

Cuantificación de ácido maslínico en hígados de ratas mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance en tandem con ionización por electrospray y detección por Espectrometría de Masas/Masas (LC ESI MS/MS)

Addona S^{1,3}, Barcarolo D¹, Zayas M¹, Angeli E^{1,2}, Huber E¹, Rebelindo E¹, Salinas F¹, Neme L¹, Ortega H^{1,2}, Hein G^{1,4}.

¹Centro de Medicina Comparada. ICIVET Litoral (UNL/CONICET). ²Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). ³Facultad de Ingeniería Química (UNL). ⁴Centro Universitario Gálvez (UNL).

E-mail: saddona@santafe-conicet.gov.ar

El ácido maslínico (ácido [2 α ,3 β]-2,3-dihidroxiolean-12-en-28-oico) es un triterpeno pentacíclico que se encuentra presente en varias fuentes naturales, como por ejemplo en las hojas y cera de la piel de aceitunas ⁽¹⁻³⁾. Estudios recientes han demostrado numerosas actividades biológicas de este compuesto que resultan beneficiosas para la salud de seres humanos y de animales ⁽⁴⁾. Entre sus aplicaciones, se utiliza en producción animal como aditivo alimentario para estimular el crecimiento.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología analítica para identificar y cuantificar ácido maslínico en hígados de ratas por cromatografía líquida de alta performance en tandem con ionización por electrospray y detección por espectrometría de masas/masas (LC ESI MS/MS).

Se utilizaron 80 ratas divididas en dos grupos: Grupo experimental (20 machos y 20 hembras; dosis de ácido maslínico 1000 mg/kg/día) y Grupo control (20 machos y 20 hembras; sin sustancia de ensayo). La dosis de ácido maslínico fue administrada por vía oral a través del alimento balanceado. Los animales tuvieron libre acceso al alimento durante todo el estudio. Finalmente, las ratas fueron sacrificadas a los 7, 28, 56 y 91 días, con una tolerancia de \pm 10%. Para la identificación y cuantificación del analito se utilizaron: un cromatógrafo líquido (UFLC) Shimadzu compuesto por 2 bombas modelo LC-20AD XR, desgasificador modelo DGU-20A3, inyector automático modelo SIL-20AC XR con horno calefactor de columna, y un espectrómetro de masas AB SCIEX modelo 3200 QTRAP triple cuadrupolo (MS/MS) híbrido con trampa de iones lineal con interfaz de ionización por electrospray (ESI). Los reactivos empleados (acetónitrilo, agua, metanol, formiato de amonio, hidróxido de amonio y acetato de etilo) fueron de grado analítico. Se optimizaron las condiciones operativas del espectrómetro para determinar el compuesto de interés y su estándar interno (ácido betulínico). Brevemente, la preparación de muestras consistió en el pesaje de 0,2 g de tejido en tubos eppendorf de 2 mL de capacidad y la adición de 100 μ L de agua grado analítico. Se fortificaron las muestras con el estándar interno hasta una concentración nominal de 40 ppm y luego se agregó 1400 μ L de acetato de etilo frío. Se vortearon y sonicaron durante 15 min, se centrifugaron a 3500 g y 4°C durante 15 min y se trasvasaron los extractos resultantes a tubos de vidrio KHAN (5 mL). Se repitió la operación con los residuos de muestras para obtener un segundo extracto que se combinó con el primero; se evaporaron los extractos resultantes hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno (10 psi) y en un baño con agua a 45°C durante 20 min y se reconstituyeron los extractos secos con 200 μ L de fase móvil, sonicándose durante 15 min. Finalmente se filtraron los extractos reconstituidos y se dispusieron en los correspondientes viales para su inyección en el cromatógrafo.

La calibración se llevó a cabo en una matriz testigo de hígados de ratas, para el siguiente rango analítico nominal: 0,25, 0,5, 1, 2 y 4 mg/kg. Se calcularon los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para el compuesto de interés en hígados de ratas, siendo 0,20 mg/kg y 0,60 mg/kg, respectivamente. El estudio de recuperación se realizó en los niveles bajo, medio y alto del rango analítico, obteniéndose valores porcentuales de: 115, 98 y 89, respectivamente. El contenido promedio de ácido maslínico en hígado de ratas, perteneciente al grupo experimental; y a lo largo del ensayo se presenta en la Tabla 1 junto con el coeficiente de variación (CV):

Tabla 1. Contenido promedio de ácido maslínico en hígado de ratas, grupo experimental.

Días	Ácido maslínico (mg/kg)			
	Hembras	CV	Machos	CV
7	< 0,6	2,9	1,8	7,4
28	1,4	7,4	1,3	5,2
56	1,3	2,2	0,8	3,1
91	1,1	2,4	0,7	7,9

Se desarrolló una metodología analítica para identificar y cuantificar ácido maslínico en hígados de ratas por LC ESI MS/MS, obteniéndose información valiosa y complementaria al protocolo diseñado para el estudio de ácido maslínico propuesto en el CMC. Resulta importante destacar que con los resultados obtenidos se pudo aportar información sobre la acumulación y metabolización del ácido maslínico en hígado, permitiendo a la empresa contratante avanzar con el registro de un suplemento nutricional en SENASA.

Bibliografía

- 1- Sanchez-González, M.; Colom, H.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.; Planas, J. 2014. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 58, 1970–1979.
- 2- Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.; García-Granados, A.; Planas, J. 2013. Liquid chromatography–mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.; *Food Chemistry* 141, 4375–4381.
- 3- Lozano-Mena, M.; Juan, M.; García-Granados, A.; Planas, J. 2012. Determination of Maslinic Acid, a Pentacyclic Triterpene from Olives, in Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 10220–10225.
- 4- Yin, M.; Lin, M.; Mong, M.; Lin, C. 2012. Bioavailability, Distribution, and Antioxidative Effects of Selected Triterpenes in Mice; *J. Agric. Food Chem.* 60, 7697–7701.