €	5	44,25 €
Matraz aforado 250 ml	17,42 €	2	34.84
Pipeta 1 ml	1,60 €	1	
Pipeta 2 ml	1,60 €	1	
Botes almacenamiento (10 unidades 30 ml)	10,95 €		
Tubos de micro centrifuga (500 unidades)	14,45 €		
Bombona N <sub>2</sub> 50 L	294,95 €	1	
Columna C18 (2.1 mm x 150 mm, 5 µm)	658 €	1	
Columna C18 (2.1 mm x 10 mm, 3.5 µm)	368,79 €	1	
		Total Fungible	1.473,18 €
<b>MATERIAL INVENTARIABLE</b>			
Equipo de destilación de agua	9.645,20 €	1	
Equipo de ultrasonidos	3.882,05 €	1	
Agitador Vortex	167,20 €	1	
Micro centrifuga	520 €	1	
Equipo HPLC con inyector automático	42.350 €	1	
Detector MS 1 cuadrupolo con sonda ESI	50.000 €	1	
		Total Inventariable	106.564,45 €
		<b>TOTAL</b>	<b>108.951,53 €</b>

## GC-MS

Una vez analizadas las características de la puesta a punto del anterior método por HPLC, se procede a plantear un estudio similar con uno de los métodos propuesto por **GC-MS [9]** para la determinación de AEA, en tejido cerebral de ratones.

En este estudio se muestra un procedimiento de extracción de AEA en fase sólida con un solo paso de purificación, antes de la introducción de la muestra al sistema CG-MS para su cuantificación.

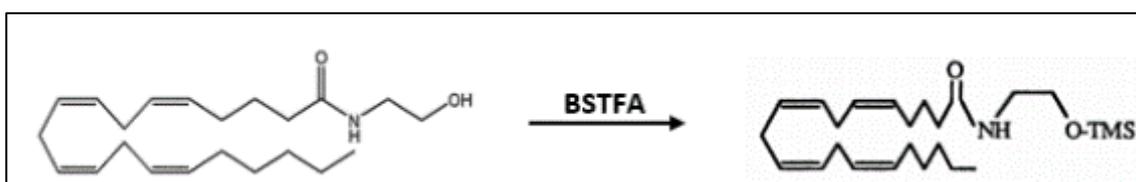
Inicialmente se trata la muestra de tejido con  $\text{CHCl}_3$ , se homogeneiza mediante ultrasonidos, se toma una alícuota de la disolución y se le añade una cantidad conocida de patrón deuterado de anandamida en  $\text{CHCl}_3$ . A continuación se procede a realizar la **extracción de Folch**: A la disolución resultante en  $\text{CHCl}_3$ , se añade metanol y PBS (*phosphate buffered saline*), en la relación 4:2:1 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , v/v/v). La mezcla se agita en ultrasonidos para aumentar el rendimiento de la extracción, se centrifuga para separar las fases y se recupera la fase orgánica, evaporando el disolvente en atmosfera de  $\text{N}_2$ .

El residuo seco se disuelve en 2 ml de  $\text{CHCl}_3$  mediante agitación (cinco minutos) a temperatura ambiente antes de la **extracción en fase sólida**:

Las columnas de extracción en fase sólida fueron auto fabricadas usando pipetas Pasteur rellenas de una suspensión de sílice en  $\text{CHCl}_3$ . Las columnas se acondicionaron con  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Las muestras disueltas en  $\text{CHCl}_3$  se pasan a través de las columnas. La AEA retenida, se eluye con 2 ml de acetato de etilo/acetona (1:1), procediendo a continuación a la derivatización del compuesto con *N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida* (BSTFA) durante cincuenta minutos a  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . Después de la evaporación del exceso de BSTFA en atmosfera de  $\text{N}_2$ , la muestra recogida se disolvió en hexano ( $100\ \mu\text{l}$ ) y se mantiene a baja temperatura,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta su análisis por GC-MS.

La derivatización realizada con BSTFA, que se trata del proceso conocido como sililación, modifica químicamente el compuesto dando lugar a otro por sustitución de hidrógenos activos por grupos trimetilsilil (TMS). (**Figura 8**)

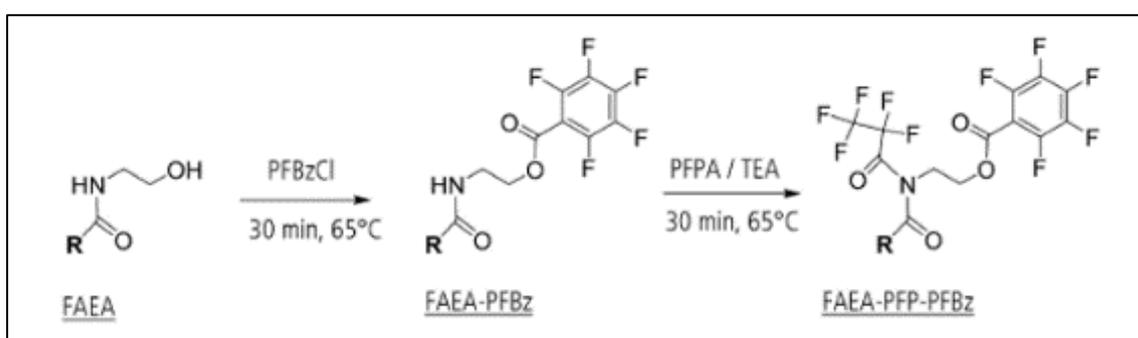


**Figura 8:** Reacción de sililación de la AEA

La sililación presenta una mayor afinidad por el hidrogeno activo del grupo hidroxilo que por la amida. De esta forma, el compuesto derivatizado presenta una mayor volatilidad, consiguiéndose una mejora en la señal del analito.

Otros autores, como Alexander A. Zoerner y col [10], plantean otro tipo de derivatización para la determinación de AEA en plasma humano mediante GC-MS/MS, realizándola con pentafluorobenzamida (PFBz-X) y con anhídrido de ácido pentafluoropropionico (PFPA) obteniendo, como en el caso anterior, mejoras en la volatilidad del analito a determinar.

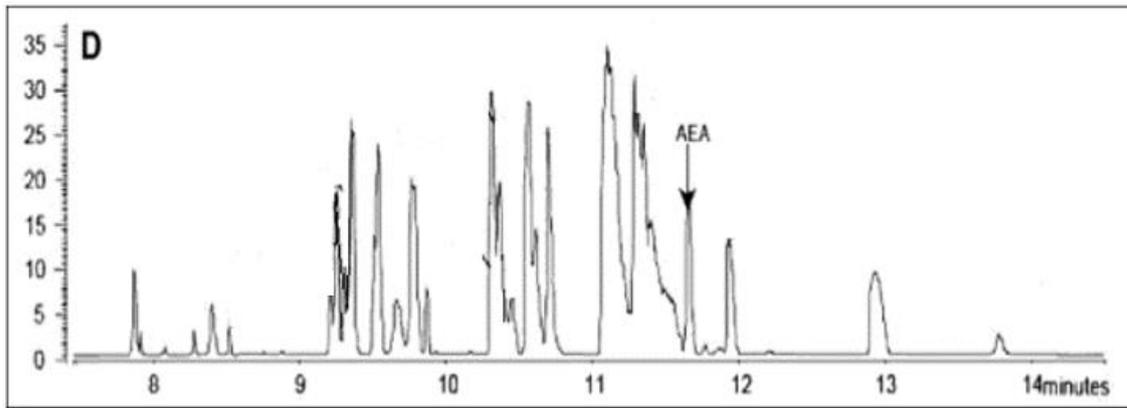
Según el tratamiento y los reactivos utilizados para la derivatización, se pueden alcanzar distintos productos de derivatización, como se refleja en la **Figura 9**:



**Figura 9:** Reacciones de derivatización de AEA con PFBzCl y PFPA.

Nosotros nos plantearíamos el procedimiento de sililación, ya que es la derivatización más ampliamente utilizada pues es posible sililar una amplia variedad de compuestos y existen muchos reactivos de sililación disponibles, siendo además un proceso de fácil preparación.

En la determinación **cromatográfica** del compuesto derivatizado por este procedimiento, se utilizaron la siguiente rampa de temperatura: 150 °C durante 1 min, después un incremento (rampa) de 20 °C/min hasta 300 °C, temperatura mantenida durante 5,5 minutos para la completa elución de los analitos. La elución de la AEA se produce a un tiempo de retención de 11,56 minutos (**Figura 9**), mientras que los fragmentos más abundantes para la detección MS son de 330, 420 y 492 m/z.



**Figura 9:** Cromatograma de CG-MS para una muestra analizada tras las extracciones de Folch y fase sólida [9]

Cuando se han analizado 3 y 10 mg de tejido cerebral de ratón, se determinaron 50 y 200 pmol/g de AEA, respectivamente. Cuando se analizaron 30 mg, se encontraron 1.08 nmol/g de AEA.

Como se puede observar, el número de compuestos relacionados con el AEA en las matrices biológicas, que pueden interferir en su determinación, es elevado. Esto, unido a su rápida degradación, hace que en el procedimiento de determinación de AEA en muestras biológicas sean necesarios equipos muy precisos y sofisticados, además una especial meticulosidad en la realización de procedimientos previos al análisis.

Al igual que con el caso anterior, se muestra en la **Tabla 2** un cuadro con un balance de los posibles costes mínimos que supondría poner a punto este método de GC-MS para la determinación de AEA, con las condiciones y pasos descritos anteriormente:

**Tabla 2:**

<b>CG-MS</b>			
	<b>Precio (€) /unidad</b>	<b>Unidades</b>	<b>Precio (€)</b>
<b>REACTIVOS</b>			
CHCl <sub>3</sub> (4 L)	174,00 €	1	
CH <sub>3</sub> OH (2.5 L)	82,05 €	1	
Acetato de etilo (2.5 L)	74,30 €	1	
Acetona (2.5 L)	56,24 €	1	
Sílice 230-400 mesh, 60 Å diámetro poro (100 g)	40,00 €	1	
BSTFA (kit 10 x 1 ml)	92,00 €	1	
Patrón AEA ≥ 97 % 25 mg	392,00 €	1	
		<b>Total Reactivos</b>	910,59 €
<b>MATERIAL FUNGIBLE</b>			
Viales Vidrio (100 unidades)	43,75 €		
Vasos de precipitados 250 ml	8,85 €	5	44,25 €
Matraz aforado 250 ml	17,42 €	2	34.84 €
Pipeta 1 ml	1,60 €	1	
Pipeta 2 ml	1,60 €	1	
Botes almacenamiento (10 unidades 30 ml)	10,95 €		
Tubos de micro centrifuga (500 unidades)	14,45 €		
Bombona N <sub>2</sub> 50 L	294,95 €	1	
		<b>Total Fungible</b>	446,39 €
<b>MATERIAL INVENTARIABLE</b>			
Equipo de destilación de agua	9.645,20 €	1	
Equipo de ultrasonidos	3.882,05 €	1	
Agitador Vortex	167,20 €	1	
Micro centrifuga	520 €	1	
Equipo GC con inyector capilar	50.000 €	1	
Detector MS 1 cuadrupolo con sonda ESI	50.000 €	1	
		<b>Total Inventariable</b>	114.214,45 €
		<b>TOTAL</b>	<b>115.571,43 €</b>

## **CONCLUSIONES**

- Se ha realizado un estudio sobre métodos alternativos para la determinación de anandamida (AEA), en concreto, por las técnicas cromatográficas de HPLC con detector UV-Visible, HPLC con detector fluorimétrico y GC con detector de ionización de llama (FID).
- Se ha constatado que la rápida degradación del compuesto genera dificultades a la hora de su detección y cuantificación. Se han comparado distintas matrices donde analizar la muestra, concluyendo que los más adecuados son etanol, acetona, acetonitrilo y hexano.
- Hemos realizado en dichos medios estudios de la respuesta del compuesto por espectroscopía UV-Visible y por fluorescencia. En el primer caso, hemos encontrado dos bandas de absorción a longitudes de onda de 206 y 236 nm mientras que en el caso de la fluorescencia encontramos que, para una longitud de onda de excitación de 236 nm, se obtiene una buena respuesta de emisión a 476 nm.
- Se ha llevado a cabo un estudio para la determinación por HPLC-UV/Vis, estableciendo diferentes condiciones de fase móvil. La problemática derivada de la estabilidad del compuesto no nos ha permitido una identificación clara del compuesto, independientemente del medio en el que se encontraba la muestra.
- Se ha realizado un estudio para su determinación por HPLC-FL, obteniendo una respuesta significativa entre los 5,110 y 5,130 minutos. Sin embargo, no podemos afirmar si se corresponde con el compuesto AEA o con algún producto de degradación, como el ácido araquidónico, compuesto de degradación mayoritario y de estructura similar.
- Se ha estudiado la determinación de AEA por GC-FID, variando distintas condiciones en cuanto a rampas de temperatura y medios en los que se encontraba la muestra. Los mejores resultados se han obtenido usando etanol y acetonitrilo como medio de muestra estableciendo las condiciones 1 y 2 reflejadas en la memoria: con las “condiciones 1” se observa un pico, para la AEA o algún producto de degradación, en etanol a 5,1 minutos, mientras que con las “condiciones 2”, la señal se presenta a 1,7 minutos en etanol y a 1,6 minutos en acetonitrilo.

- Se ha procedido a realizar un breve proyecto teórico sobre lo que representaría la puesta punto de un método la determinación de AEA en muestras biológicas, en concreto, para el análisis de muestras de tejido cerebral de ratones por HPLC-MS y CGMS. Dicho proyecto se ha hecho en base a métodos ya validados, comentándose el procedimiento a seguir y realizándose un sencillo balance de costes que refleja a grandes rasgos el presupuesto a invertir para realizar el análisis de AEA en dichas muestras.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] William A. Devane, Lumir Hanuš, Aviva Breuer, Roger G. Pertwee, Lesley A. Stevenson, Graeme Griffin, Dan Gibson, Asher Mandelbaum, Alexander Etinger and Raphael Mechoulam, *Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor*, *Science, New Series*, Vol. 258, No. 5090 (Dec. 18, 1992), Pages 1946-1949.
- [2] Naciones Unidas, *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados*, Manual para uso de los laboratorios nacionales de análisis de drogas, Nueva York (2014).
- [3] Y. Gaoni, R. Mechoulam, *Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish*, *J. Am. Chem. Soc.* (1964), 86 (8), Pages 1646–1647.
- [4] Herkenham, M., Lynn, A.B., et al., *Cannabinoid Receptor Localization in Brain*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1990) 87: Pages 1932-1936.
- [5] Sean Munro, Kerrie L. Thomas & Muna Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*, *Nature*, Volume 365 (02 September 1993), Pages 61–65.
- [6] JA. Martínez Orgado, D. Fernández López, B. Bonet Serra, I. Lizasoain Hernández, J. Romero Paredes, *El sistema cannabinoide y su importancia en el periodo perinatal*, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Laboratorio de Apoyo a la Investigación Hospital Alcorcón, Madrid.
- [7] Attila Tóth, Peter M. Blumberg, Judit Boczán, *Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1)*, *Vitamins & Hormones*, Volume 81 (2009), Pages 389-419.
- [8] D. Piomelli, A. Giuffrida, A. Calignano, F. Rodríguez de Fonseca, *The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs*, (2000), *TiPS* 21: Pages 218-224, 2000.
- [9] Giulio G. Muccioli, Nephi Stella, *An optimized GC–MS method detects nanomolar amounts of anandamide in mouse brain*, *Analytical Biochemistry* 373 (2008), Pages 220–228.
- [10] Alexander A. Zoerner, Frank M. Gutzki, Maria T. Suchy, Bibiana Beckmann, Stefan Engeli, Jens Jordan, Dimitrios Tsikas, *Targeted stable-isotope dilution GC–MS/MS analysis of the endocannabinoid anandamide and other fatty acid ethanol amides in human plasma*, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009), Pages 2909 –2923.

[11] Alexander A. Zoerner, Sandor Batkai, Maria-Theresia Suchy, Frank-Mathias Gutzki, Stefan Engeli, Jens Jordan, Dimitrios Tsikas, *Simultaneous UPLC–MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: Minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extraction*, Journal of Chromatography B, 883– 884 (2012) Pages 161– 171.

[12] Daniel J. Liput, Eleftheria Tsakalozou, Dana C. Hammell, Kalpana S. Paudel, Kimberly Nixon, Audra L. Stinchcomb, *Quantification of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in rodent brain tissue using high performance liquid chromatography– electrospray mass spectroscopy*, Journal of Pharmaceutical Analysis (2014); 4(4): Pages 234–241.

[13] Christopher Mwanza, Zheng Chen, Quan Zhang, Shenghuo Chen, Weiwen Wang, Huihua Deng, *Simultaneous HPLC-APCI-MS/MS quantification of endogenous cannabinoids and glucocorticoids in hair*, Journal of Chromatography B, 1028 (2016) Pages 1–10.

[14] Christian C. Felder, Amie Nielsen, Eileen M. Briley, Miklos Palkovits, Joseph Priller, Julius Axelrod, Duy N. Nguyen, John M. Richardson, Ralph M. Riggin, Gary A. Koppel, Steven M. Paul, Gerald W. Becker, *Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat*, FEBS Letters 393 (1996) Pages 231-235.

[15] Herbert Schuel, Lani J. Burkman, Jack Lippes, Kent Crickard, Ellyn Forester, Daniele Piomelli, Andrea Giuffrida, *N-Acylethanolamines in human reproductive fluids*, *Chemistry and Physics of Lipids*, Volume 121, Issues 1–2, (31 December 2002), Pages 211-227.

[16] Yoshiko Arai, Takeshi Fukushima, Mika Shirao, Xiangjing Yang and Kazuhiro Imai, *Sensitive determination of anandamide in rat brain utilizing a coupled-column HPLC with fluorimetric detection*, Biomed. Chromatogr. (2000), 14: Pages 118–124.

[17] Andreas Schmidt, Kay Brune, Burkhard Hinz, *Determination of the endocannabinoid anandamide in human plasma by high-performance liquid chromatography*, Biomed. Chromatogr. (2006), 20: 336–342.

[18] Boris Yagen, Sumner Burstein, *Novel and sensitive method for the detection of anandamide by the use of its dansyl derivative*, Journal of Chromatography B. (2000), 740, Pages 93–99.

### Páginas Web

- 1) <https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide>

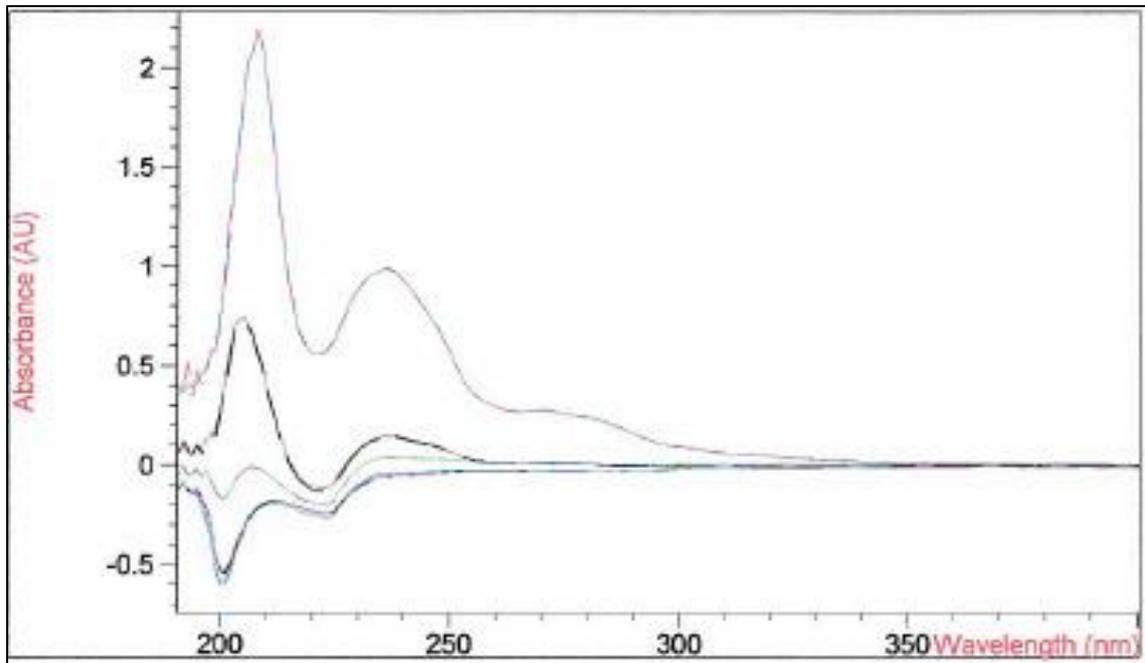


# **ANEXO**

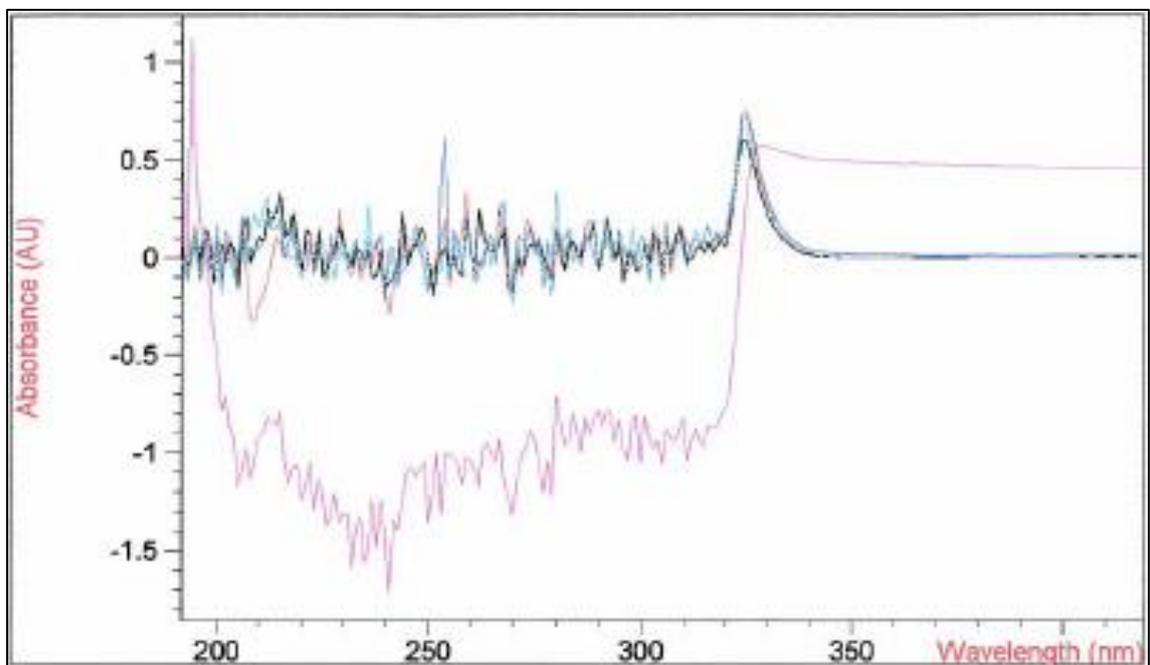


## ESPECTROS UV/VIS

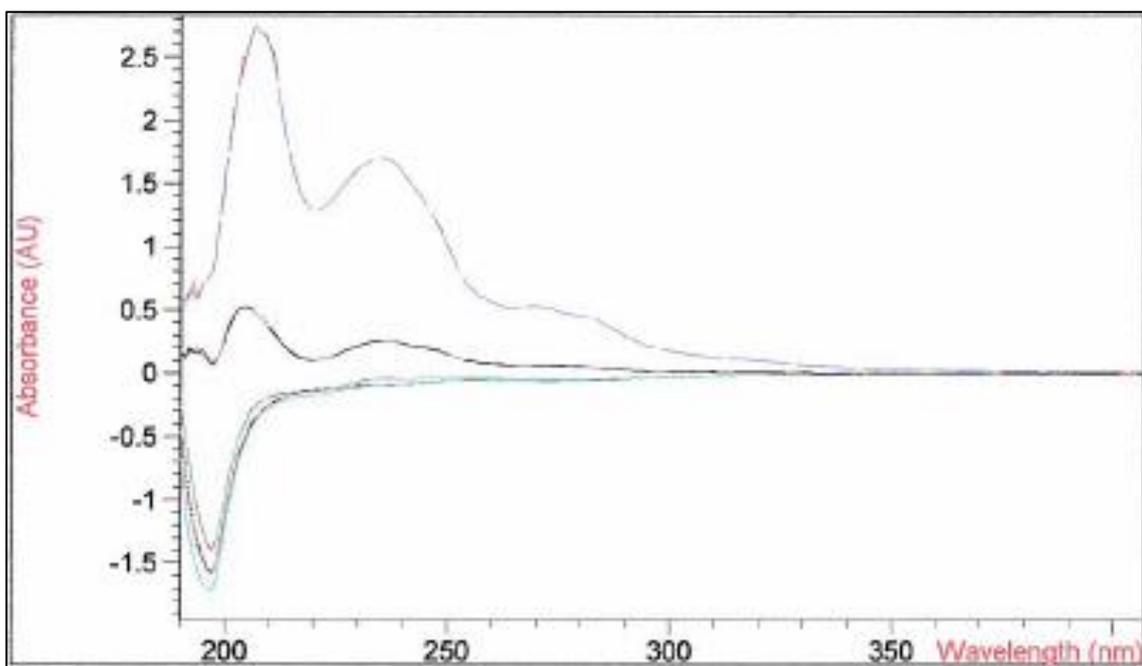
### Espectro UV/Vis Hexano



### Espectro UV/Vis Acetona



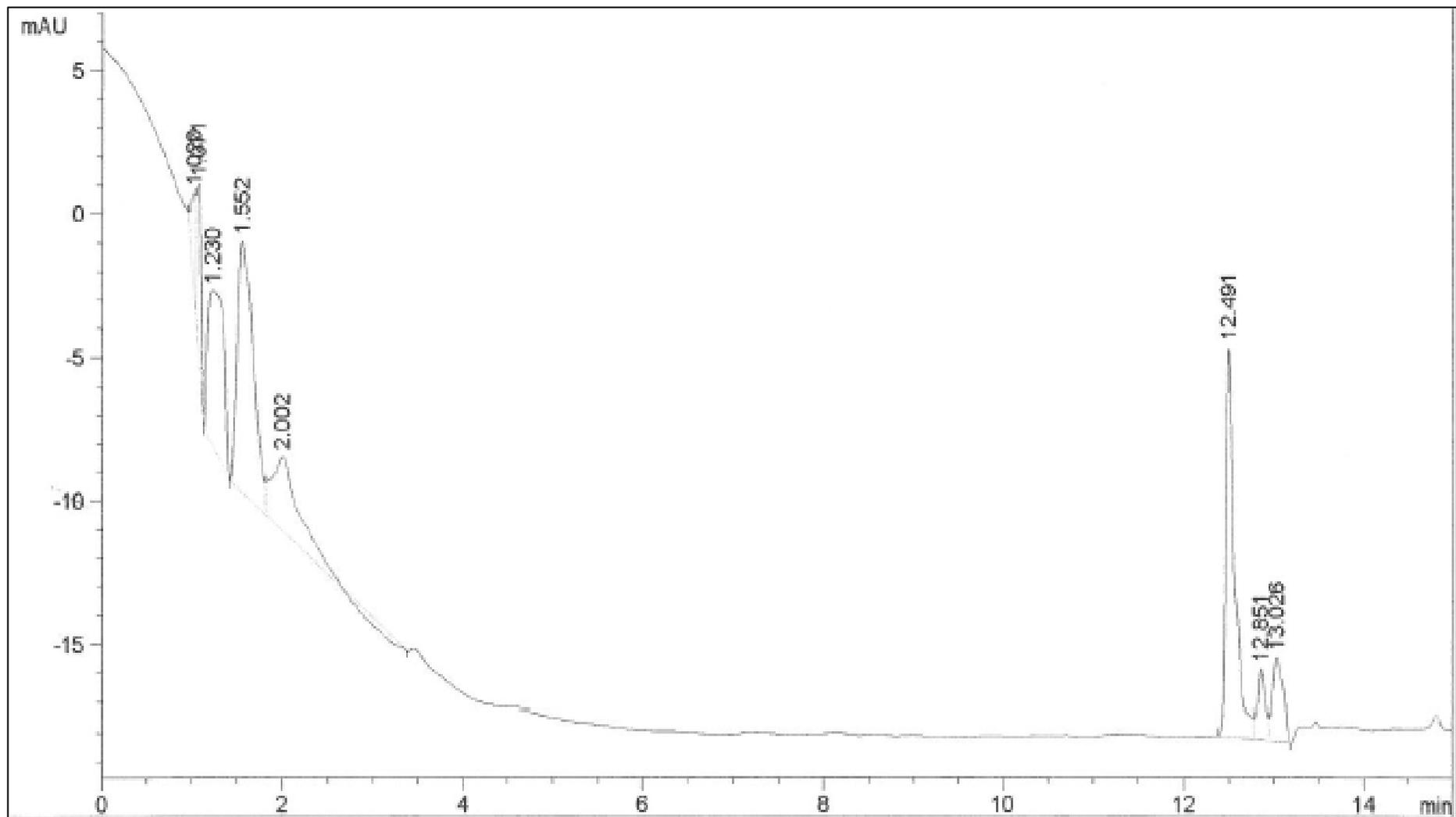
Espectro UV/Vis Acetonitrilo



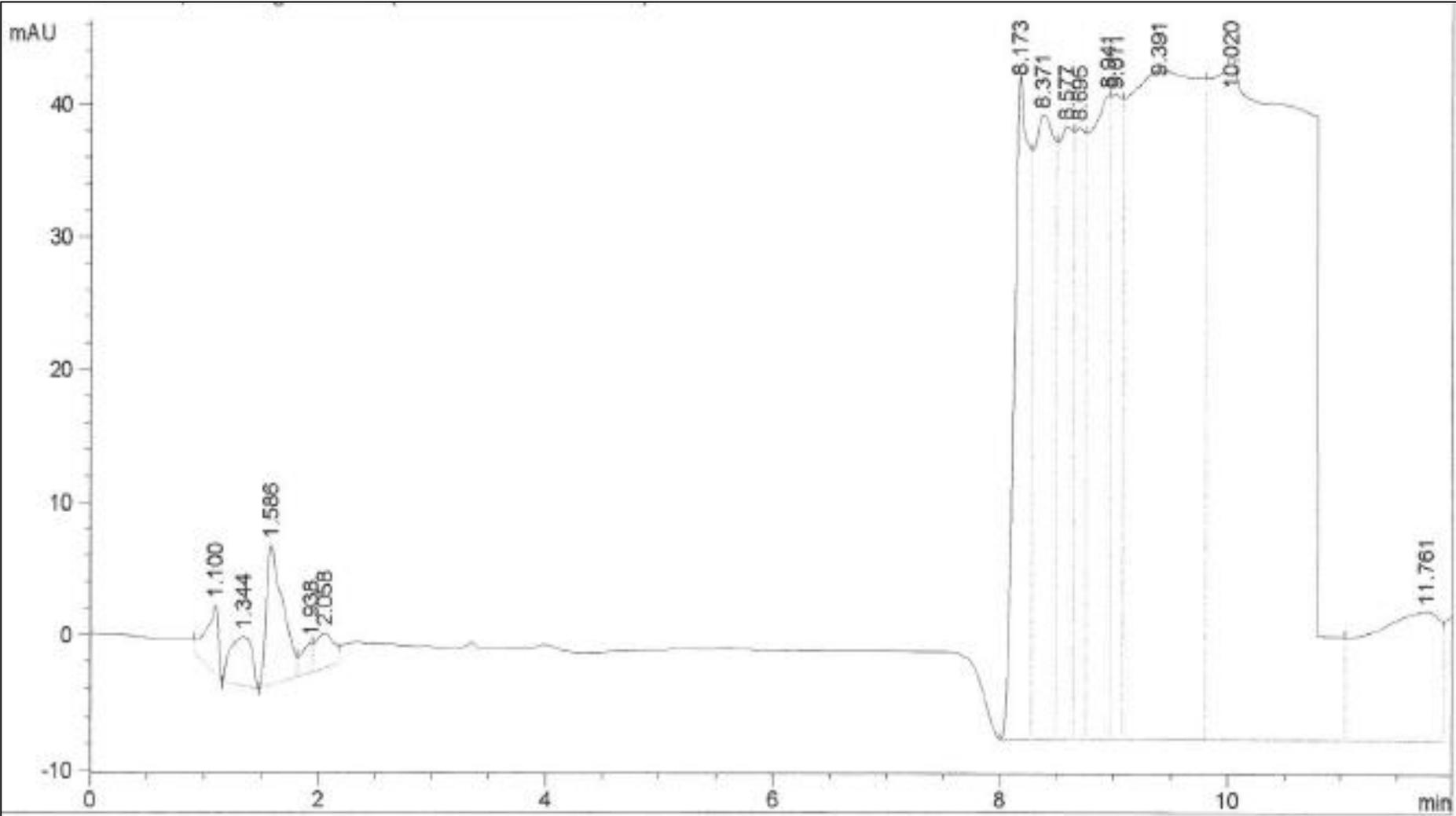
**CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA CON**  
**DETECTOR UV/VIS**



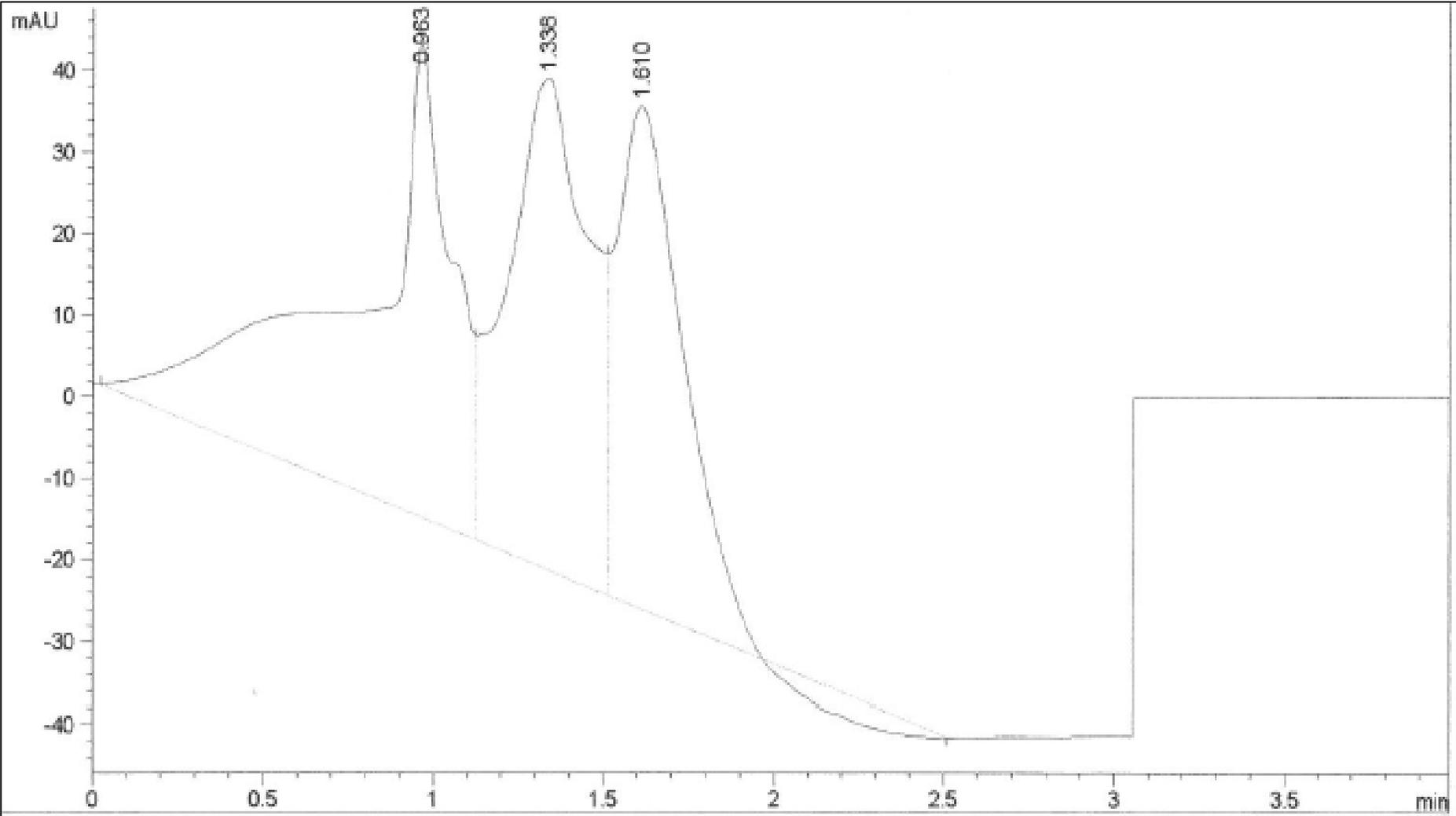
Cromatograma 1: Disolución de 0.05 ppm de AEA en etanol



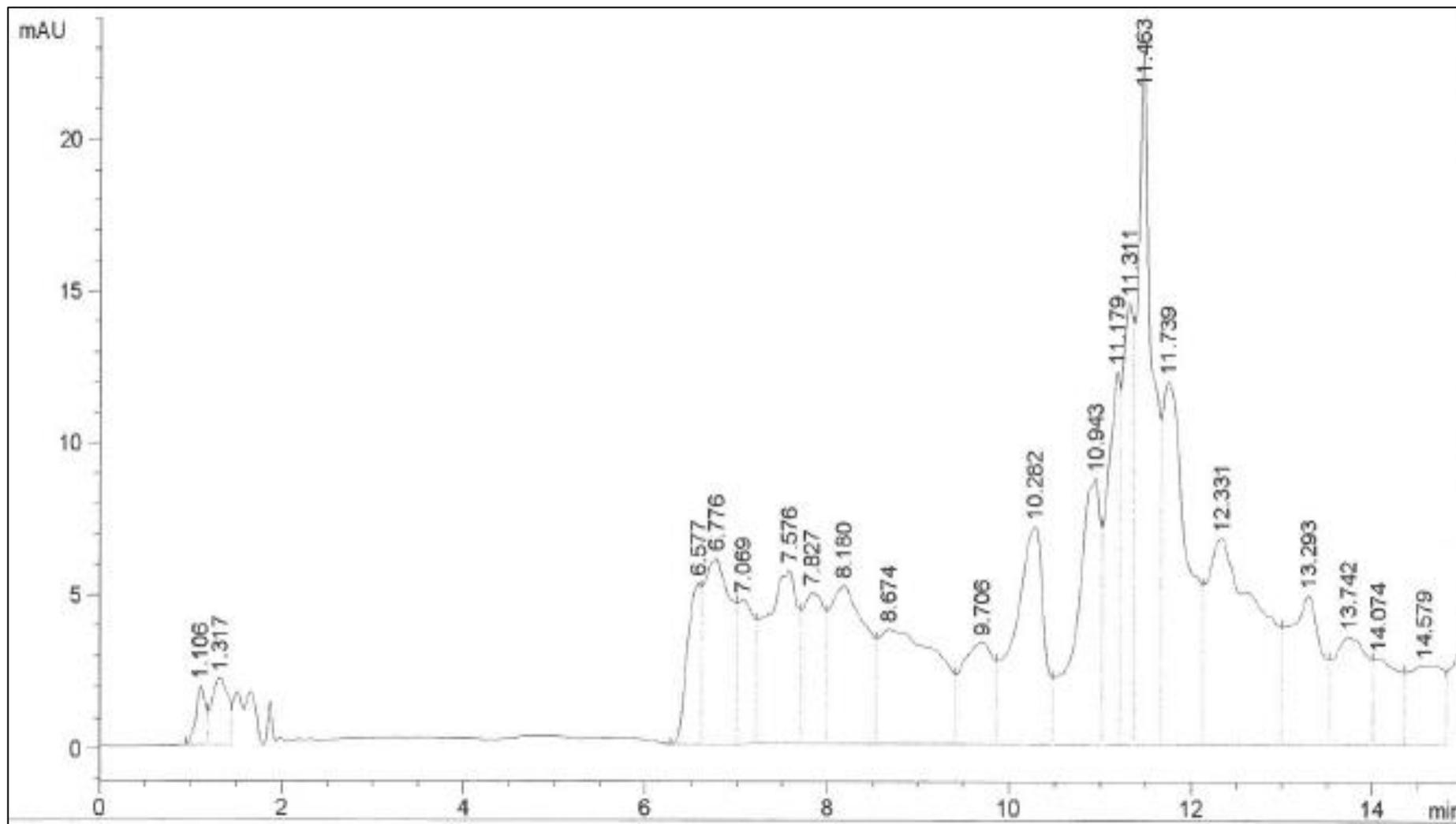
Cromatograma 2: Disolución de 1 ppm de AEA en etanol



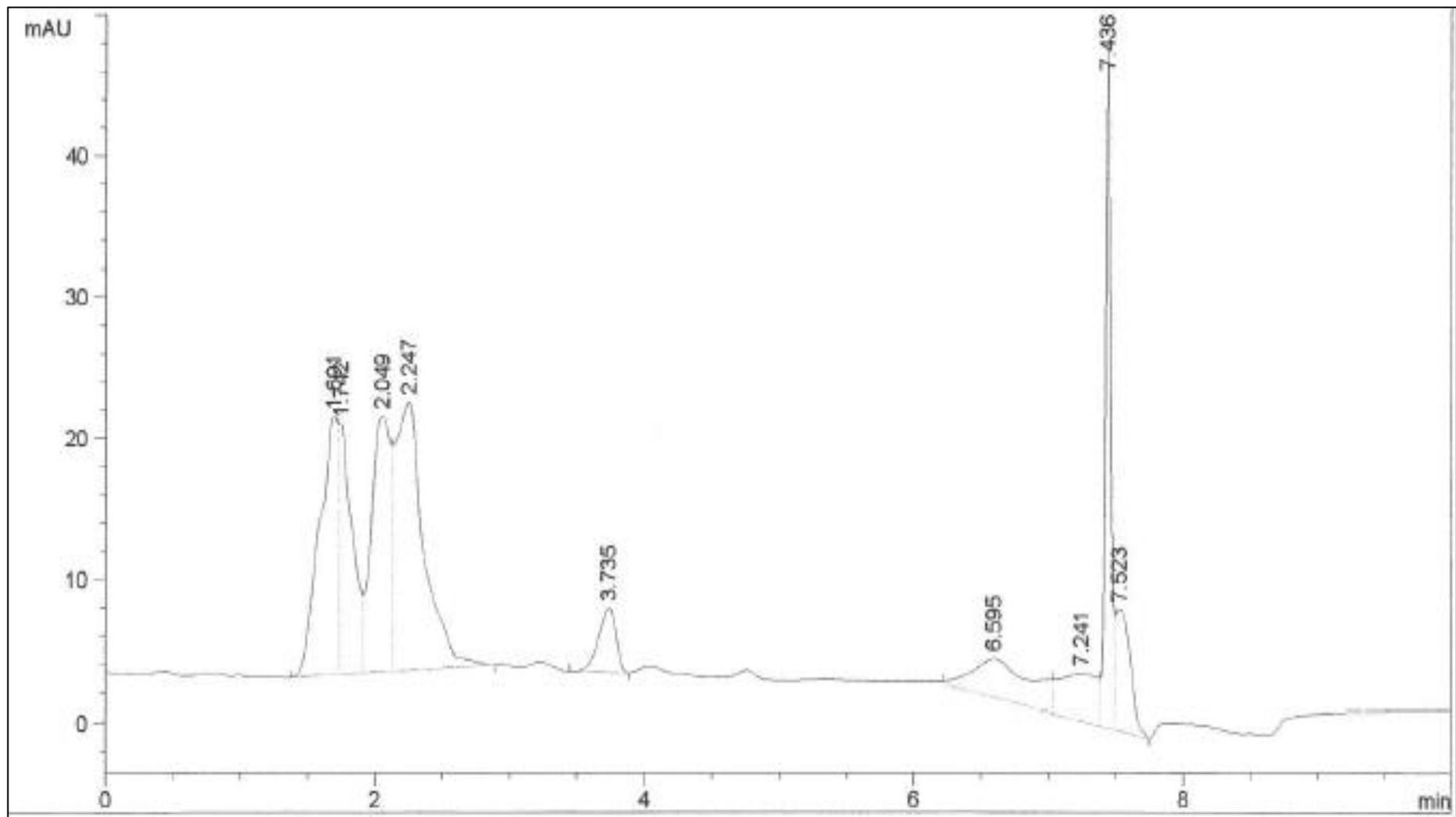
Cromatograma 3: Disolución de 2 ppm de AEA en etanol



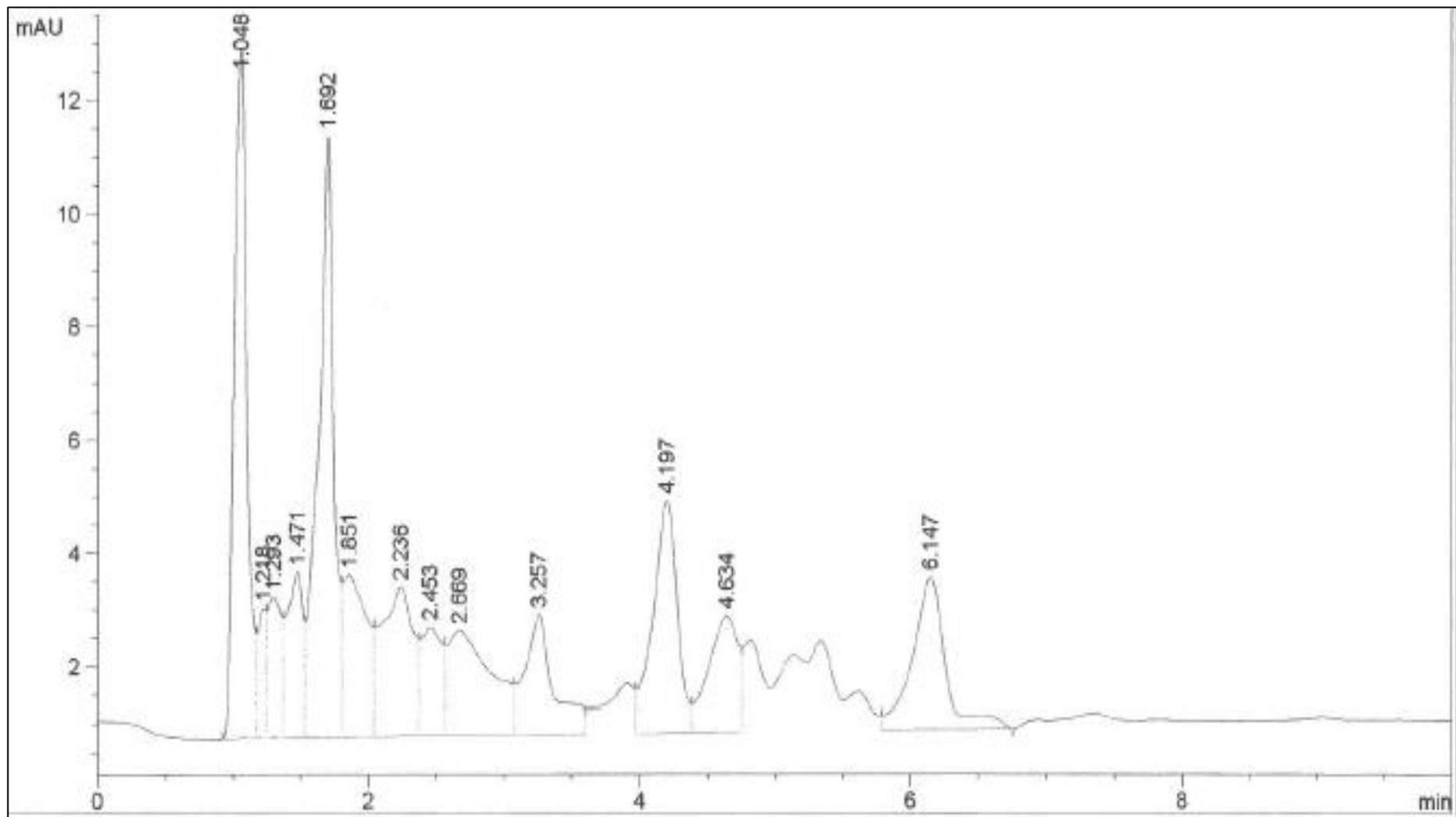
Cromatograma 4: Disolución de 50 ppm de AEA en etanol



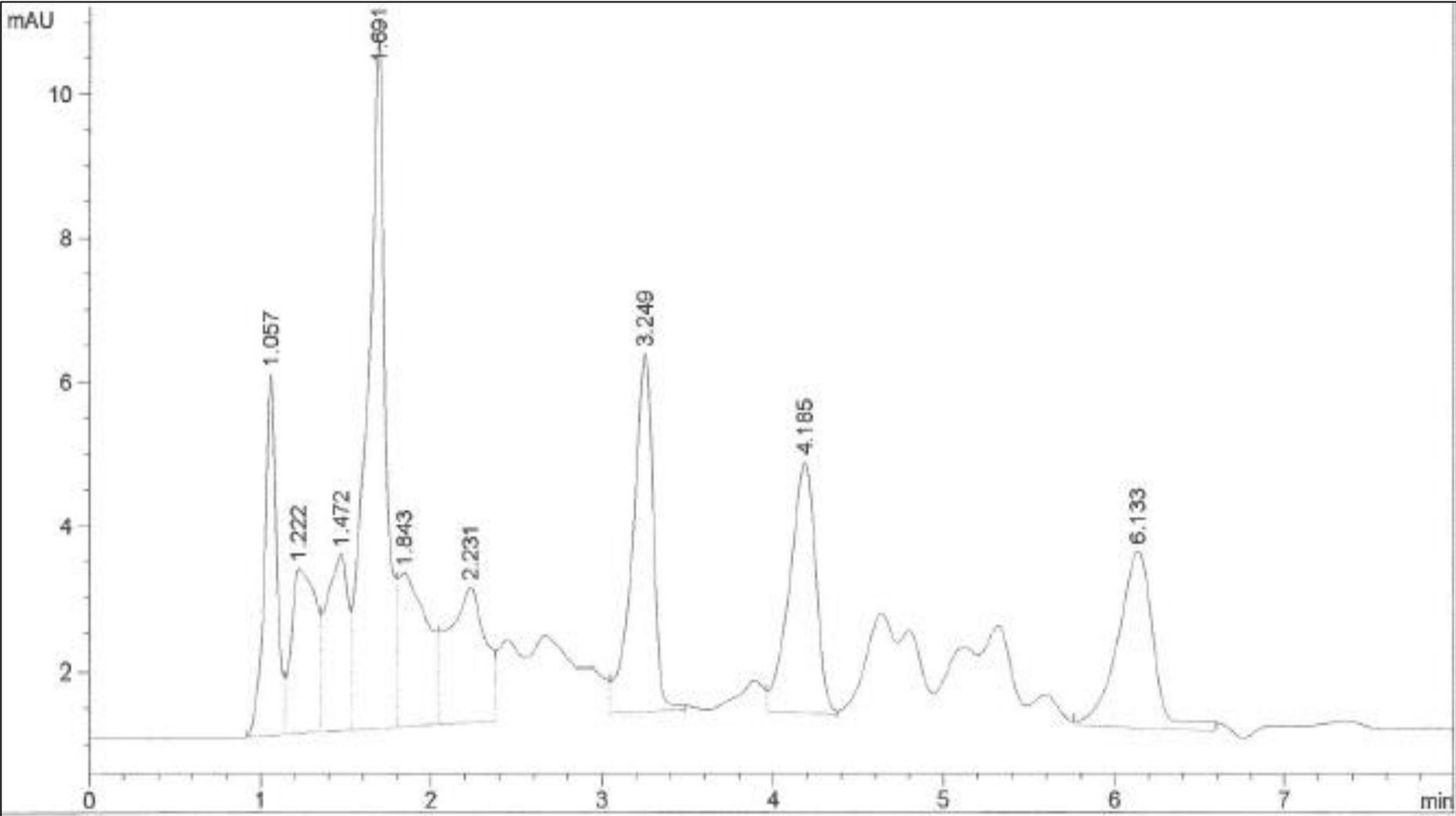
Cromatograma 5: Disolución de 500 ppm de AEA en etanol



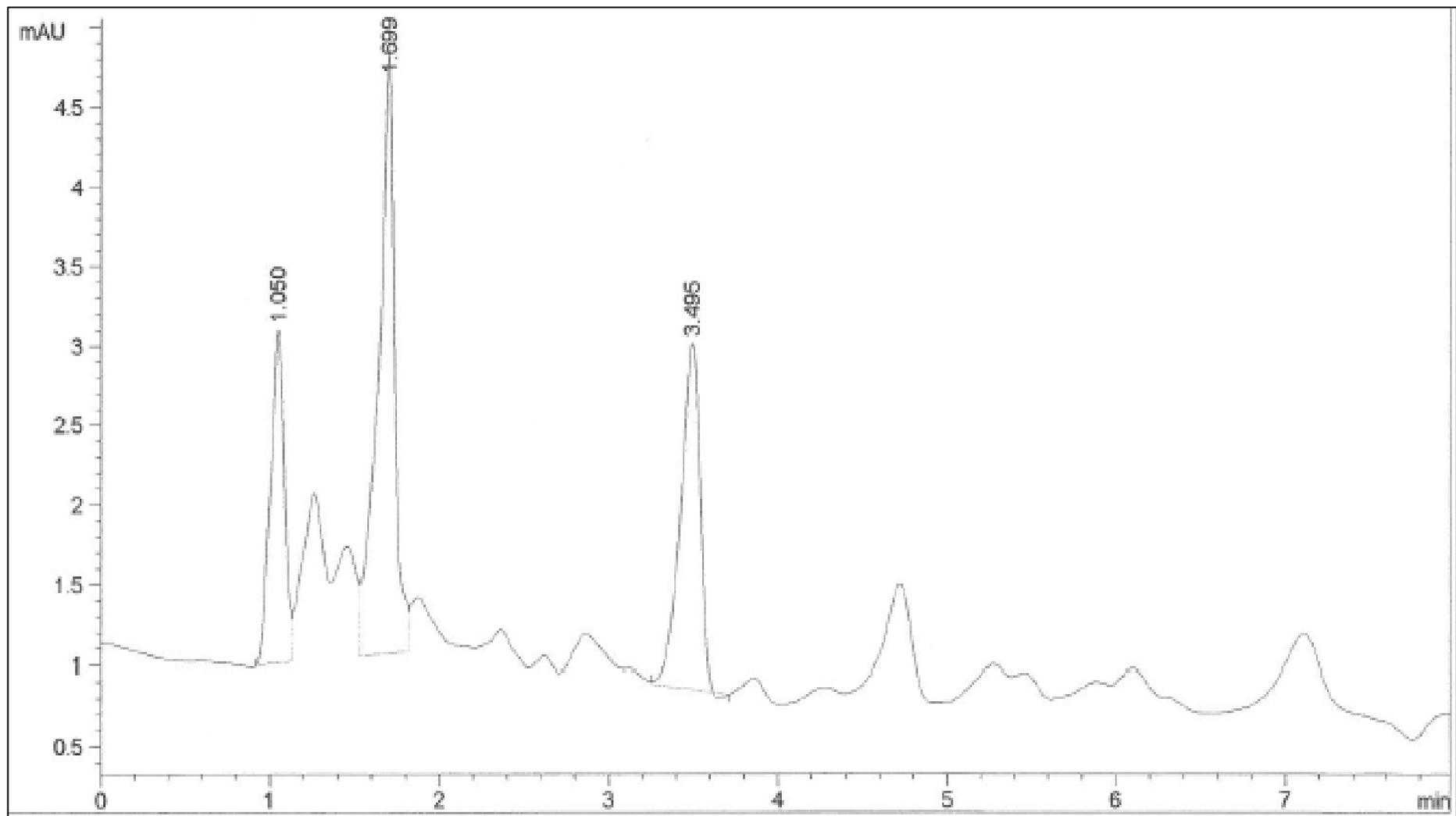
Cromatograma 6: Disolución de 5 ppm de AEA en etanol



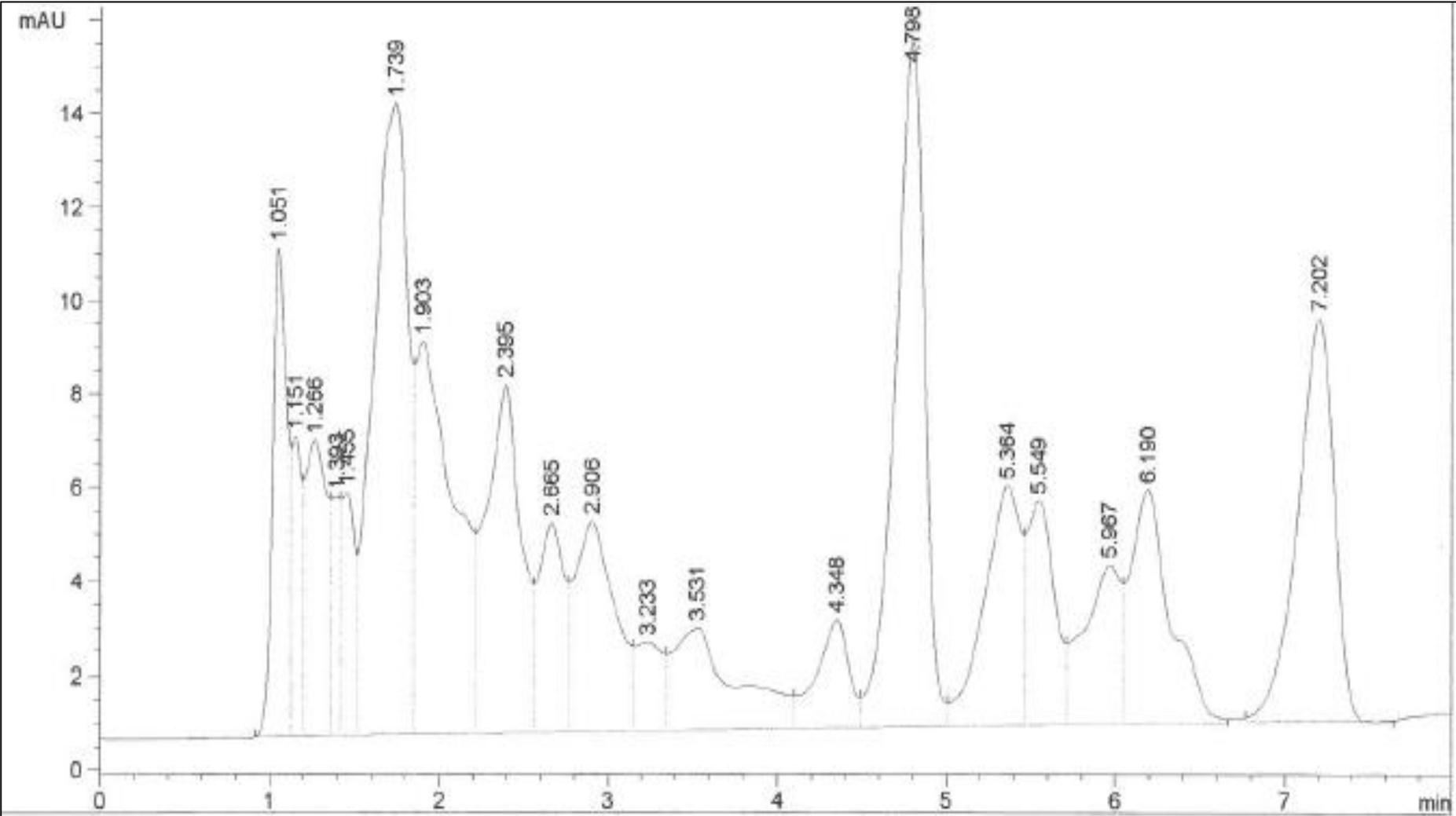
Cromatograma 7: Disolución de 2 ppm de AEA en etanol



**Cromatograma 8: Disolución de 0.25 ppm de AEA en etanol**



Cromatograma 9: Disolución de 10 ppm de AEA en etanol

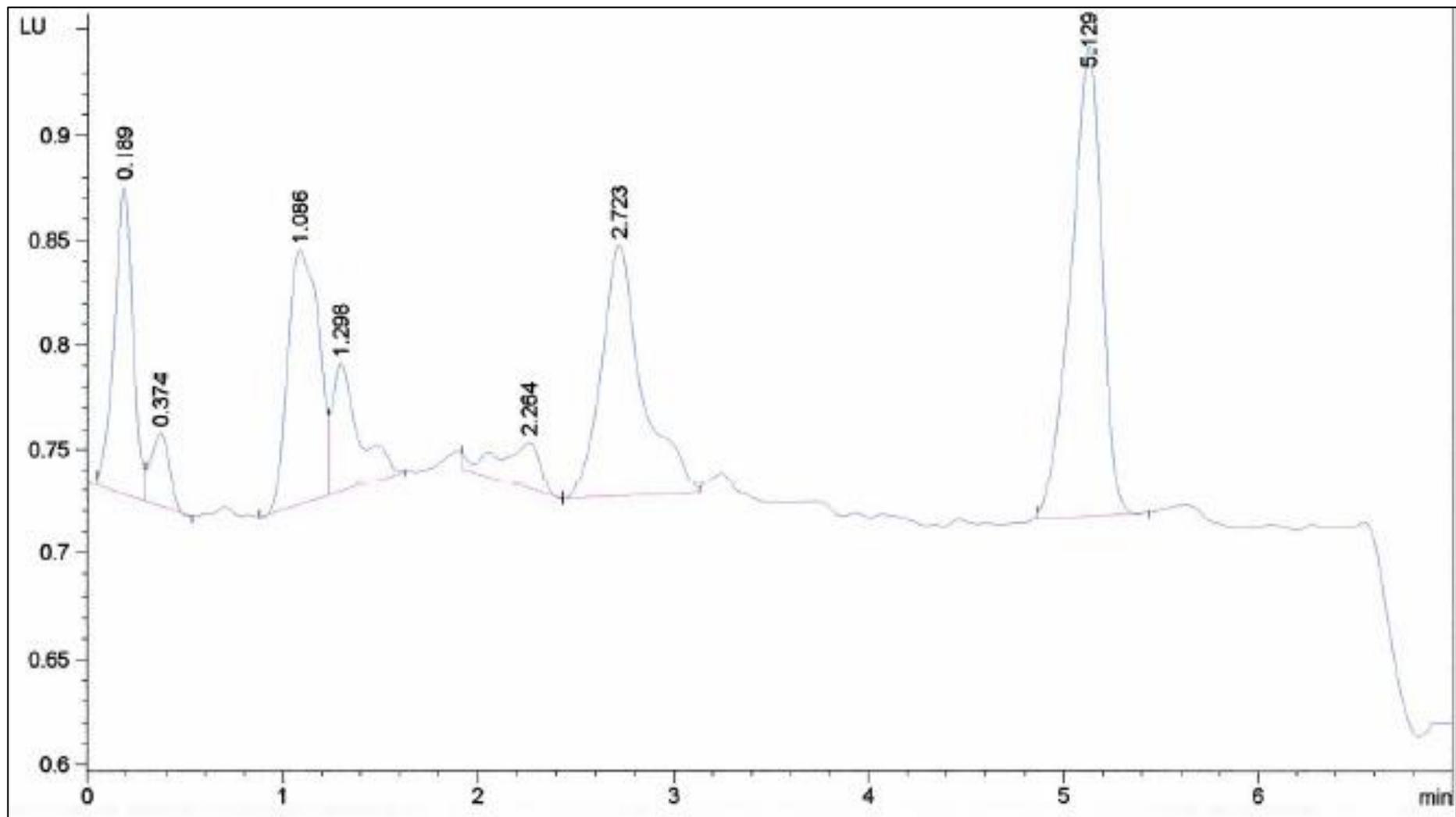




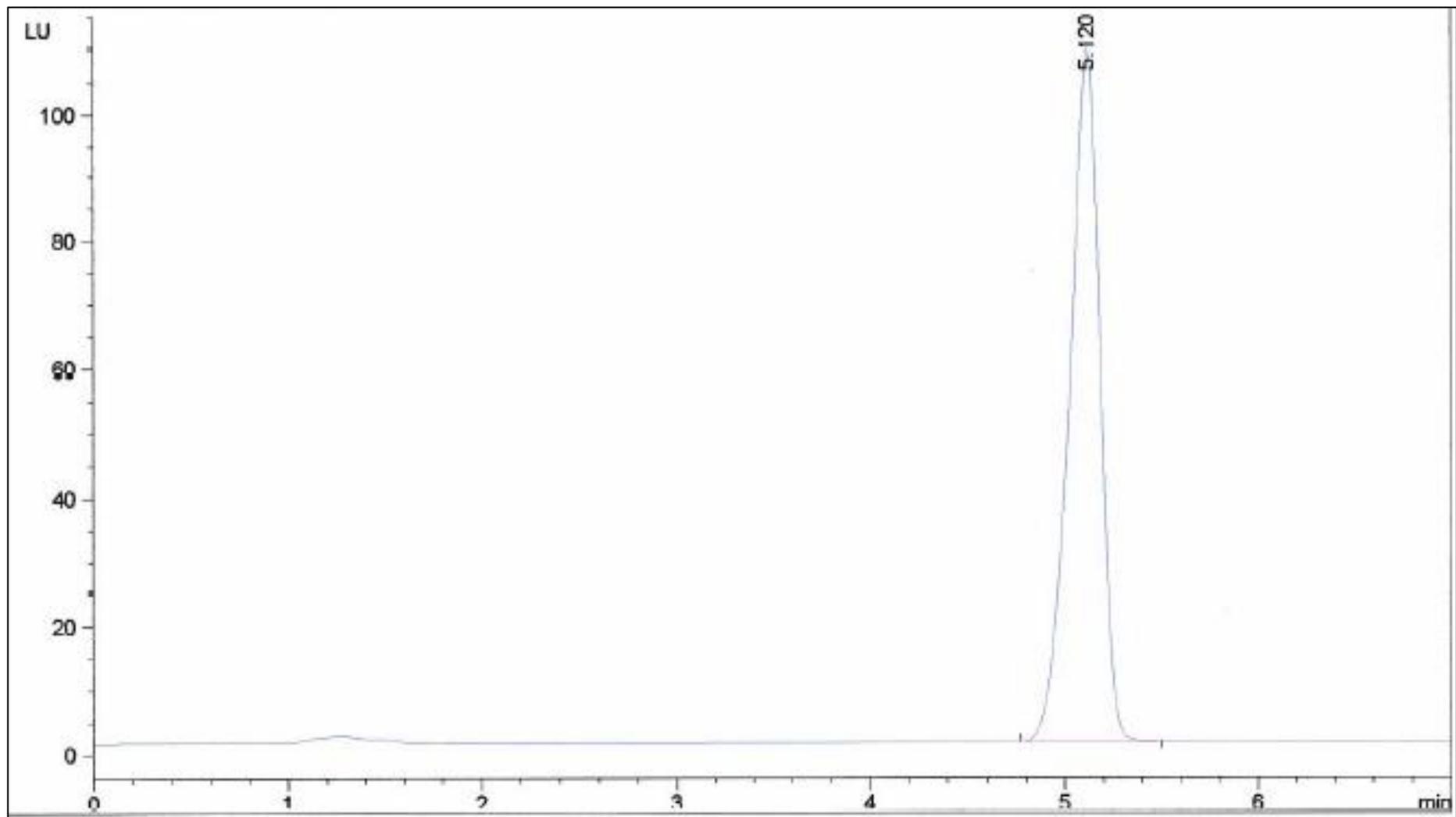
**CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA CON  
DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC-FL)**



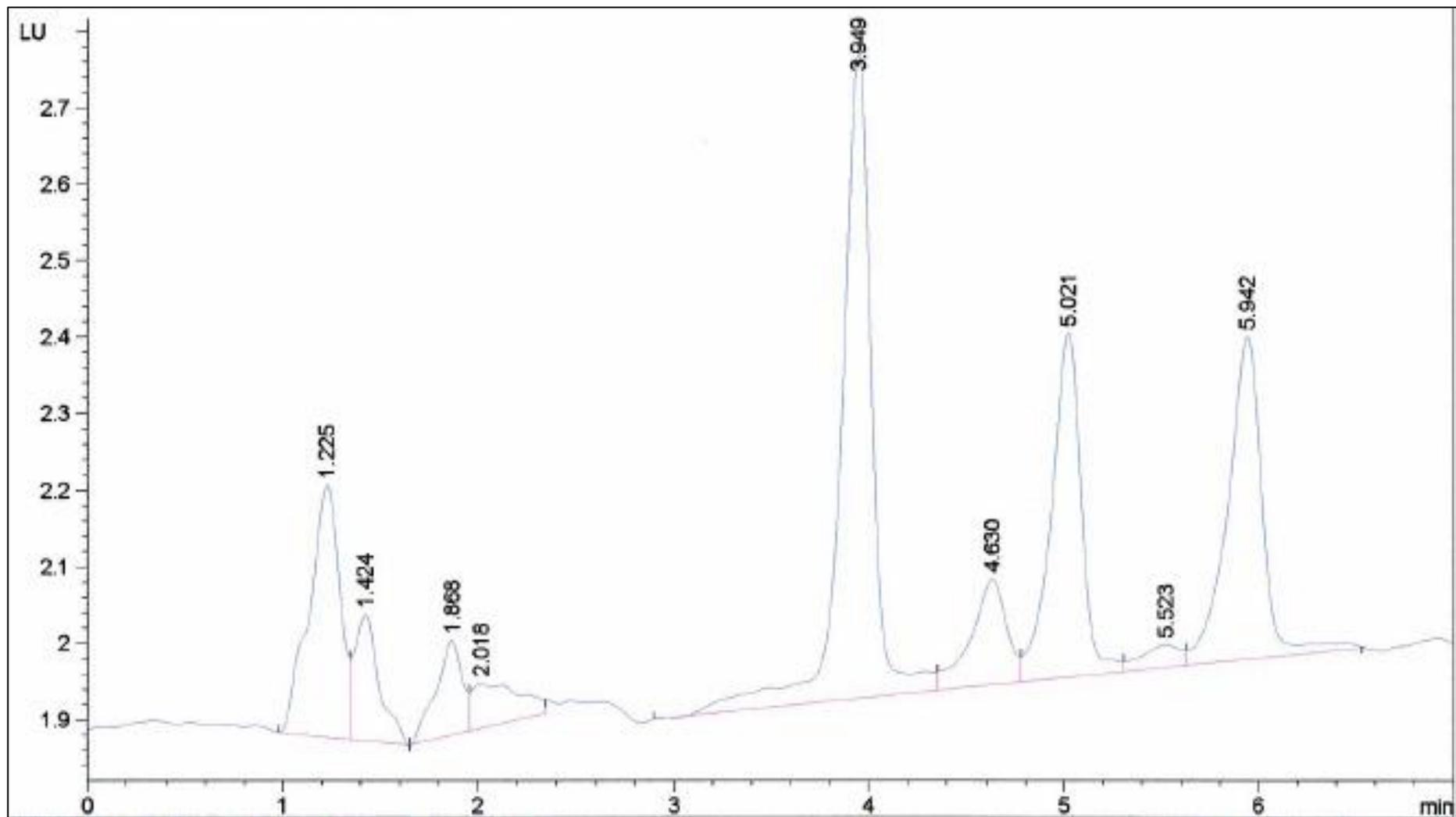
Cromatograma 10: 4 ppm de AEA en agua-etanol



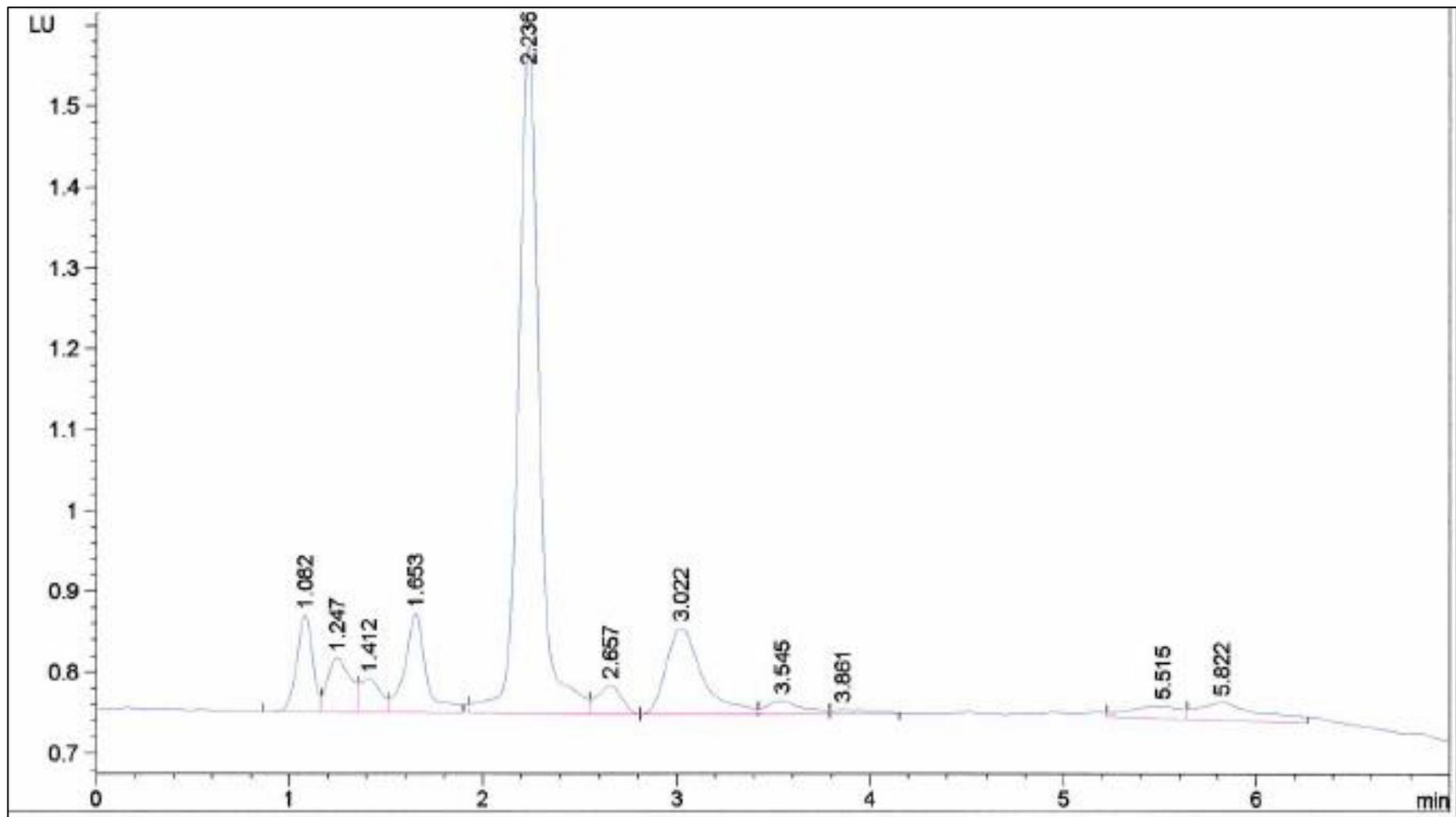
Cromatograma 11: 10 ppm de AEA en etanol



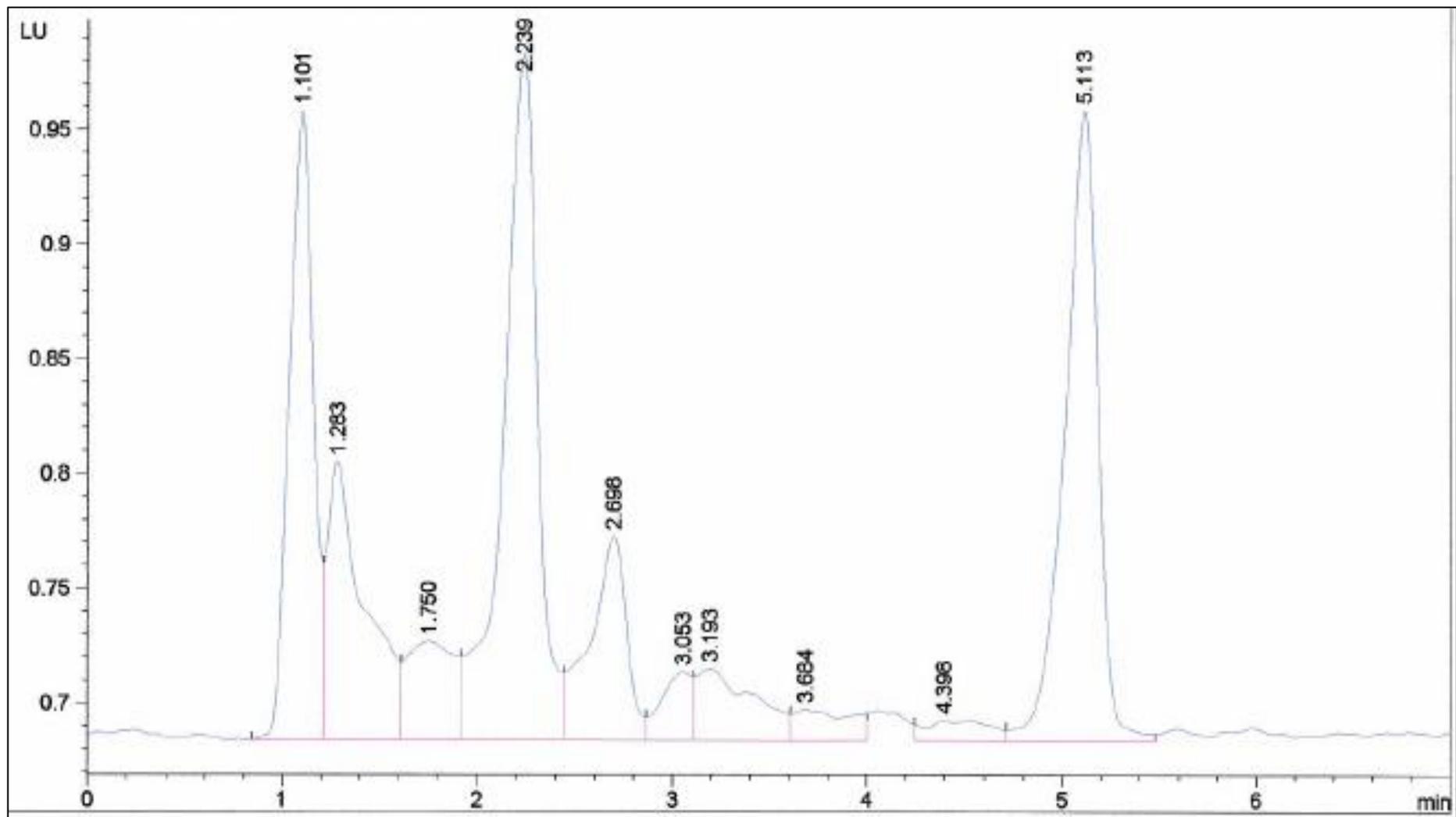
Cromatograma 12: 4 ppm de AEA en acetonitrilo



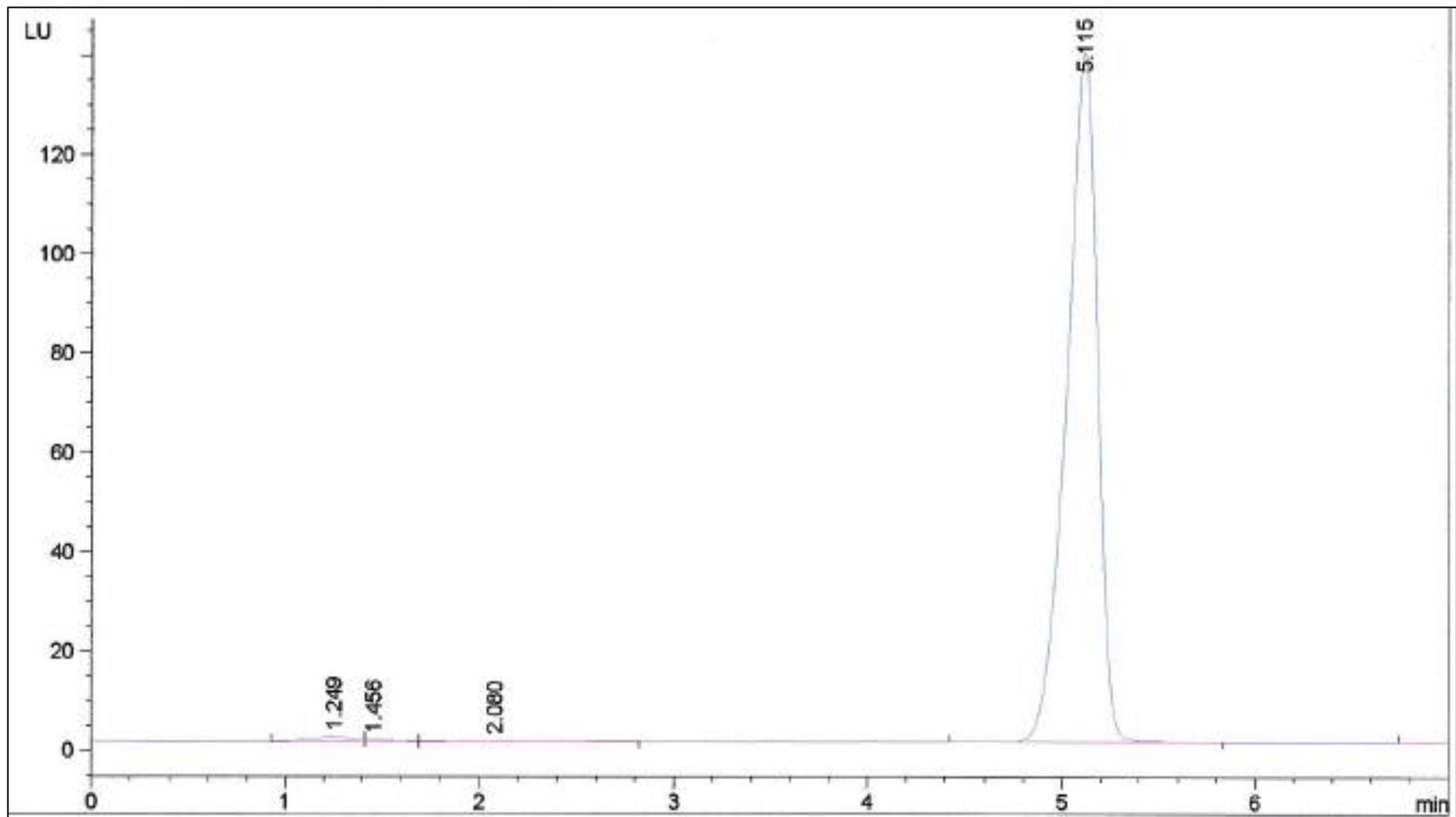
Cromatograma 13: 4 ppm de AEA en acetonitrilo



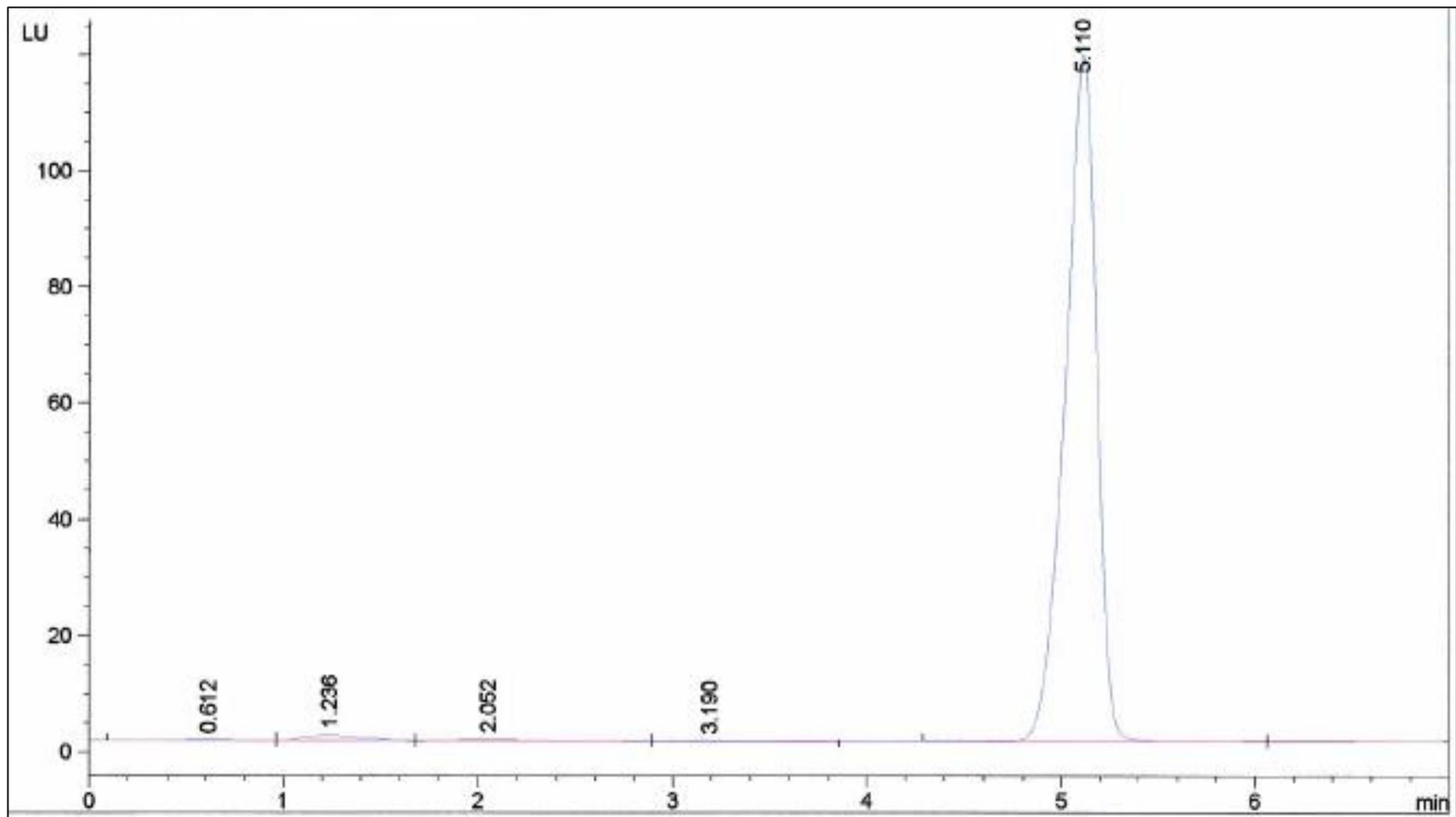
Cromatograma 14: 5 ppm de AEA en etanol



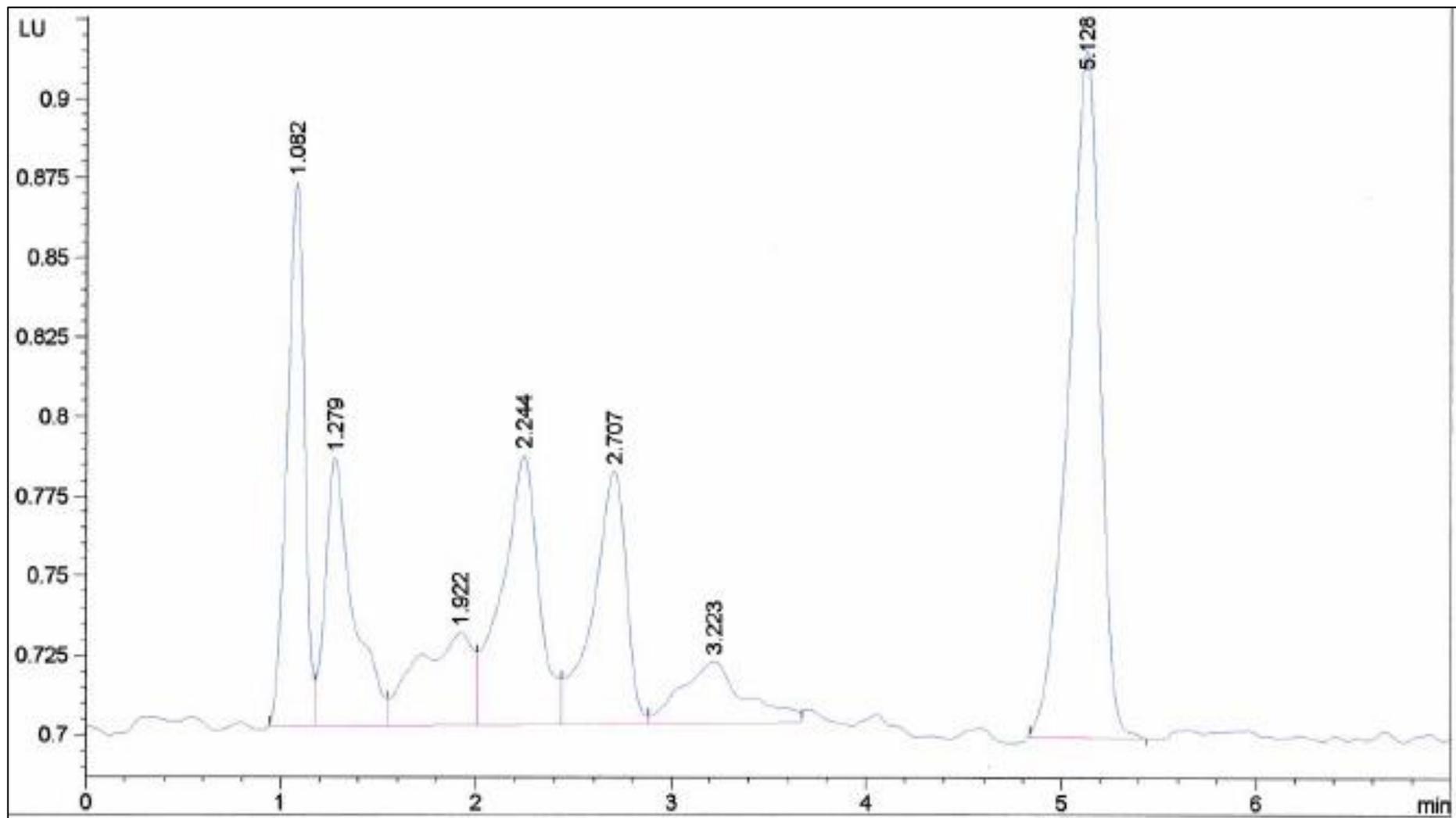
Cromatograma 15: 5 ppm de AEA en etanol



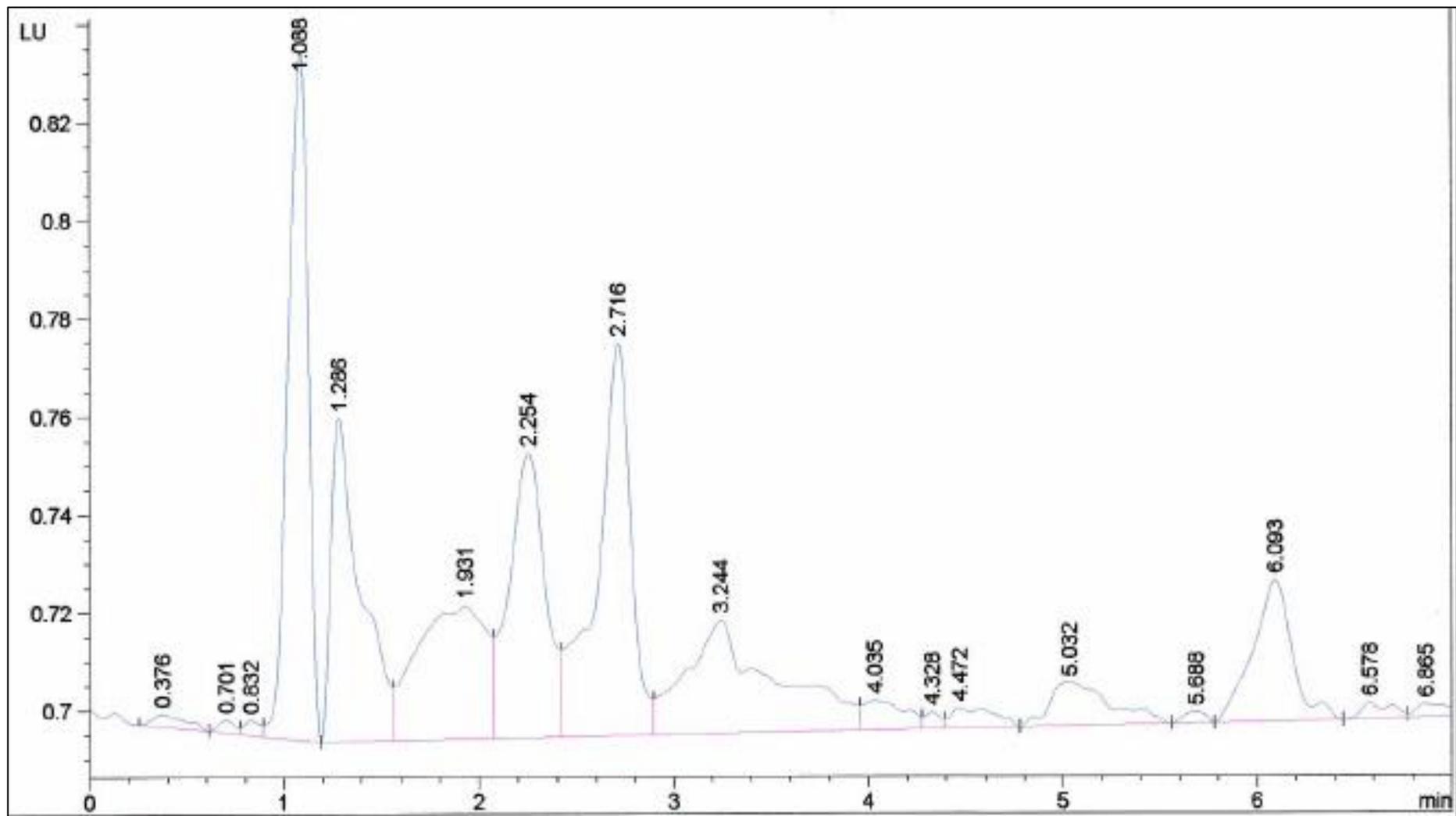
Cromatograma 16: 10 ppm de AEA en etanol



Cromatograma 17: 10 ppm de AEA en etanol



Cromatograma 18: 2 ppm de AEA en etanol

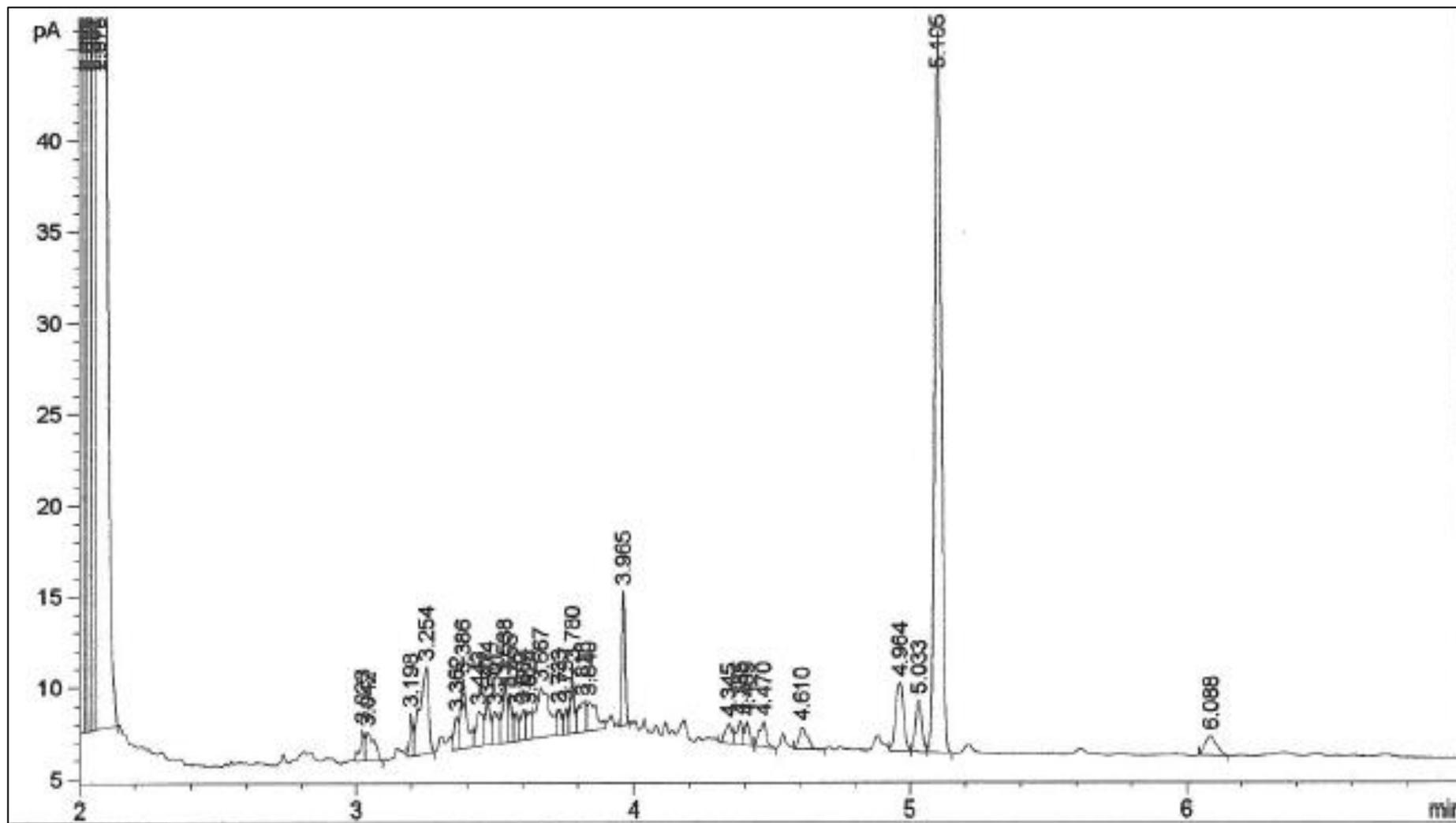




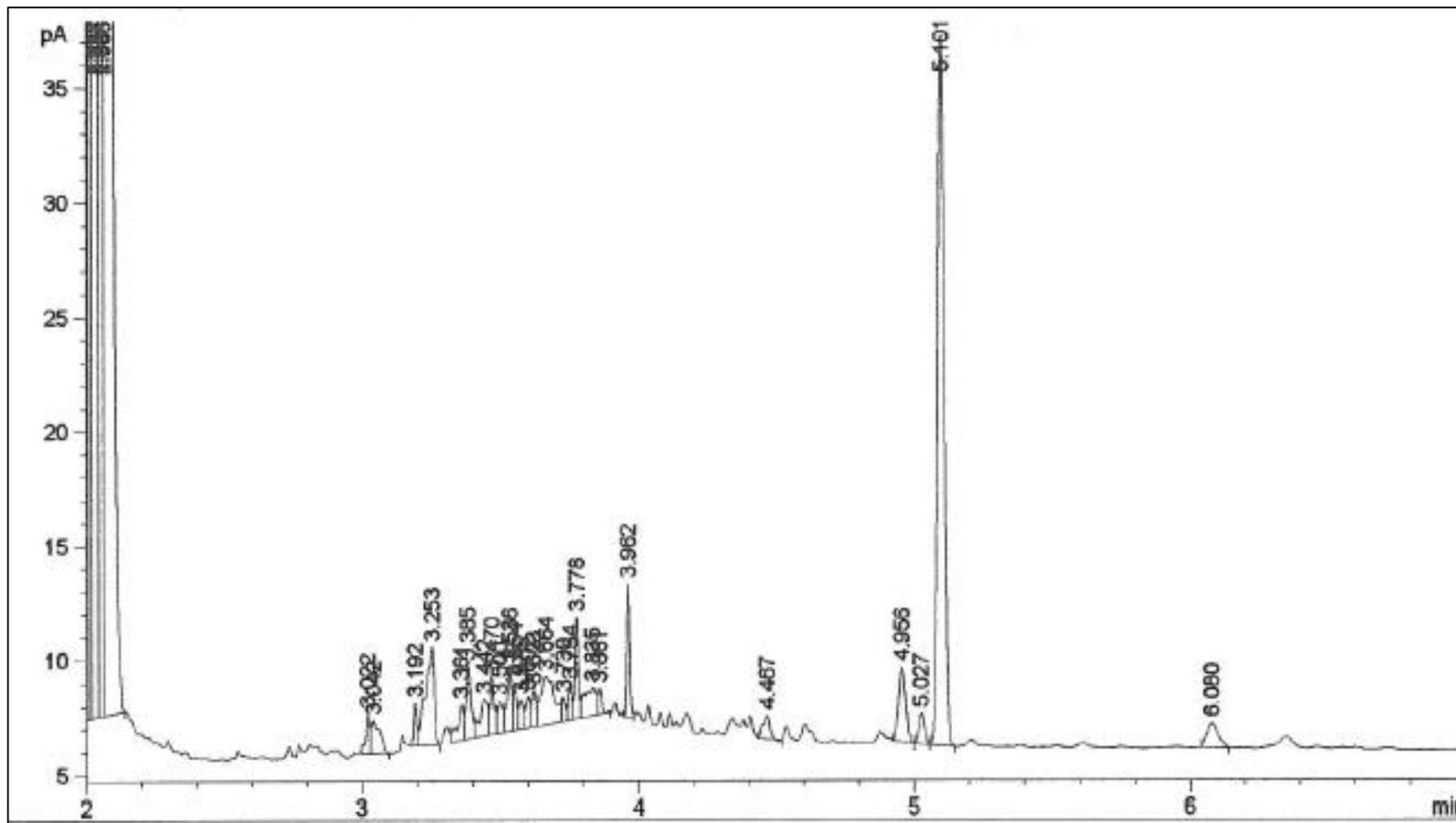
**CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE  
LLAMA (CG-FID)**



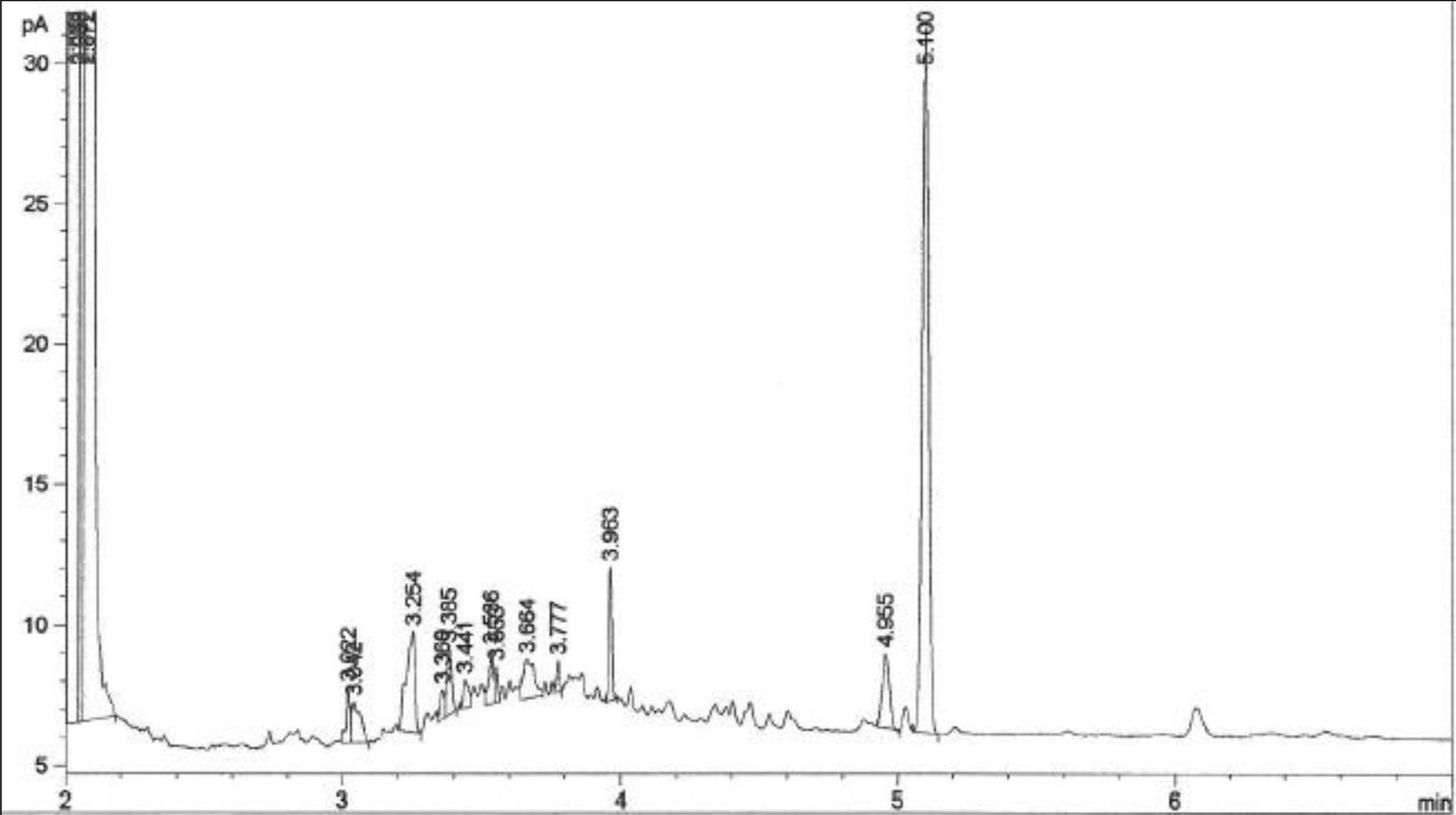
Cromatograma 19 (0.05 ppm de AEA en etanol, Condiciones 1)



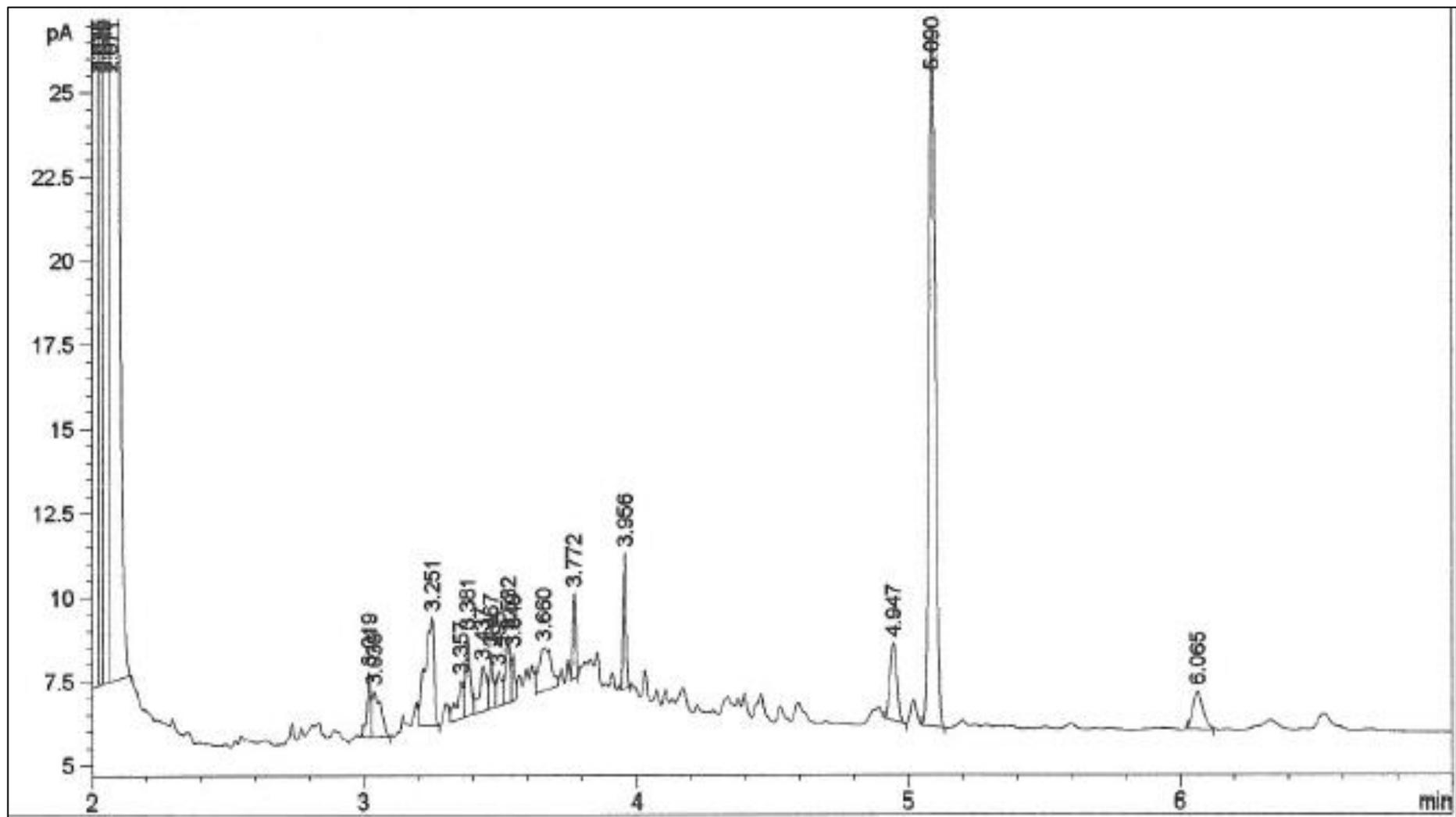
Cromatograma 20 (0.25 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



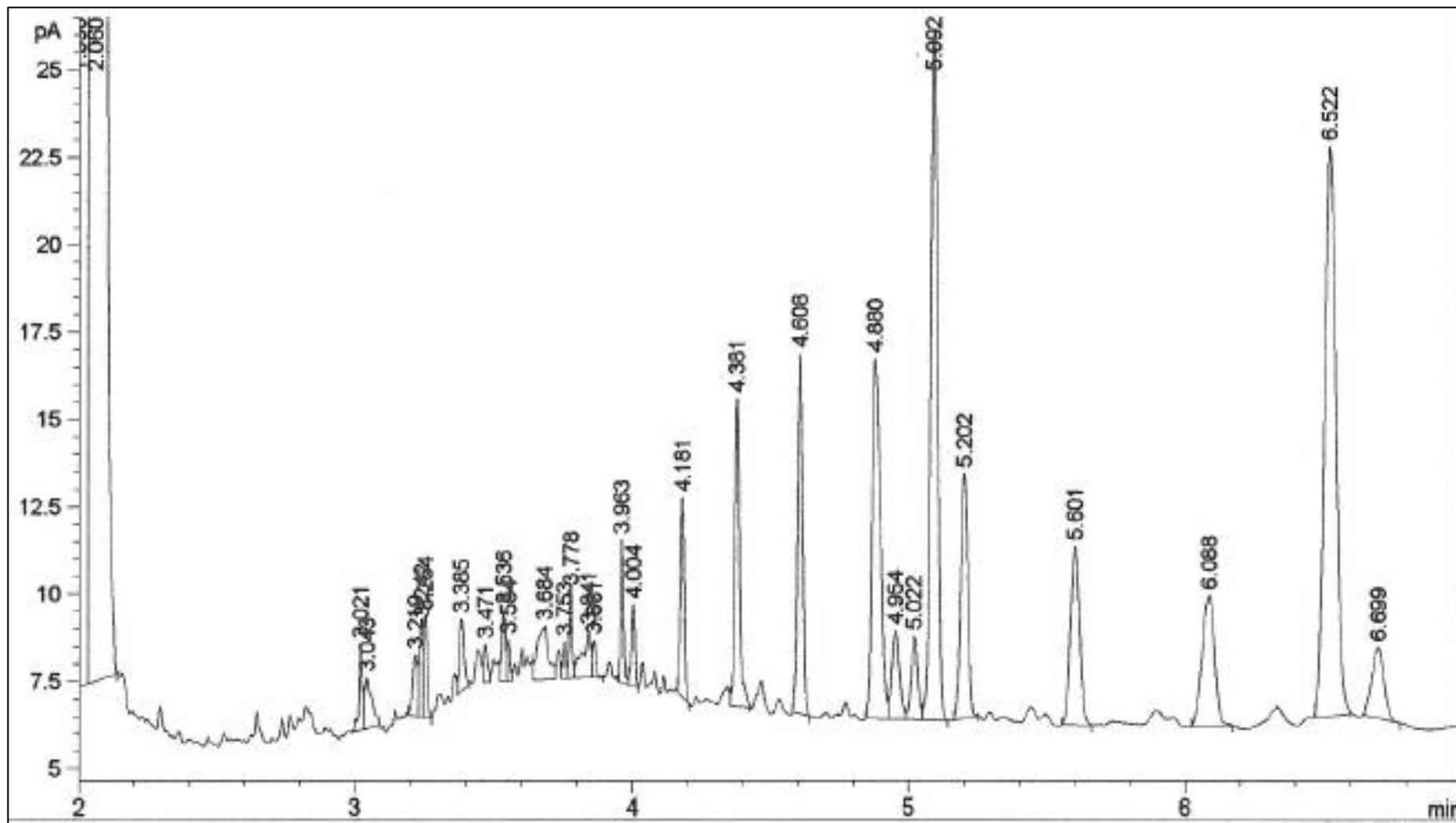
Cromatograma 21 (1 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



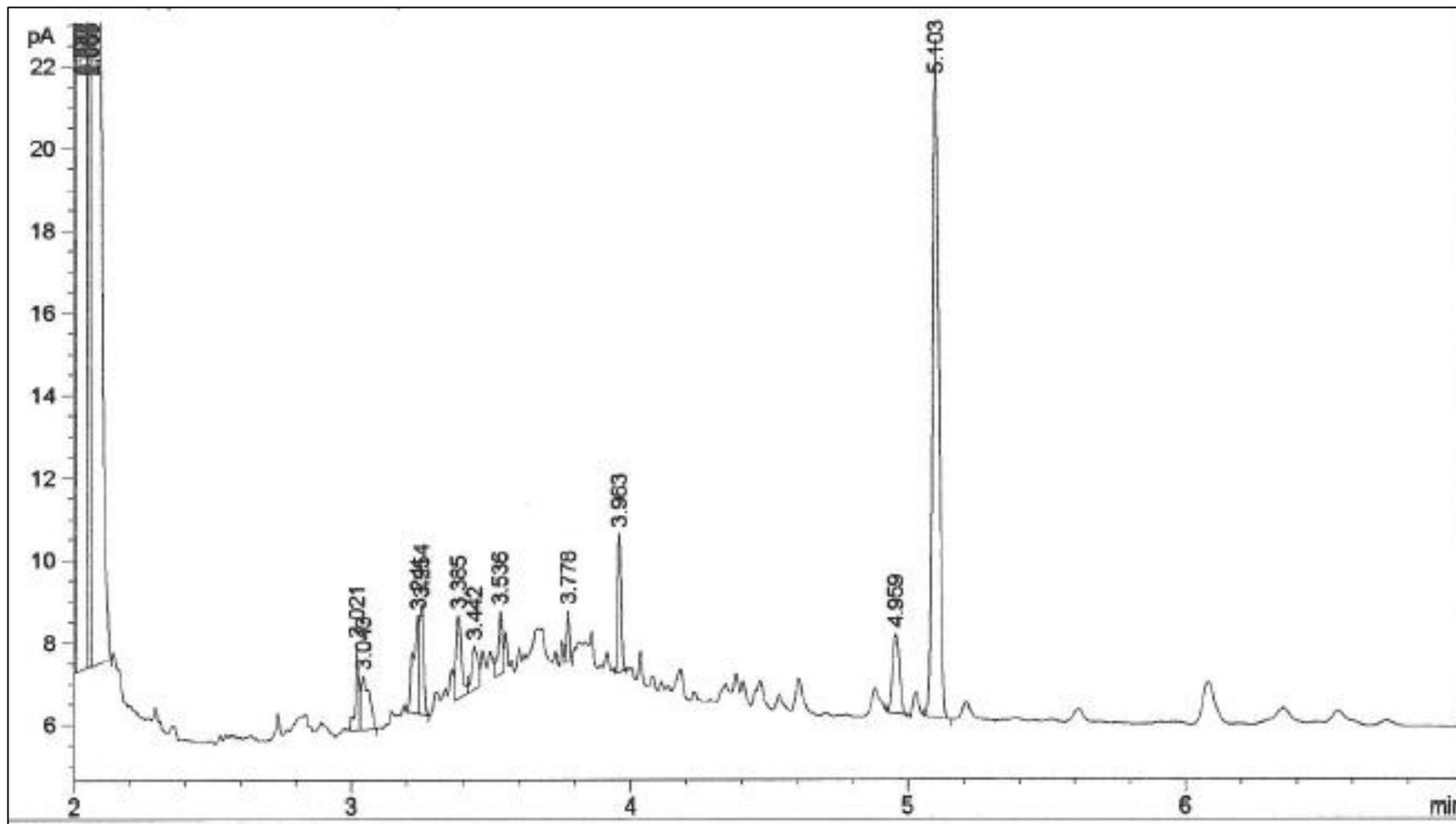
Cromatograma 22 (2 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



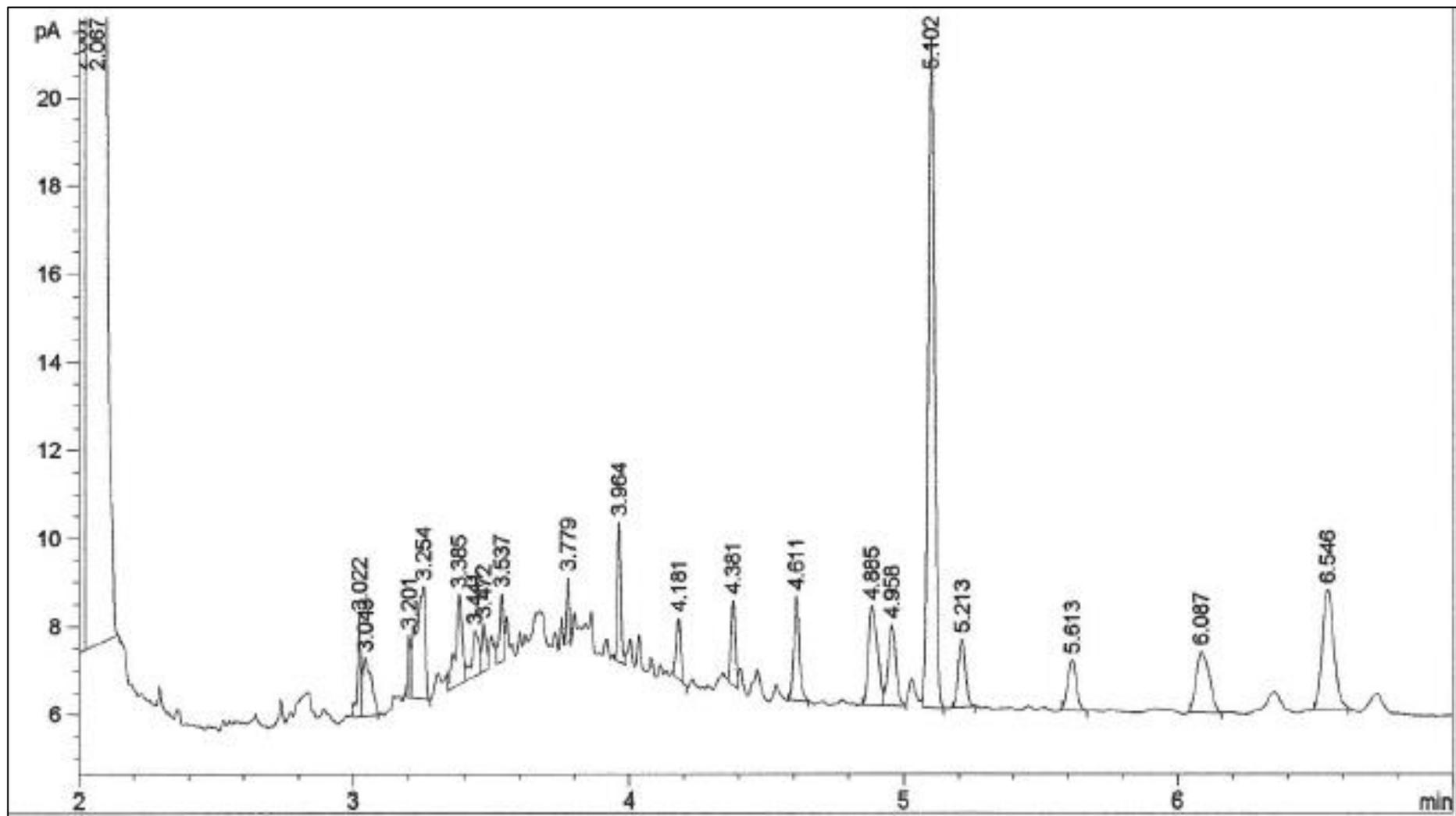
Cromatograma 23 (50 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



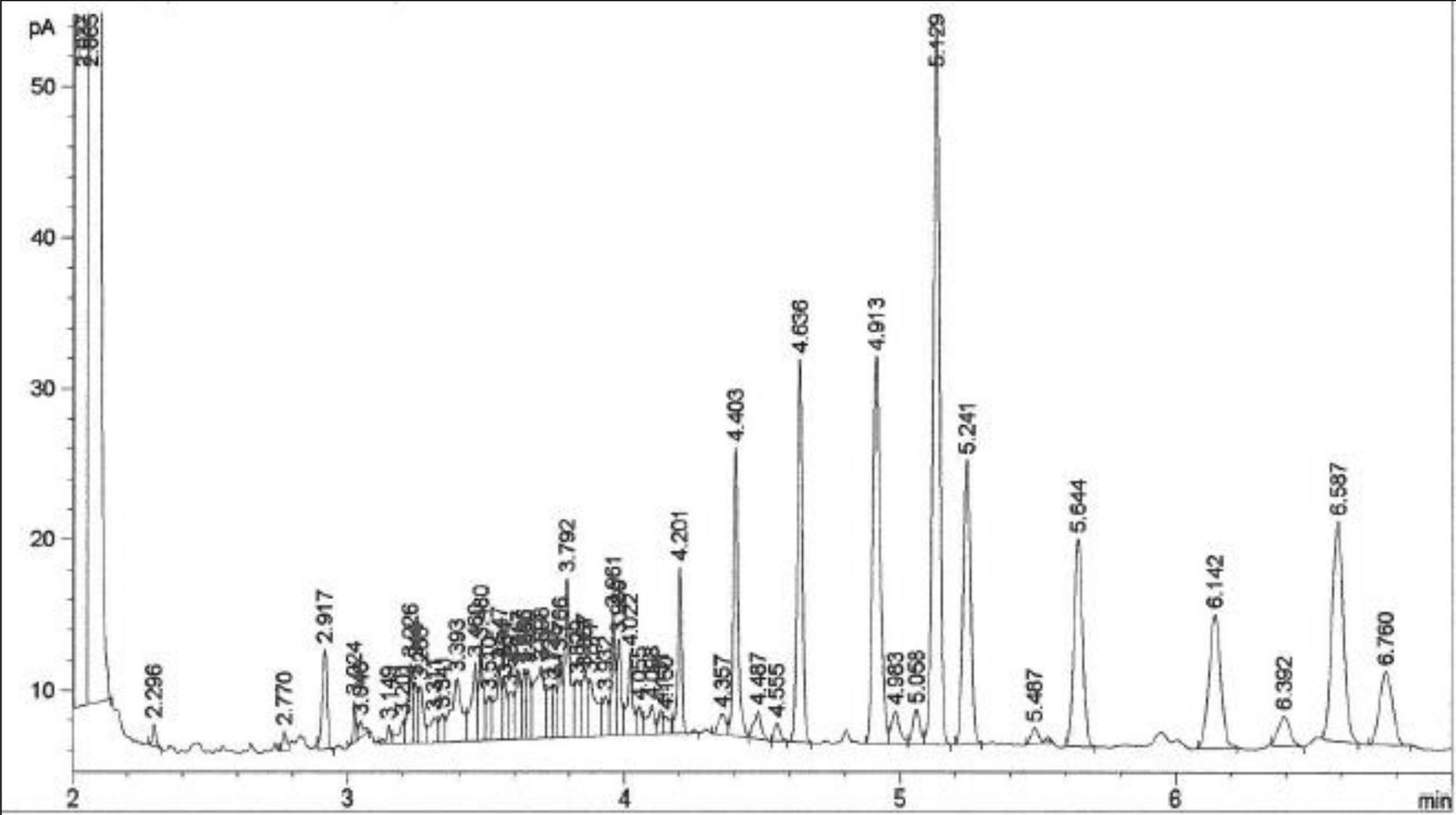
Cromatograma 24 (0.5 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



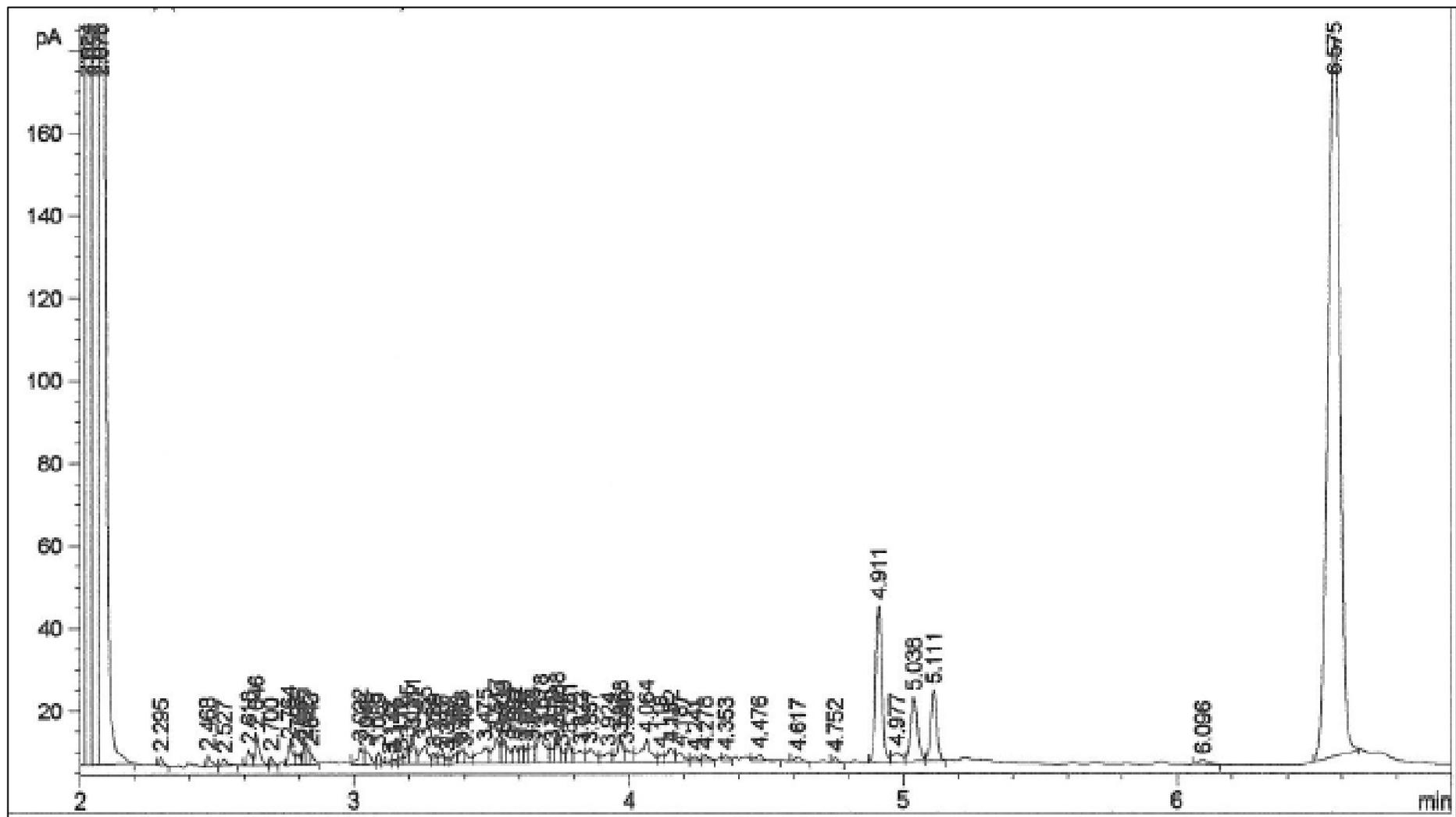
Cromatograma 25 (10 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



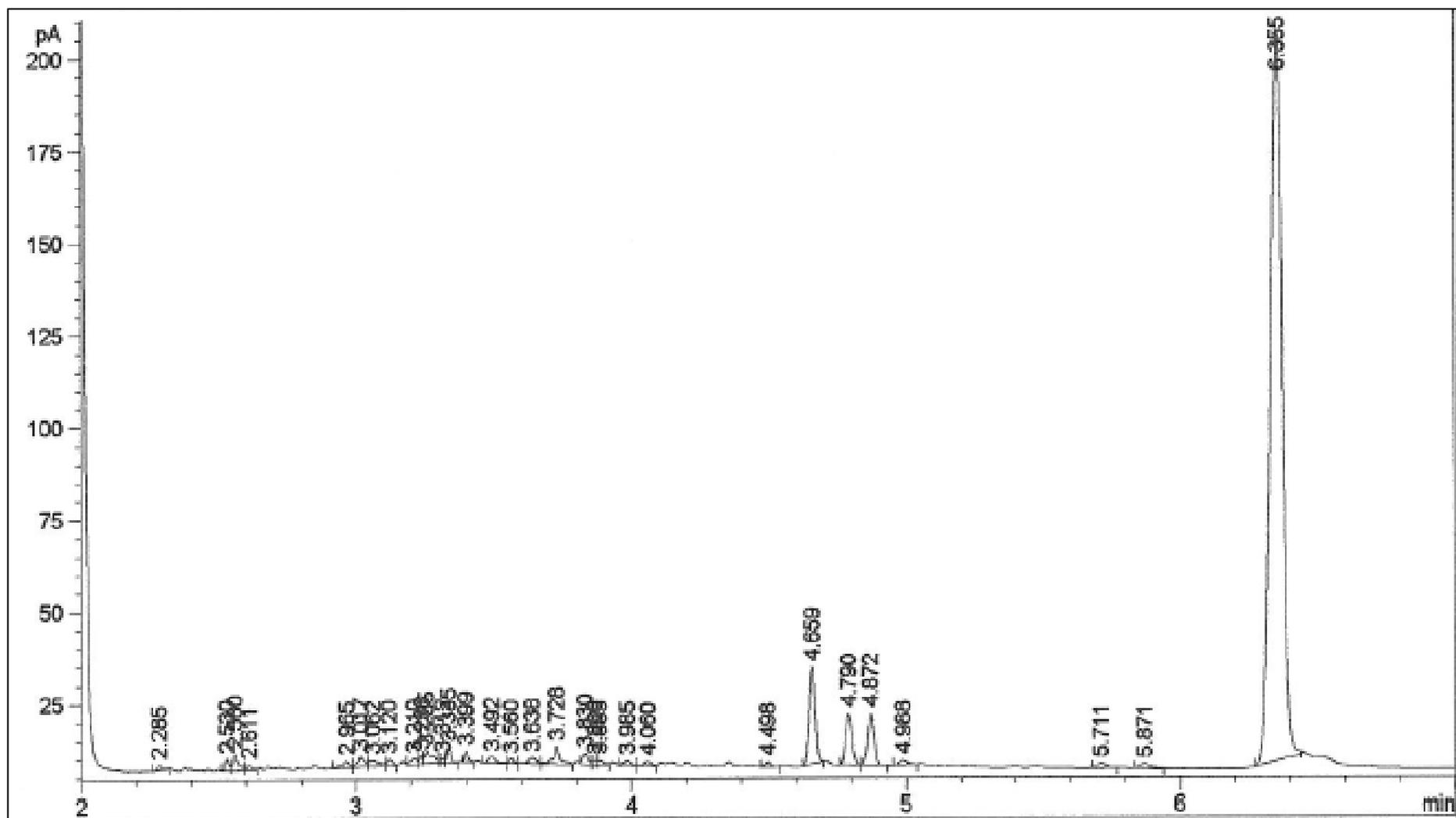
Cromatograma 26 (50 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



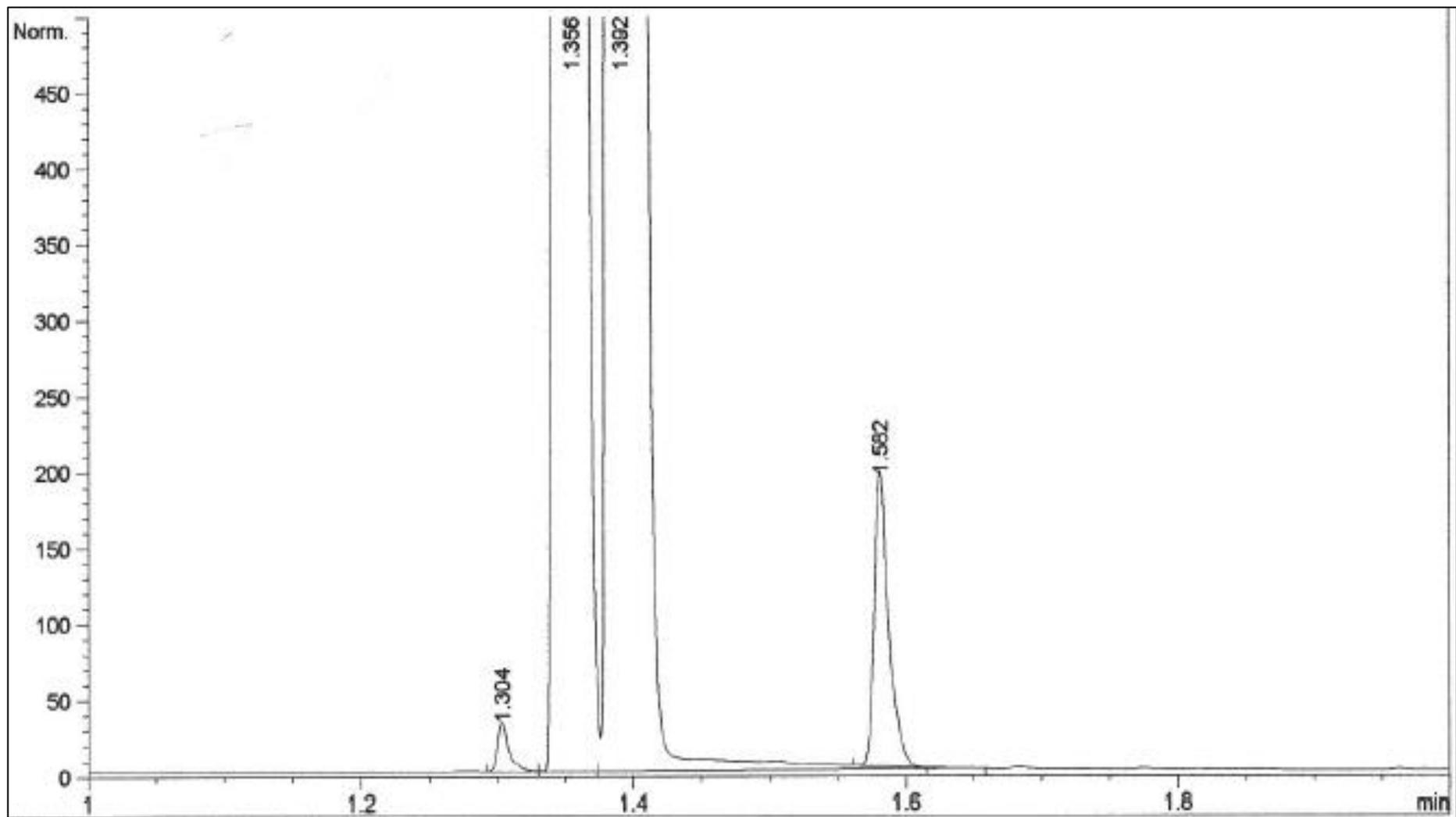
Cromatograma 27 (500 ppm de AEA en etanol, condiciones 1)



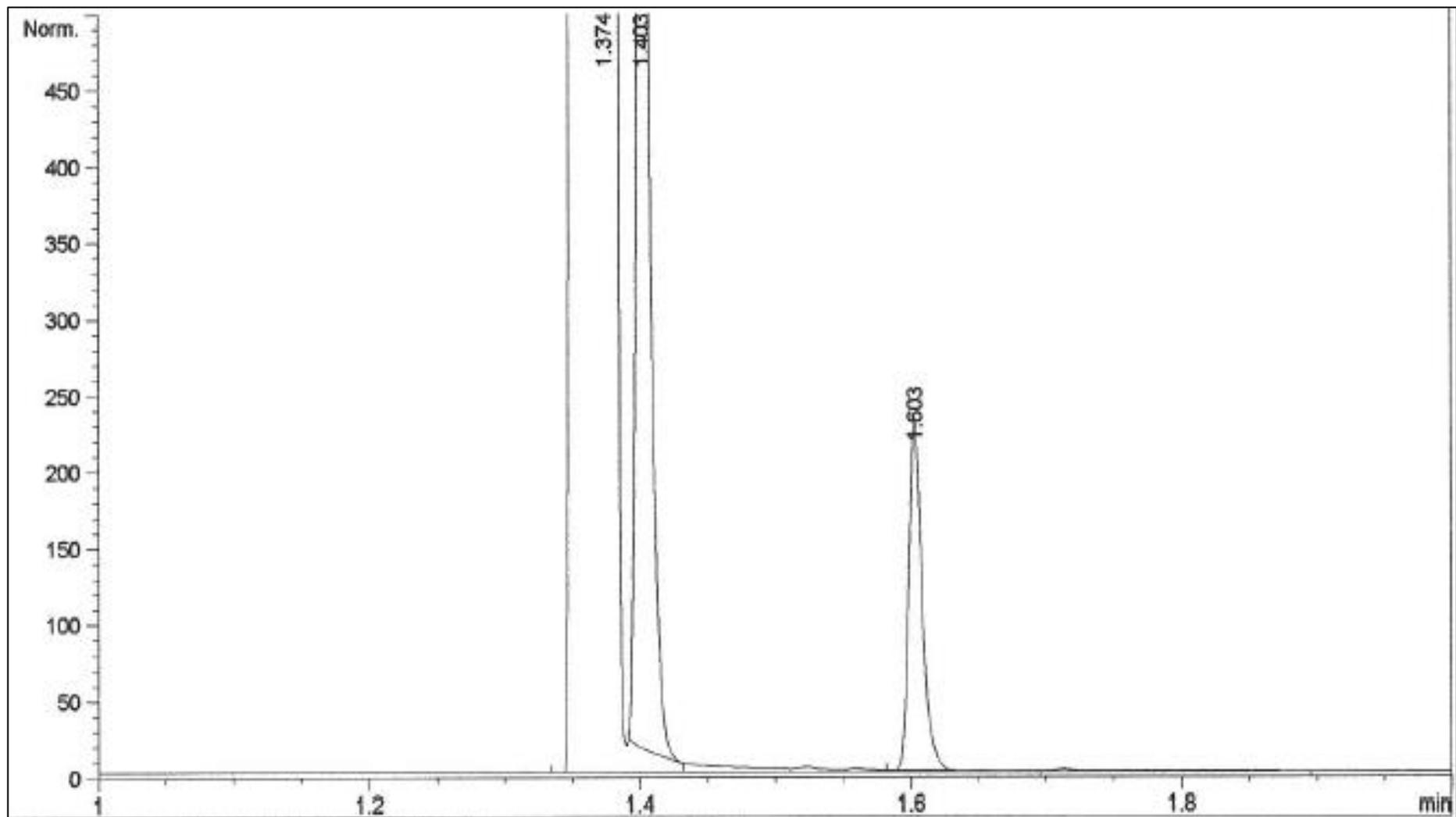
Cromatograma 28 (500 ppm de AEA en etanol, condiciones 1 con rampa 50 °C/min)



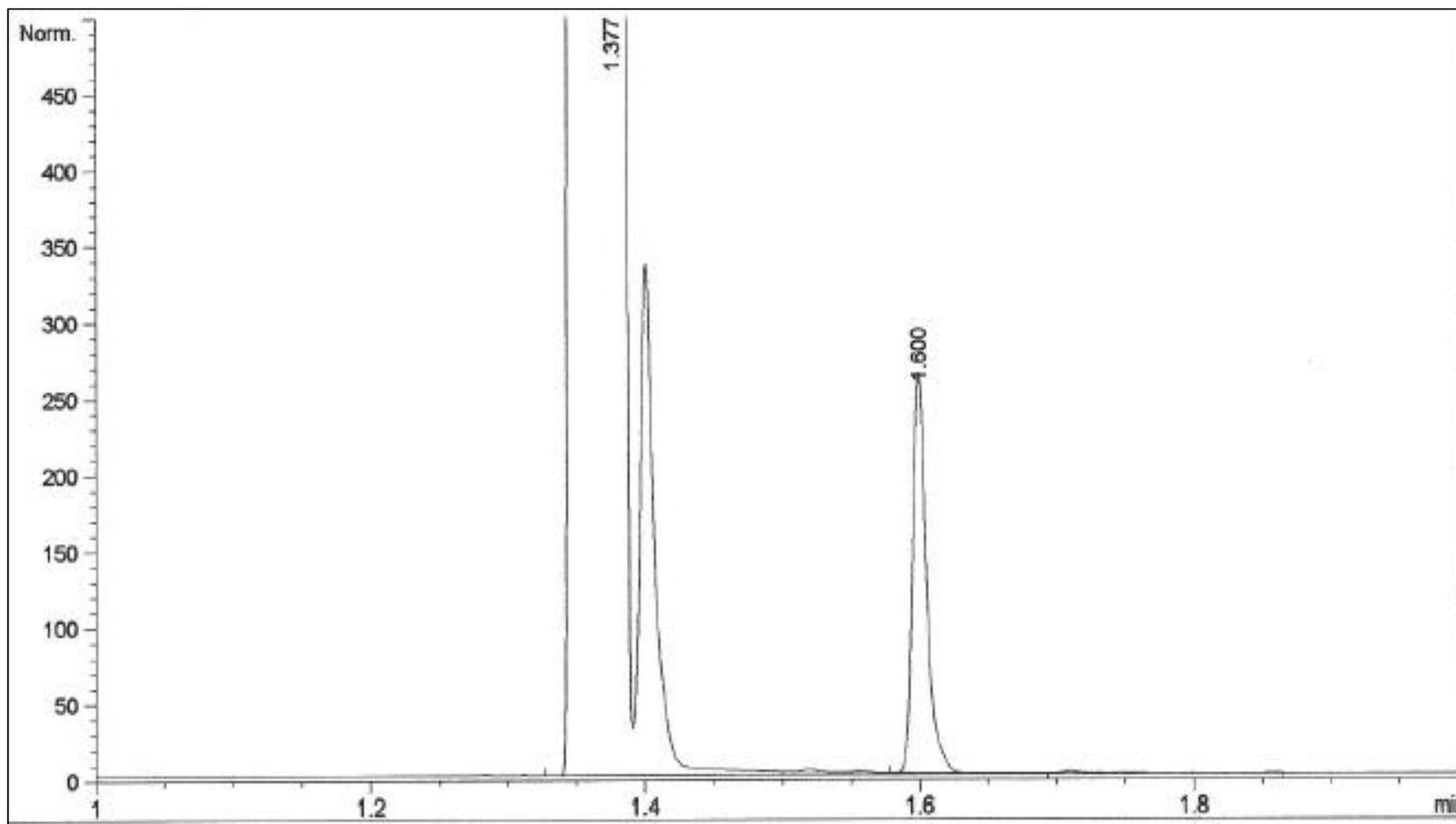
Cromatograma 29 (100 ppm de AEA en acetona, condiciones 2)



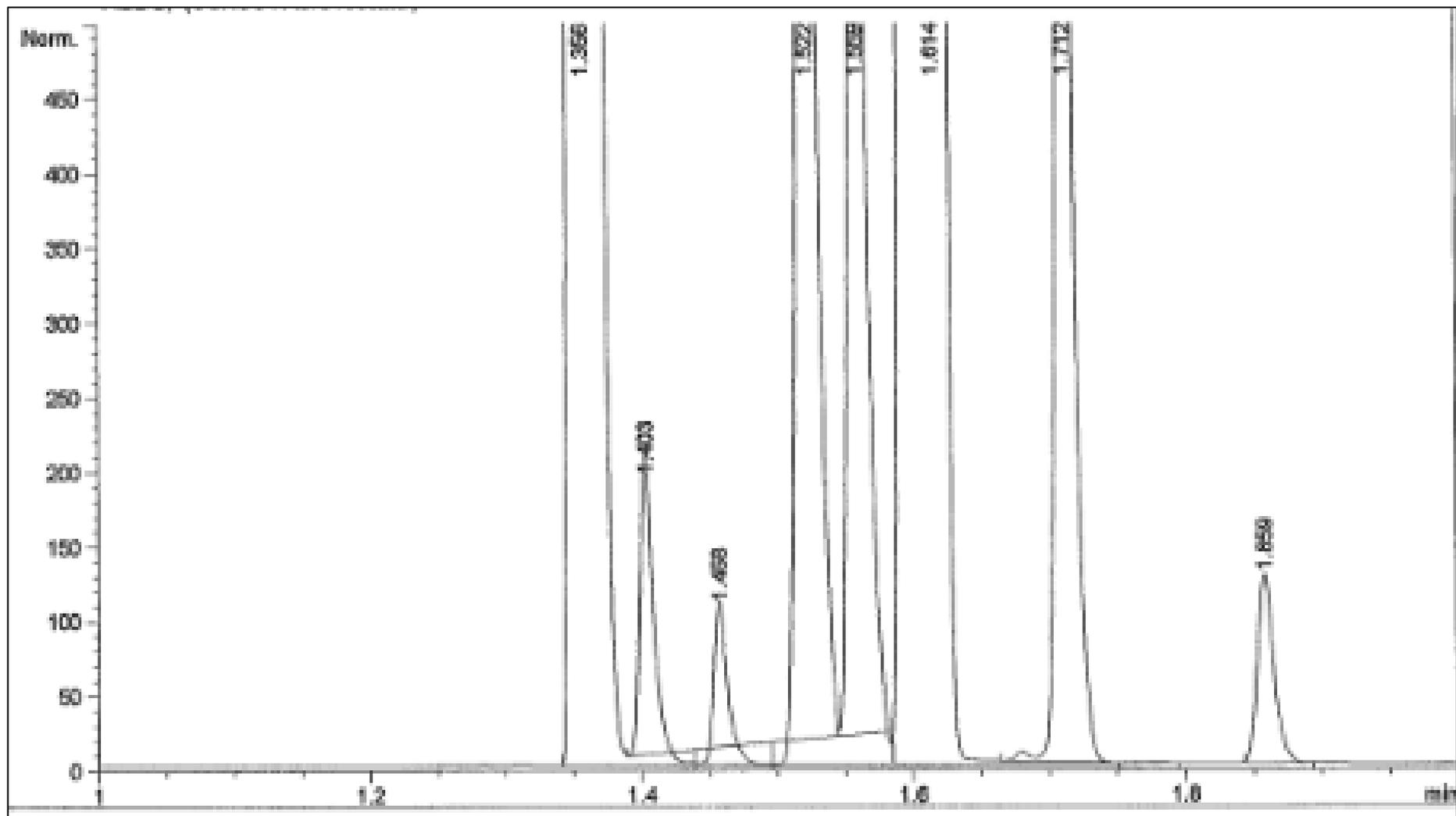
Cromatograma 30 (500 ppm de AEA en etanol, condiciones 2)



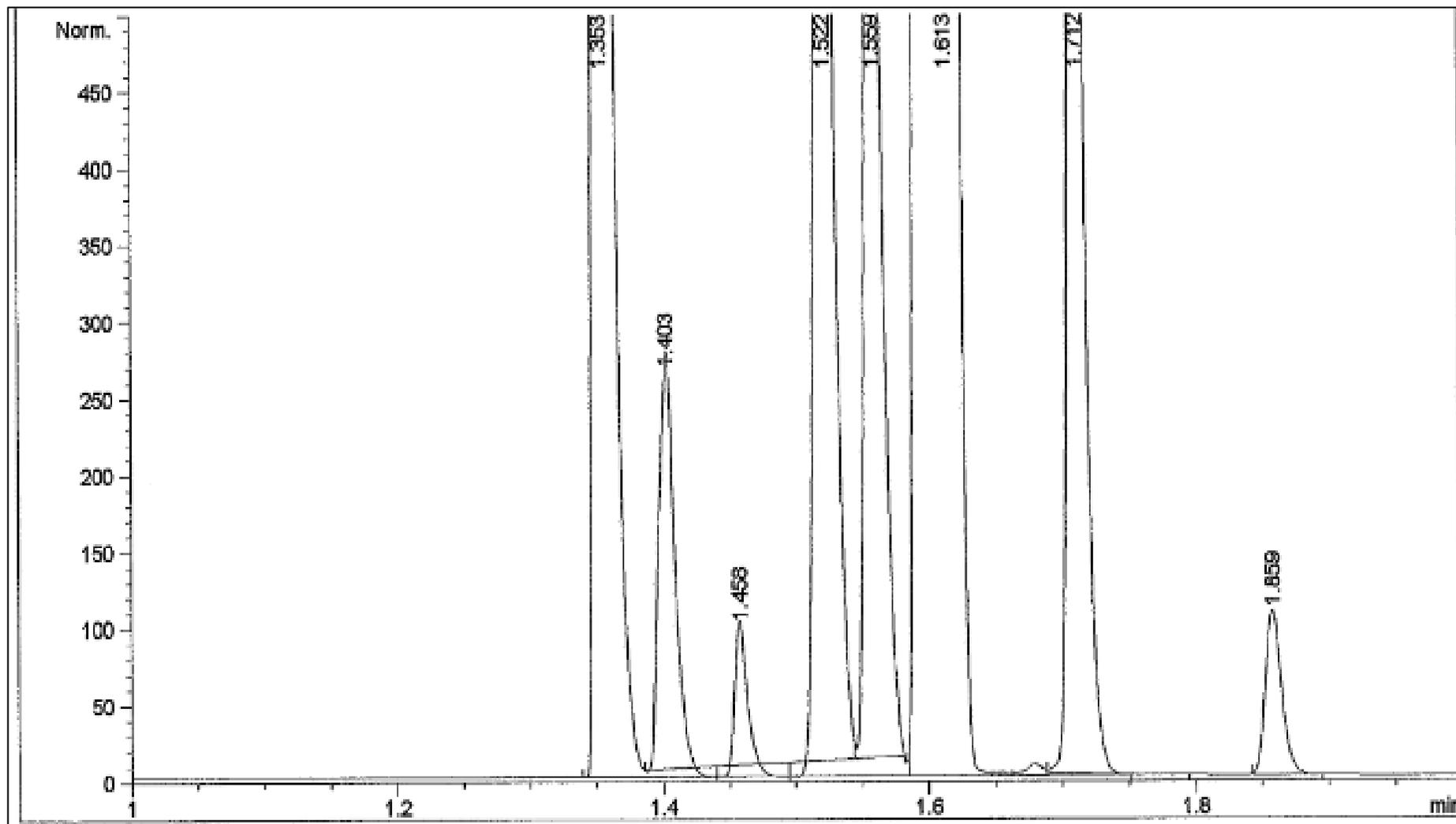
Cromatograma 31 (50 ppm de AEA en etanol, condiciones 2)



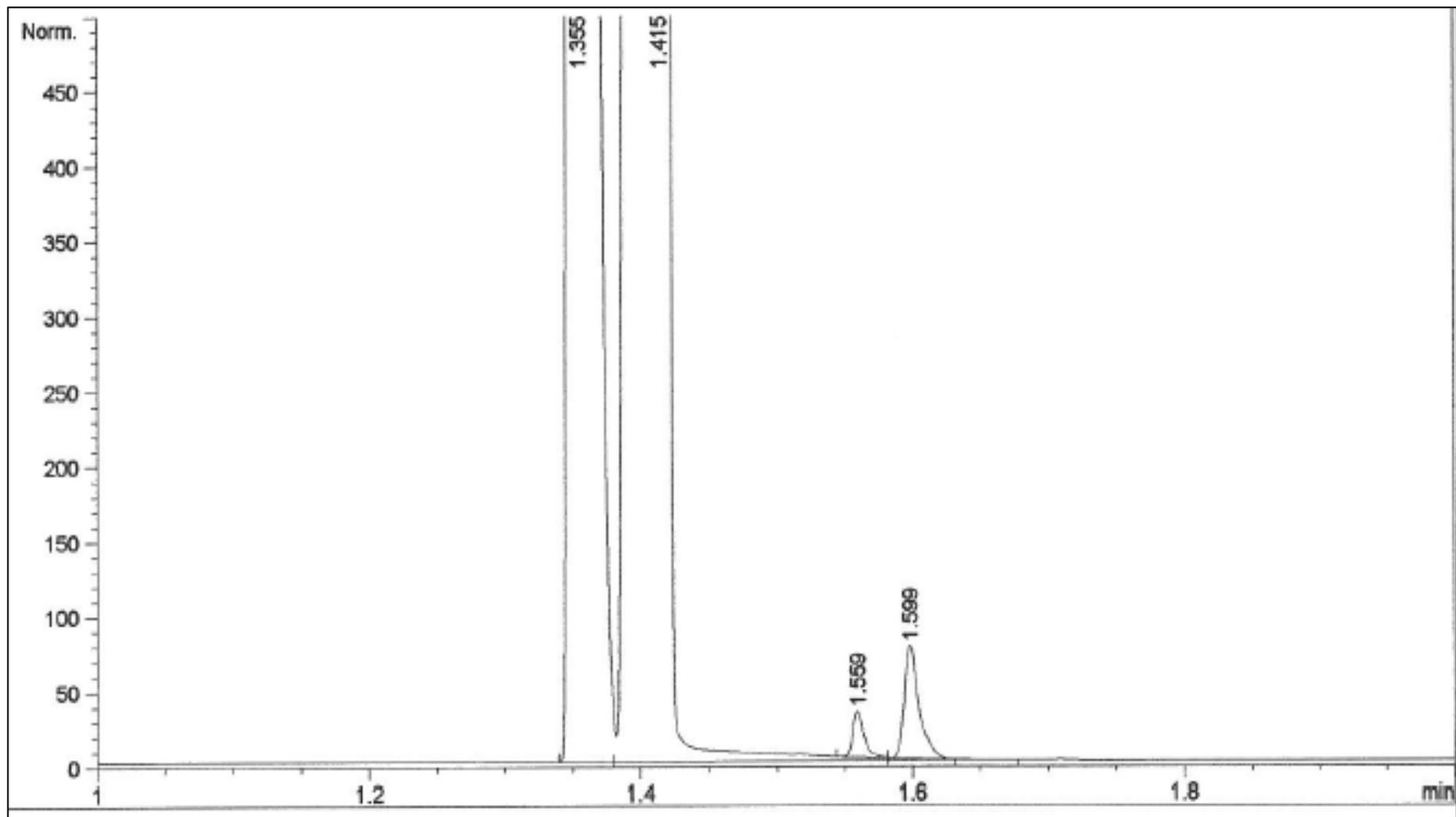
Cromatograma 32 (100 ppm de AEA en hexano, condiciones 2)



Cromatograma 33 (20 ppm de AEA en hexano, condiciones 2)



Cromatograma 34 (100 ppm de AEA en acetonitrilo, condiciones 2)



Cromatograma 35 (20 ppm de AEA en acetonitrilo, condiciones 2)

